

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DE FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS
NO PERFIL METABÓLICO E CONDIÇÃO REPRODUTIVA
DE CÃES

THAILA CRISTINA PUTAROV

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre.

BOTUCATU - SP

Junho, 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DE FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS
NO PERFIL METABÓLICO E CONDIÇÃO REPRODUTIVA
DE CÃES

THAILA CRISTINA PUTAROV
Zootecnista

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Roberto Sartori
Co-orientador: Prof. Ass. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi
Co-orientador: Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Junho, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
- SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP -FCA -
FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P988a Putarov, Thaila Cristina, 1983-
Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães / Thaila Cristina Putarov. - Botucatu : [s.n.], 2010.
xii, 72 f.: grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.

Orientador: José Roberto Sartori
Co-orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Co-orientador: Ricardo Souza Vasconcellos
Inclui bibliografia.

1. Selênio. 2. Antioxidante. 3. Cães. 4. Sêmen. I. Sartori, Jose Roberto. II. Carciofi, Aulus Cavalieri. III. Vasconcellos, Ricardo Souza. IV. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho "(Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. V. Título.

Dedico

À minha família que sempre foi meu maior motivo de orgulho.

À mulher da minha vida, minha mãe Amália, por toda dedicação, amor e exemplo de vida que guiam meus passos a cada segundo, por estar sempre ao meu lado me fortalecendo.

Ao meu “BOB QUERIDO PAI” José por todo o amor e confiança em mim depositados, por sempre acreditar em mim e me ajudar a realizar meus sonhos.

Aos meus amados irmãos “cabeçudos” Junior, Alexandre, Denis, André e Igor, que são e serão meu refúgio por toda a minha vida.

À minha sobrinha e afilhada Pietra, minha sobrinha Beatriz e meu sobrinho Niklos por sempre colocarem muita alegria no meu dia apenas com um simples “Tiaaa Thailaaa”!!!

E não poderia deixar de dedicar aos meus adorados cães: aos que se foram, aos que hoje estão ao meu lado e aos que ainda virão, meu total respeito e admiração pelo MELHOR AMIGO do homem!

...como é grande o meu amor por vocês!

Ofereço

Ao meu namorado, Robson Sfaciotti Barducci, que além de ser essencial em minha vida foi também essencial para a conclusão deste projeto. Ajudou em todos os momentos da realização prática e sempre esteve ao meu lado me encorajando para que nunca desanimasse. Obrigada pela produção da ração, pelos canis lavados, pelos animais alimentados, pela grande ajuda nas coletas, pela paciência e pelo amor!

Te amo infinitamente!

Agradecimento Especial

A Elaine Cristina de Aquino Vitta, Ana Carolina Tozzo Guimarães, Márcia de Oliveira Sampaio Gomes e Cláudia Aparecida da Silva Nogueira que sempre me ajudaram em todos os sentidos não apenas com o experimento, mas principalmente com o lado pessoal. Obrigada pelos abraços, pelos “Bom dia, boa tarde e boa noite”, pelos sorrisos, pelos cafés, por tudo! Muito obrigada, vocês hoje são parte da minha vida!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado o dom da vida, a família que amo e todas as oportunidades de me tornar uma pessoa melhor tanto no campo pessoal quanto profissional.

Agradeço a Nossa Senhora das Graças por sempre iluminar o meu caminho. “*Ó Maria concebida sem pecado, rogai por nós que recorremos a vós.*”

A minha família, meus pais Amália e José, meus irmãos Junior, Alexandre, Denis, André e Igor por sempre acreditarem e apostarem em mim. Tudo, o que construí e o que irei construir, será sempre pensando em vocês. Aos meus sobrinhos Pietra, Beatriz e Niklos por todo o carinho.

Ao meu namorado, Robson Sfaciotti Barducci, pelo amor, paciência e companheirismo.

Aos meus cães, que me ensinaram muito mais do que limpar um quintal, me ensinaram a amar sem esperar nada em troca.

Ao Prof. Dr. José Roberto Sartori, orientador e amigo, pela oportunidade, pela confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos nesses anos de convivência. Obrigada por acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, por aceitar co-orientar me e fazê-lo de forma sempre participativa e presente, por permitir utilizar a instalação, animais e todos os recursos de seu laboratório, e por todos os valiosos ensinamentos. E claro por sempre querer fazer algo mais no experimento!

Ao co-orientador e amigo Dr. Ricardo Souza Vasconcellos por toda ajuda e atenção nestes dois anos de convivência.

À Prof.^a Dr.^a Maria Denise Lopes por toda a atenção, ajuda e por ter aberto as portas do Departamento de Reprodução Animal (FMVZ/Botucatu).

Ao Prof. Fernando Rutz por todas sugestões que contribuíram para a melhoria desta dissertação.

Aos professores Luiz Edivaldo Pezzato, Dirlei Antônio Berto, Margarida M. Barros, Antônio Celso Pezzato, Pedro de Magalhães Padilha e Cyntia Ludovico Martins pelas orientações e amizades durante a graduação e pós-graduação.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus

Botucatu, por ter sido meu lar durante todos esses anos possibilitando o meu aprimoramento, tanto pessoal quanto profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudo (Processo nº 2008/52555-8).

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Flávio Prada”, FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal: Márcia, Carol, Márcio, Iris, Sandra, Juliana, Fabiano, Leandro, Raquel, Letícia, Mariana Martins, Michele, Flávio, Natalie, Fernando, Ana Paula, Chayane e Victor.

Aos funcionários Elaine, Diego, Renata e Paulo por toda a ajuda no experimento.

À Valeska Rodrigues, Juliana Borges e Camila Ackermann que me ajudaram muito com a parte de análises de sêmen.

À Alltech do Brasil pelo suporte financeiro, em especial Andrea Malaguido, Emanuelle Gemin, Flávia Prieto, Maurício Rocha e Maria Constanza Rodriguez que sempre ajudaram, e muito, quando precisei.

À Mogiana Alimentos S.A. (Guabi) pelo suporte ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos no qual foi desenvolvida a presente pesquisa.

À DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. pelo fornecimento do suplemento mineral e vitamínico em especial a Rodolfo Pereyra.

À Corn Products Brasil pelo fornecimento da Protenose®, em especial a Lauro Luchesi.

À Frangoeste pelo fornecimento do óleo de vísceras em especial a Álvaro.

Aos meus amigos que sempre estarão comigo: Paulinha, Fernanda, Paola, Renata, Kátia, Aninha, Carol, Marise, Fozzi, Berne, Lelete, Sofia, Kxu, Porta, Avursa e Ovada. Ao Penteio pelo companheirismo principalmente na hora da fabricação da ração.

A todo pessoal do laboratório de nutrição de aves: Estela, Vitor, Fabyola, Ana Cristina, Priscila, Carolzinha, Juliana, Rosana, Luciane, Vanessa, Pedro e Thiago.

Aos funcionários de Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal (FMVZ): Carlão e Silene.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Zootecnia (FMVZ): Seila, Carlos e Danilo

A Fri-Ribe pelo empréstimo do Fred e ao Sr. Francisco Junqueira e seu filho Guilherme pelo empréstimo do Batuque, Bolero, Boné, Tainha e Rascunho.

Ao animais do laboratório de cães e gatos e principalmente aos meus grandes companheiros nesta pesquisa: Joaquim, Sheick, Spike, Marley, Charlie, Bolero, Batuque, Boné, Rascunho, Tainha, Brad, Luisinho, Bola, Zezinho, Onofre, Tomas, Chico, Peri, Demétrius, Juca, Napoleão, Junior, Fred e Luigi!

À todos que, de alguma forma, contribuíram nesta fase de minha vida e condução do experimento. Desculpem-me se esqueci de alguém. São muitos e divido todos os méritos desse trabalho com vocês.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Introdução	2
2. Revisão de literatura.....	3
2.1.Selênio na natureza	3
2.2.Deficiência, intoxicação e níveis adequados.....	4
2.3.Metabolismo do selênio.....	5
2.4.Biodisponibilidade do selênio.....	8
2.5.Importância do selênio na nutrição de cães	10
2.5.1. Selênio e o sistema antioxidante	12
2.5.2. Selênio e o sistema reprodutor	15
2.6.Suplementação de selênio nos alimentos para cães	17
3. Referências bibliográficas.....	19
 CAPÍTULO 2 - BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES	 25
Resumo	26
Abstract	27
Introdução	28
Material e métodos	29
Resultados	34
Discussão	38
Conclusões	43
Referências bibliográficas.....	43
 CAPÍTULO 3 - FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS E NO STATUS ANTIOXIDANTE DO SÊMEN DE CÃES.....	 47
Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50

Material e métodos	50
Resultados	55
Discussão	59
Conclusões	65
Referências bibliográficas.....	65
 CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES.....	 71
 Implicações.....	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Tabela 1. Níveis de Se recomendados pela AAFCO (2004) e NRC (2006) para cães.....	5
Tabela 2. Principais fontes de selênio utilizadas na indústria PetFood.....	9
 CAPÍTULO 2 - BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES.....	 25
Tabela 1. Inclusão dos ingredientes nas rações e composição bromatológica analisada	30
Tabela 2. Média e erro padrão dos valores de ingestão de selênio, excreção fecal e urinária, retenção de selênio e biodisponibilidade	35
Tabela 3. Média e erro padrão das concentrações de selênio no plasma sanguíneo e no pêlo nos dia 0 e 80 do experimento.....	35
Tabela 4. Médias e erro padrão das concentrações de selênio plasmático antes da alimentação e após 0,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas da alimentação.....	36
Tabela 5. Concentração média e máxima a absorção de selênio durante a curva pós-prandial, pico da área total e área abaixo da curva.....	37
Tabela 6. Média e erro padrão dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na lipoperoxidação espontânea (TBARS LE) e na lipoperoxidação catalisada pelo ferro (TBARS LCF), capacidade antioxidante total (TAC) no soro sanguíneo e atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) no sangue total.....	38
 CAPÍTULO 3 - FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS E NO STATUS ANTIOXIDANTE DO SÊMEN DE CÃES.....	 47
Tabela 1. Inclusão dos ingredientes nas rações e composição bromatológica analisada.....	52
Tabela 2. Média e erro padrão das concentrações de selênio no plasma seminal nos dia 0 e 80 do experimento.....	56

Tabela 3. Médias e erro padrão das características seminais: volume (ml), motilidade (%) e vigor nos dias 0, 20, 40, 60 e 80 do experimento.....	56
Tabela 4. Médias e erro padrão para as características seminais: concentração de espermatozóides por ml ($\times 10^6$ spz/ml) e número total de espermatozóides no ejaculado ($\times 10^6$ spz).....	57
Tabela 5. Médias e erro padrão das variáveis relacionadas ao teste de integridade de membrana e morfologia espermática nos dias 0, 40 e 80 do experimento.....	58
Tabela 6. Média e erro padrão dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na lipoperoxidação espontânea (TBARS LE) e na lipoperoxidação catalisada pelo ferro (TBARS LCF), capacidade antioxidante total (TAC) e atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) do plasma seminal.....	59

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Figura 1. Estrutura molecular da metionina, selenometionina, cisteína e selenocisteína, o átomo de selênio (Se) ocupa o mesmo lugar que o de enxofre (S) (Adaptado JACQUES, 2001).....	4
Figura 2. Possíveis caminhos metabólicos do selênio (adaptado de JACQUES, 2001).....	7
 CAPÍTULO 2 - BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES	 25
Figura 1. Concentrações plasmáticas de selênio 0, 0,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas após a ingestão da ração.....	36

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Quadro1: Selenoproteínas de Mamíferos.....	11

CAPÍTULO 1

CONDIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras pesquisas têm demonstrado a importância dos elementos traços na alimentação de seres humanos e animais. Até recentemente, os elementos traços, ou micro minerais, eram adicionados às dietas ou suplementados apenas para corrigir deficiências nutricionais. Hoje, são vistos como importantes nutrientes que além de atuarem na manutenção dos processos metabólicos, potencializam aspectos de saúde e produção. Pouco se sabe sobre as funções, o metabolismo, a biodisponibilidade e a exigência de elementos traços, como o selênio, para cães e gatos. No entanto, sabe-se que este é essencial, e sua ingestão dietética ideal esta relacionada com o aumento da longevidade e com a prevenção de doenças em animais e seres humanos (TODD et al., 2006).

O interesse primário pelo selênio na nutrição ocorreu devido a seus efeitos tóxicos. A descoberta por Schwarz e Foltz (1957) de que é um mineral essencial, nutricionalmente, modificou as pesquisas sobre o selênio, pois ao invés de se preocuparem com seu efeito tóxico, pesquisadores começaram a se concentrar no seu papel metabólico e nas consequências de sua deficiência (ROTRUK et al., 1973).

O selênio (Se) está amplamente distribuído nos tecidos animais, ainda que presente em pequenas quantidades em alguns órgãos ou tecidos (NRC, 2006). Entretanto, altas concentrações de selênio na maioria das espécies são encontradas no fígado e rins, os tecidos com maiores concentrações de selênio são os músculos (LEVANDER, 1986). As quantidades de selênio nos ingredientes dos alimentos para cães e gatos podem variar muito; as concentrações deste mineral nos tecidos vegetais dependem da região geográfica da fonte e da concentração de Se no solo (SURAI, 2002; NRC, 2006). Já nos tecidos animais sua concentração depende dos níveis de selênio da dieta (TODD e HENDRIKS, 2005).

Hoje, o selênio é considerado de extrema importância na nutrição humana e animal. Os estudos do uso de selênio na medicina curativa e preventiva são bastante promissores. Entretanto, mais estudos são necessários, principalmente no que diz

respeito aos níveis adequados de ingestão diária, aos limites máximos de segurança em cães e gatos e aos mecanismos de ação do selênio no organismo animal (NRC, 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Selênio na natureza

O selênio, descoberto pelo químico sueco J. J. Berzelius em 1817, é um elemento não metálico do grupo 6A da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro diferentes estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}) (EISLER, 1985). As propriedades químicas são semelhantes as do enxofre e na natureza pode ser encontrado tanto em sua forma orgânica quanto inorgânica dependendo do agente ligante que pode ser um metal ou um não metal.

É um mineral muito difundido na crosta terrestre e sua concentração nos solos pode variar de 0,1 a 2 ppm (LYONS et al., 2007). O selênio presente nos solos é consequência do intemperismo do conteúdo de rochas fosfatadas, sedimentares e ígneas, da atividade vulcânica e da queima de combustíveis fósseis (FRANKENBERGER e BENSON, 1994). O teor e a forma de selênio nos solos dependem do pH, do potencial redox e da composição mineral do meio, além da fertilização artificial e das chuvas (LYONS et al., 2007). Por isso, a concentração deste mineral nos tecidos vegetais é tão variável. Uma mesma espécie vegetal cultivada em solos diferentes apresenta distintos teores de selênio e mesmo espécies diferentes cultivadas em um mesmo solo apresentam concentrações distintas deste mineral, pois cada planta absorve e armazena o selênio de forma variada.

No solo o selênio encontra-se principalmente em sua forma inorgânica; nas plantas o que predomina é a forma orgânica como selenometionina ou selenocisteína, e esta é a principal maneira que os animais o ingerem na natureza (COMBS e COMBS, 1986). O selênio e o enxofre possuem estrutura química semelhante e, possivelmente, utilizam caminhos metabólicos similares, utilizando até as mesmas enzimas. A selenometionina e a selenocisteína são moléculas análogas às moléculas de metionina e cisteína, respectivamente. Na cadeia química dos selenoaminoácidos o selênio ocupa o mesmo lugar que o enxofre ocuparia em uma molécula de aminoácido (Figura 1).

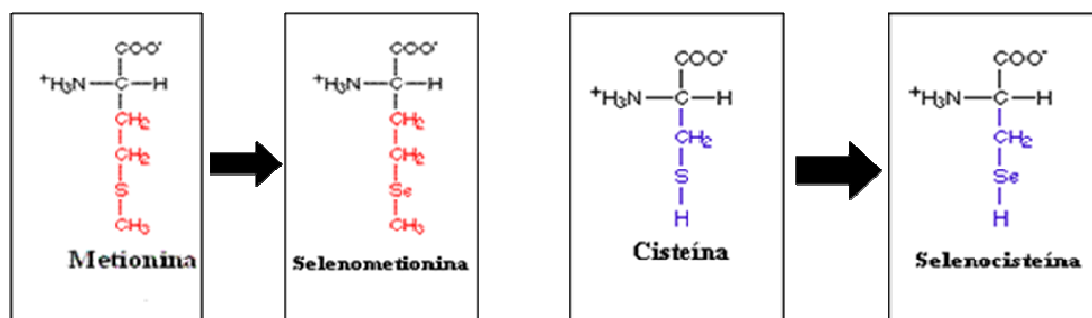


Figura 1. Estrutura molecular da metionina, selenometionina, cisteína e selenocisteína, o átomo de selênio (Se) ocupa o mesmo lugar que o de enxofre (S) (Adaptado JACQUES, 2001).

O selênio é considerado um dos mais controversos elementos traços. Por um lado é tóxico em altas concentrações, e por outro, sua deficiência causa problemas relacionados ao aumento na susceptibilidade a várias doenças em humanos e animais, e afeta negativamente a produção e reprodução animal (LYONS et al., 2007).

2.2. Deficiência, intoxicação e níveis adequados

A falta de selênio resulta em diversas síndromes patológicas, que podem variar de acordo com a espécie e o status de vitamina E. Necrose de fígado em ratos, diátese exsudativa e fibrose pancreática em frangos, doença do músculo branco (distrofia muscular) em bezerros e cordeiros, e eventual morte em todas as espécies são exemplos destas síndromes (HENRY e AMMERMAN, 1995).

A deficiência de selênio em cães e gatos não parece ser um grande problema, uma vez que a maioria desses animais é alimentada com rações comerciais que, provavelmente, contenham níveis adequados de selênio (SIMCOCK et al., 2005). Porém, estudos mostram sintomas de deficiência em cães, como a degeneração dos músculos esqueléticos e cardíacos, fraqueza muscular, edema subcutâneo, anorexia, depressão, coma e mineralização renal (VAN VLEET, 1975).

Os sinais de intoxicação por selênio em cães e gatos, também são improváveis de ocorrer naturalmente (CASE et al., 1998). O maior risco de intoxicação por selênio em animais de companhia é o uso de tablets suplementares de selênio destinados a humanos. Os sintomas de intoxicação incluem necrose do miocárdio, hepatite e nefrite tóxica. A intoxicação por selênio é caracterizada pelo odor de alho na respiração, queda de pêlo, excesso de salivagem, cegueira, paralisia e morte (HILL e ALDRICH, 2003).

Dentre os fatores que afetam a toxicidade do selênio se incluem a forma química administrada, o tempo de exposição ou administração, a quantidade ingerida, a natureza dos outros ingredientes da dieta e a susceptibilidade dentre as espécies animais (MCDOWELL, 1992).

Níveis elevados de enxofre e proteínas na dieta podem diminuir a severidade da ingestão excessiva de selênio. O Food and Drug Administration (FDA) regula o uso de selênio na alimentação animal, sendo permitido o limite máximo de 0,3 ppm na suplementação (MATEOS et al., 2004). Enquanto não há regulamentações específicas para *Pet Foods* admite-se este mesmo valor na nutrição de cães e gatos (HILL e ALDRICH, 2003).

Os efeitos da sua toxicidade em humanos e em animais de produção geralmente ocorrem na faixa de 5 ppm (KOLLER e EXON, 1986, citados por TOOD e HENDRIKS, 2005), no entanto alguns alimentos para cães e gatos contêm por volta 6 ppm de selênio (SIMCOCK et al., 2005). Não se sabe ao certo quais são os níveis adequados de exigência de selênio para cães e gatos; estes parecem tolerar doses bem mais altas do que as demais espécies. Na Tabela 1 estão relatados os níveis indicados pela AAFCO (2004) e NRC (2006).

Tabela 1. Níveis de Se recomendados pela AAFCO (2004) e NRC (2006) para cães

Referência	Unidade na MS (4000 kcal EM/kg)	Crescimento (mínimo)	Adultos em manutenção (mínimo)	Reprodução (mínimo)	Máximo
AAFCO (2004)	mg/kg	0,11	0,11	0,11	2,00
NRC (2006)	mg/kg	0,21	*	*	*

*Não há dados a respeito, apenas recomendam um valor adequado de 0,35 mg/kg MS para crescimento, adultos em manutenção e reprodução (NRC, 2006).

2.3. Metabolismo do selênio

A importância e o papel do selênio em manter o funcionamento metabólico normal são bem reconhecidos, e a ingestão dietética ótima promove a longevidade e a prevenção de doenças tanto em humanos como em animais.

As formas de selênio ingeridas pelos animais dividem-se em duas categorias: inorgânicas e orgânicas. As formas inorgânicas são os sais de selênio: selenido (Se^{-2}),

selenito (Se^{-4}) e selenato (Se^{-6}). As plantas absorvem o selênio inorgânico do solo e os convertem em selênio orgânico na forma de selenoaminoácidos, como a selenometionina e selenocisteína, que serão incorporadas em proteínas (SIMCOCK et al., 2002).

A selenometionina é a principal forma de selênio encontrada em plantas, seguida da selenocisteína e do selenito e os animais não podem sintetizá-la, sendo obtida obrigatoriamente da dieta. Os animais obtêm o selênio dos cereais e grãos ou de tecidos de outros animais, dependendo do seu hábito alimentar (TODD e HENDRIKS, 2005).

A absorção do selênio não é regulada metabolicamente, no entanto, as quantidades de selênio absorvidas são dependentes de sua forma química, de sua concentração nas fontes da dieta, do processamento sofrido pelo alimento, da interação com outros nutrientes, da digestibilidade das fontes e de outros fatores que podem afetar a sua biodisponibilidade (JACQUES, 2001).

O mecanismo pelo qual o selênio é absorvido determina sua taxa de absorção; as fontes orgânicas e inorgânicas não são absorvidas pelo mesmo mecanismo. A maior parte do selenito é absorvida no duodeno por difusão passiva, enquanto o selenato é ativamente absorvido no íleo por co-transporte com íons de sódio. O selênio oriundo da selenometionina também é absorvido no intestino delgado, com maior taxa de absorção no duodeno. Sua absorção ocorre pelo sistema sódio dependente, e divide o mesmo mecanismo com a metionina, assim como a selenocisteína que compete com a cisteína, lisina e arginina (JACQUES, 2001).

A selenometionina é rapidamente acumulada no fígado e nos músculos. O selênio orgânico encontrado na forma de selenometionina é metabolizado da mesma maneira que a metionina (WOLFRAM, 1999; BURK et al., 2003), e é rapidamente utilizado como substrato por enzimas que usam metionina. A selenometionina parece ser mais disponível do que a metionina (MARKHAM et al., 1980).

Uma vez absorvido, o selênio da dieta de origem orgânica ou inorgânica possui diferentes destinos, resultando no estoque, síntese de selenoproteínas ou excreção (Figura 2). Todas as formas de selênio são convertidas em única forma de selênio, o hidreto de selênio (H_2Se), e depois são encaminhadas para possíveis destinos (FRANKENBERGER e BENSON, 1994; SIMCOCK et al., 2002).

Figura 2. Possíveis caminhos metabólicos do selênio (adaptado de JACQUES, 2001).

As formas inorgânicas quando não usadas na síntese de selenoproteínas sofrerão o processo de metilação, processo importante no metabolismo do selênio (GANTHER e LAWRENCE, 1997) e serão excretadas pelo pulmão ou pelos rins. O processo de metilação é o mecanismo de desintoxicação de selênio (NAKAMURO et al., 2000).

As formas orgânicas de selênio são mais absorvidas que as formas inorgânicas (MCDOWELL, 1992). Selenometionina e selenocisteína podem ser incorporadas no corpo das proteínas como, por exemplo, em músculos, no lugar da metionina e da cisteína (TODD e HENDRIKS, 2005), mas também sofrem o processo de metilação (NAKAMURO et al., 2000).

Pehrson (1993) define que a maior vantagem em se suplementar animais com selênio orgânico não está na maior absorção, pois as formas inorgânicas também são bem aproveitadas e suprem as deficiências. A maior vantagem está na melhoria do

status antioxidante que, muitas vezes, não é atingido com a suplementação de selênio inorgânico. Em ratos, tanto a fonte inorgânica de selenito de sódio quanto as fontes orgânicas selenometionina e selenocisteína foram absorvidas acima de 90% (NRC, 2006).

O selênio é carregado no plasma, associado à albumina e selenoproteína P até os tecidos alvos, está associado às proteínas no organismo sendo primeiramente encontrado nos músculos e tecidos rico em proteínas e pouco encontrado no tecido adiposo. Os níveis sanguíneos respondem as mudanças nas concentrações das dietas (HILL e ALDRICH, 2003). Nos tecidos é armazenado principalmente como selenocisteína e selenometionina e sua concentração nos diversos órgãos varia com o consumo.

As formas orgânicas são melhores incorporadas nos tecidos do que as formas inorgânicas, e isto se torna mais evidente quando se aumenta os níveis de selênio presentes na dieta. Whanger e Butler (1988) encontraram diferença significativa de selênio acumulado no tecido entre os dois tipos de fontes quando adicionados de 1,0 a 4,0 mg de selênio por kg de ração, porém com níveis mais baixos (0,2 mg de selênio por kg) não houve diferença. Parece que certas formas de selênio, como por exemplo, a selenometionina, possui ação mais eficaz evitando e reparando danos nos tecidos quando comparada ao selenito (SURAI, 2003). A principal via de excreção do selênio é pela urina, mas também podem ocorrer perdas pelo pulmão e fezes. As perdas fecais são constituídas do selênio não absorvido.

2.4. Biodisponibilidade do selênio

O selênio é encontrado em muitos ingredientes usados em alimentos para cães, especialmente em grãos de cereais (0,3 mg de Se/kg, em média), carne bovina, peixes (2,0 mg de Se/kg, em média) e aves, que possuem quantidades apreciáveis de selênio (HILL e ALDRICH, 2003; NRC, 2006). Devido a esta grande variabilidade da concentração de selênio nos ingredientes, os alimentos para cães e gatos são frequentemente suplementados e as fontes mais comumente usadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais fontes de selênio utilizadas na indústria PetFood

Fontes de Se	% de Se	Referência
Selenito de Sódio (Se^{+4})	45,6	NRC (2006); HILL e ALDRICH (2003)
Selenato de Sódio Desidratado	21,4	NRC (2006)
Selenometionina	43	HILL e ALDRICH (2003)
Selênio orgânico	variável	HILL e ALDRICH (2003)

Há certas dificuldades para se estabelecer a biodisponibilidade do Se de ingredientes dos alimentos, pois não há um critério universal que quantifique esta variável. Acredita-se que o selênio de produtos de origem animal tenha menor biodisponibilidade (10-25%) do que os de origem vegetal (80%) (MATEOS et al., 2004). Porém, outros estudos indicam que o selênio de produtos de origem animal apresenta 60-90% de biodisponibilidade contra 25% de origem vegetal (HENRY e AMMERMAN, 1995).

A biodisponibilidade de selênio dos alimentos *Pet Food* suplementados com selenito de sódio, em estudos com frangos, foi em média de 20% (WEDEKIND et al., 1997). Em estudo subsequente, Wedekind et al. (1998) encontraram que a biodisponibilidade de Se foi de 27% para produtos de origem animal, 47% para produtos de origem vegetal, 30% para rações enlatadas e 53% para rações extrusadas. Estes valores são menores do que aqueles encontrados por Wen et al. (1995), usando ratos como modelos para fontes de origem animal (NRC, 2006).

As fontes orgânicas possuem maior biodisponibilidade de selênio, pois podem ser estocadas no organismo (TODD e HENDRIKS, 2005). Wang e Lovell (1997) encontraram valores de biodisponibilidade muito altos para fontes orgânicas, sendo a biodisponibilidade destas fontes 2 a 3 vezes maior do que a do selenito de sódio. A concentração de selênio nos tecidos, principalmente músculos é maior quando os animais são alimentados com fontes orgânicas do que quando alimentados com fontes inorgânicas. Porém, a atividade da GSH-Px parece não se alterar quando se compara os dois tipos de fontes (WHANGER e BUTLER, 1988).

A biodisponibilidade do selênio é afetada por vários fatores, podendo-se citar as formas (selenito, selenometionina e selenocisteína, entre outros), a espécie animal e o tipo de alimento que contém o selênio (YU et al., 2006). Outros fatores que afetam a biodisponibilidade são: o estado fisiológico, a nutrição prévia, o critério utilizado para avaliação e a solubilidade da fonte testada (MATEOS et al., 2004).

Além das diferenças entre as fontes de selênio, há ainda, a interação com determinados minerais e aminoácidos, como enxofre e metionina, os diferentes processamentos pelos quais passam as matérias-primas e o processamento (extrusão) do alimento final que podem modificar a biodisponibilidade deste mineral (TODD et al., 2006).

Interações metabólicas ocorrem entre o selênio e íons metálicos, como o ferro, cobre, zinco, cádmio, mercúrio, prata, arsênico e outros. O selênio pode ser usado para diminuir os efeitos tóxicos de íons metálicos; são poucas as informações sobre a interferência desses minerais na biodisponibilidade do selênio, porém, sabe-se que o cobre diminui a atividade da GSH-Px no sangue, fígado, rins e testículos (HENRY e AMMERMAN, 1995).

2.5. Importância do selênio na nutrição de cães

Em células de mamíferos, a primeira linha de defesa antioxidante é o sistema de enzimas superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e a catalase. A importância da enzima dependente de selênio, a GSH-Px, tem recebido muita atenção, e recentemente, o papel do selênio neste e em outros aspectos da nutrição tem atraído consideráveis pesquisas (MAHAN, 1999). O Selênio é componente essencial da enzima GSH-Px (ROTRUCK et al., 1973) e o nível de atividade desta enzima no fígado ou sangue total são indicativos do suprimento de selênio do organismo. A GSH-Px protege as membranas celulares dos radicais livres e outros danos oxidativos, desativando a formação de peróxidos durante a oxidação dos lipídeos da membrana celular. O sítio ativo da GSH-Px contém selenocisteína, um aminoácido raro no qual o átomo de enxofre da cisteína foi substituído pelo átomo de selênio (MCDOWELL, 1992). De fato, o selênio é o único micro mineral a ser especificado no código genético como Selenocisteína e é agora reconhecido como o 21º aminoácido (RAYMAN, 2002, citado por MATEOS, 2004).

Outra função importante do selênio é na produção e regulação do nível de atividade dos hormônios da tireóide. O selênio, na forma de selenocisteína, é componente das iodotironina-deiodinases, enzimas responsáveis pela ativação dos hormônios da tireóide (NRC, 2006). Estas deiodinases convertem a tiroxina (T4) em

triiodotironina (T3), a forma ativa do hormônio tireoideano. Esta conversão ocorre, em sua maior parte, nos tecidos periféricos, incluindo o fígado e rins (SURAI, 2002).

Há relação entre a presença de hormônios tireoideanos e a concentração de selênio sobre a taxa de crescimento do pêlo, textura e pigmentação da pele. A concentração de selênio na dieta afeta o crescimento do pêlo em cães da raça Beagle, em que tanto as baixas concentrações quanto as altas concentrações reduziram a taxa de crescimento do pêlo. A concentração dietética ótima para o crescimento do pêlo em Beagles adultos saudáveis varia de 0,12 a 1,03 mg/kg (YU et al., 2006).

O selênio atua ainda em diversas outras selenoproteínas de mamíferos, algumas com atividades enzimáticas (redox) e outras com propriedades estruturais e de transporte (MCKENZIE et al., 2002, citado por MATEOS et al., 2004). Algumas destas selenoproteínas estão descritas no Quadro 1.

Quadro1: Selenoproteínas de Mamíferos

Glutationa peroxidase GSH-Px (citossólica, cGSH-Px) GSH-Px (gastrointestinal, GI-GSH-Px) GSH-Px (extracelular ou plasma, pGSH-Px) GSH-Px (<i>phospholipid hydroperoxide</i> , PHGSH-Px)	Selenofosfato sintetase-2
Iodotironina deiodinases Tipo I (fígado, rins, tireóide) Tipo II (cérebro) Tipo III (inativada)	Funções não determinadas Selenoproteína P Selenoproteína P12 Selenoproteína W Selenoproteína R Selenoproteína T Selenoproteína X Selenoproteína N
Tioredoxina redutases Tioredoxina redutase (TrX) Tioredoxina redutase Mitocondrial	15-kDa selenoproteína das T células

Adaptado de Köhrle et al. (2000), citados por Jacques (2001).

Juntamente com a vitamina E, o selênio é necessário para o correto funcionamento do sistema imune do animal. O efeito imunomodulatório deste mineral

ocorre por três mecanismos: 1) efeitos antiinflamatórios; 2) sistema antioxidante; e 3) propriedades citostáticas e anticancerígena. Doses suplementares de selênio melhoram a resposta imunológica e protegem contra certas infecções virais conferindo adicionais benefícios à saúde (MCKENZIE et al., 2002 citado por MATEOS et al., 2004); sua deficiência pode afetar tanto a imunidade natural quanto a imunidade adquirida (SURAI, 2003).

O selênio também atua na manutenção normal do sistema reprodutivo, estudos mostram que a infertilidade em machos está associada com o estresse oxidativo. O sistema antioxidante é muito importante para manter a integridade da membrana espermática e suas propriedades fisiológicas necessárias para o sucesso da fertilização e motilidade dos espermatozoides. Os espermatozoides possuem membranas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, que as tornam fluidas e flexíveis; mais uma vez faz-se presente a GSH-Px, que atua também nos testículos fornecendo a defesa antioxidante e o suporte estrutural específico. O selênio orgânico é mais eficiente em melhorar a morfologia espermática do que as fontes inorgânicas (SURAI, 2002; SURAI, 2003).

O selênio também protege o organismo contra a intoxicação por substâncias potencialmente tóxicas, como cádmio, prata, chumbo e mercúrio, e tem recebido muita atenção, pois possui propriedades anticancerígenas, atuando na prevenção do câncer. O aumento de quantidades de selênio pode ser indicado em rações para cães idosos, já que o câncer é uma das primeiras causas de morte nessa faixa etária (HILL e ALDRICH, 2003).

2.5.1. Selênio e o sistema antioxidante

O sistema antioxidante protege o organismo da formação de radicais livres; essa proteção ocorre por meio de antioxidantes presentes por todo o corpo. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou impede significativamente a oxidação do mesmo de maneira eficaz (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIES e STAHL, 1995).

Os antioxidantes podem ser de origem endógena, quando produzidos no próprio organismo e dividem-se em enzimáticos (glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase) e não enzimáticos (glutathione, peptídeos de histidina, ubiquinona, bilerrubina e

outros), ou podem ser de origem exógena como no caso das vitaminas C e E, β -carotenos, flavonóides, curcumina, polifenóis, tanino, entre outros, e são obtidos por meio da alimentação. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células.

Os radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados, por esta razão são moléculas muito instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente muito reativas (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997). Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Algumas situações geradoras de radicais livres incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por micro-organismos, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante (BENZI, 1993; PEREIRA, 1994; YU, 1994).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são exemplos de radicais livres e podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição ao álcool, fumo, drogas, raios ultravioleta, estilo de vida, entre outros. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$), alcóxila ($\text{RO}^\bullet$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$) e os não-radicalares: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (JORDÃO et al., 1998; HALLIWELL, 1992). Para se defender destas espécies reativas de oxigênio, as células aeróbicas desenvolveram vários mecanismos de defesa.

O primeiro mecanismo de defesa é formado pelas enzimas antioxidantes superóxido desmutase, catalase e a enzima glutathione peroxidase; esta última, como já citada anteriormente, é dependente de selênio e atua por todo o organismo. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (COHEN e HOCHSTEIN, 1963; MEISTER e ANDERSON, 1983).

O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila. Este último é, entre as EROs, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas espécies reativas de oxigênio para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e, a consequência disto, é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA e das proteínas (DURAN e CADENAS, 1987).

A GSH-Px funciona convertendo a glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e formando água: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{ação GSH-Px} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Além disso, a GSH-Px converte lipoperóxidos em álcool e outras substâncias inertes: $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ação GSH-Px} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$ (SURAI, 2006).

Existem seis tipos de GSH-Px e todas com ação antioxidante. A GSH-Px 1 é encontrada no citosol de todas as células do corpo e, além de sua função antioxidante, parece ser uma forma de armazenar selênio no organismo. A GSH-Px 2 ou gastrointestinal é específica do trato gastrointestinal e a GSH-Px 3 ou plasmática ou extracelular é encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos. A GSH-Px 4 que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (RAYMAN, 2000). A GSH-Px 4 também é conhecida como *fosfolipídeo hidroperóxido glutathiona peroxidase* (PHGSH-Px) e promove a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (LEHMANN et al., 1998). As funções das GSH-Px 5 e 6 ainda são pouco estudadas, porém também atuam no sistema antioxidante (BECKETT e ARTHUR, 2005).

Com função antioxidante o selênio é também componente essencial das selenoproteínas P e W. A selenoproteína P além de função antioxidante tem a função de transportar o selênio até o fígado e é a selenoproteína mais abundante no plasma sanguíneo (BURK et al., 2003). A selenoproteína W possui ação antioxidante e é encontrada nos músculos cardíacos e esqueléticos (BECKETT e ARTHUR, 2005).

O selênio age no sistema antioxidante sendo componente das selenoproteínas e atua indiretamente ou diretamente evitando o estresse oxidativo. O selênio pode atuar ainda, economizando a vitamina E, esta tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas.

Ebeid (2009) avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de selênio orgânico (0-controle, 0,1ppm, 0,2ppm e 0,3ppm de seleno levedura) no status antioxidante de galos sob condições de estresse térmico. Os animais que receberam dietas suplementadas com 0,3 ppm de Se apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostrando que a suplementação com selênio levedura melhorou o status antioxidante dos animais.

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é mecanismo de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que, muitas vezes, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL et al., 1997).

2.5.2. Selênio e o sistema reprodutor

A seleção racial e a criação comercial de cães vêm sendo cada vez mais aperfeiçoadas pelos criadores no Brasil e no mundo, exigindo assim, maior eficiência do sistema reprodutor. O uso limitado do sêmen congelado na espécie canina faz com que empresas de nutrição animal busquem novos mercados no setor *Pet Food*; um desses mercados é a produção de alimentos para animais reprodutores. Para que estas rações sejam eficientes é necessário conhecer e entender quais nutrientes e/ou ingredientes são importantes para o adequado funcionamento deste sistema.

O selênio demonstrou ser, entre todos os minerais indicados como essenciais um dos elementos mais importantes quando se trata de reprodução. Os antioxidantes são importantes para manter a mitocôndria intacta. Esta organela está localizada na peça intermediária do espermatozóide e é responsável pela motilidade e também pela maior flexibilidade da membrana e fluidez. Para que realize estas propriedades, a mitocôndria necessita altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados. Entretanto, níveis altos destes ácidos tornam a célula mais vulnerável à oxidação e à produção de radicais livres (SURAI, 2002).

A enzima glutathiona peroxidase também está presente no sistema reprodutor, primeiro por sua ação antioxidante, pois durante a formação e maturação espermática é vital para proteção da membrana lipídica dos espermatozóides, para que não sofram peroxidação pelos radicais livres, que causa ruptura da membrana e morte do espermatozóide. Uma segunda função desta enzima no sistema reprodutor, é a sua função estrutural, por meio da selenoproteína glutathiona peroxidase hidróperóxido fosfolipídica (PH-GSH-Px) que, além de sua ação antioxidante, é estrutura fixa da peça intermediária dos espermatozóides, estando presente na membrana e nas mitocôndrias, além de estar presente também na cabeça do espermatozóide (SURAI, 2006). Quando há deficiência de selênio, há menor síntese de PH-GSH-Px e, como consequência, a gametogênese do macho fica comprometida e os espermatozóides apresentam diversos problemas morfológicos como cabeça e caudas livres, deformações na cabeça e peça intermediária inclusive com ruptura estrutural, diminuição do número de espermatozóides por ejaculado (oligozoospermia) e aumento na morte de espermatozóides (ALVIM e SOUZA, 2005).

O selênio é necessário para o desenvolvimento testicular e espermatogênese em várias espécies animais (COMBS e COMBS, 1986; BEHNE et al., 1996; SURAI et al., 2001). As enzimas selenodeiodinases (Tipo I, II e III iodotironina deiodinases) controlam o metabolismo dos hormônios da tireóide, essenciais para o desenvolvimento normal e funcionalidade dos testículos em ratos (SURAI, 2006).

Uma dieta deficiente em selênio acarreta em diminuição no número de espermatozóides normais por ejaculado e diminui a motilidade e a capacidade de fertilização (BEHNE et al., 1982). Trabalhos com touros mostram que o selênio se concentra nos testículos e epidídimo e neles exerce importantes funções metabólicas, como um antioxidante, atuando na formação dos espermatozóides e na maturação espermática (ALONSO et al., 1997), confirmando as ações do selênio.

Em aves a inclusão de selênio na dieta aumentou a atividade da glutathiona peroxidase no fígado, espermatozóides e plasma seminal (SURAI et al., 1998). Em experimento onde galos foram submetidos a dietas contendo 0,28 ppm de selênio (controle), suplementadas com selenito de sódio ou seleno levedura (0,2 ppm), os animais suplementados com seleno levedura apresentaram sêmen de melhor qualidade, com menor número de anormalidades espermáticas, seguidas pelos suplementados com

selenito de sódio e os não suplementados (EDENS, 2004). Os autores concluíram que o seleno levedura foi a forma mais efetiva de suplementação de selênio para manutenção da integridade dos espermatozóides.

Ebeid (2009) avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de selênio orgânico (0-controle, 0,1ppm, 0,2ppm e 0,3ppm de seleno levedura) no status antioxidante e na qualidade seminal de galos sob condições de estresse térmico. Os animais suplementados com 0,3 ppm de Se apresentaram aumento no número de espermatozóides e melhora na motilidade, além de apresentarem diminuição nos níveis de TBARS e melhora na atividade da glutathione peroxidase, mostrando que a suplementação com seleno levedura melhorou o status antioxidante dos animais.

A associação entre selênio e vitamina E na nutrição animal é bem conhecida, especialmente nas suas funções sinérgicas como antioxidantes. A vitamina E tem efeito direto sobre o espermatozóide, protegendo-o contra danos oxidativos e também ajudando a melhorar a motilidade espermática e a capacidade de fertilização. Marin-Guzman et al. (1997) demonstraram a importância da suplementação do selênio na fertilidade de suínos. Machos foram alimentados com dietas contendo 0 ou 0,5 ppm de Se e/ou 0 ou 200 UI de vitamina E/kg para avaliar os efeitos sobre a qualidade do sêmen. Os espermatozóides dos animais alimentados com 0,5 ppm de selênio tiveram maior motilidade do que aqueles com 200 UI de vitamina E/kg. Houve, também, menor número de espermatozóides anormais e a eficiência da fertilização dos machos suplementados com selênio foi maior. Esses resultados sugerem que tanto o selênio como a vitamina E são importantes nutrientes para aumentar a fertilidade de reprodutores. O selênio age na espermatogênese e na manutenção da qualidade do sêmen, enquanto a vitamina E funciona primariamente como antioxidante.

2.6. Suplementação de selênio nos alimentos para cães

A forma mais antiga de suplementação de selênio é por meio das formas inorgânicas, onde há grandes riscos de intoxicação, interações negativas, efeitos pró-oxidantes e baixa eficiência de transferência para os tecidos. Em contraste, as formas orgânicas contribuem para o sistema antioxidante, tem baixa toxicidade e alta biodisponibilidade com a habilidade de aumentar as reservas de selênio nos tecidos comparado às fontes inorgânicas (SURAI, 2002).

Muitas publicações demonstram as diferenças na biodisponibilidade do selênio em diferentes matérias-primas, contudo, há poucas publicações comparando fontes orgânicas e inorgânicas.

O conhecimento do valor nutritivo dos alimentos associado ao conhecimento das necessidades nutricionais são indispensáveis para formulação de rações balanceadas e são fundamentais para os estudos de nutrição animal. Conhecimentos básicos sobre aproveitamento e biodisponibilidade são necessários para que nutricionistas possam ter em mãos informações precisas a respeito dos ingredientes em uso. Entretanto, poucas informações existem a respeito do valor nutritivo dos ingredientes para cães e gatos e, a grande parte dos trabalhos científicos avalia o efeito do ingrediente na dieta, não considerando a digestibilidade do ingrediente em si, de modo que informações primordiais à formulação adequada de dietas para animais de estimação não vem sendo estudadas.

Uma vez que o selênio possui tantas funções que melhoram a saúde e longevidade dos animais de estimação, torna-se necessário conhecer e entender sobre as fontes de selênio que são usadas na formulação de rações *Pet* e seus efeitos no organismo, podendo talvez alcançar um aproveitamento ótimo deste mineral, tanto pelo animal quanto pela indústria.

O capítulo 2, denominado **“BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES”** apresenta-se de acordo com as normas para publicação no Journal of Animal Science. Os objetivos do trabalho foram comparar a biodisponibilidade de duas fontes de selênio (selenito de sódio e selênio levedura), normalmente utilizadas nas rações de cães e gatos, e seus efeitos no status antioxidante de cães.

O capítulo 3, denominado **“FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS E NO STATUS ANTIOXIDANTE DO SÊMEN DE CÃES”** apresenta-se de acordo com as normas para publicação no Journal of Animal Science. Os objetivos do trabalho foram comparar os efeitos de duas fontes de selênio (selenito de sódio e selênio levedura), normalmente utilizadas nas rações de cães e gatos, nas características seminais e no status antioxidante do plasma seminal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M. L.; MIRANDA, M.; HERNANDEZ, J.; CASTILLO, C.; BENEDITO, J. L. Glutathione peroxidase (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de Selenio en rumiantes. **Archives Medical Veterinary**, v.29, p.2-6, 1997.
- ALVIM, F.; SOUZA, G.M. De. Influência dos principais micro minerais na reprodução de bovinos (Parte final). 2005. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1006>. Acesso em: 12 fev. 2010.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. **Dog and cat food substantiation methods**, Ottawa, p. 444, 2004.
- BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and Endocrine Systems. **Journal of Endocrinology**, v.184, p.455-465, 2005.
- BEHNE, D.; HOFER, T; BERSWORDT-WALLRABE, R.V.; ELGER, W. Selenium in the Testis of the Rat: Studies on Its Regulation and Its Importance for the Organism. **Journal of Nutrition**, v.112, p.1682-1687, 1982.
- BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p.291-297, 1996.
- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free radicals. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.33, p.205-222, 1993.
- BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BURK, R.F., HILL, K.E.; MOTLEY, A.K. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1517S-1520S, 2003.
- CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. Minerais. In: CASE, L.P.; CAREY, D.P. (Eds.) **Nutrição canina e felina: manual para profissionais**. Madrid: Harcourt Brace, 1998. Cap. 6, p. 17-20.

- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, p.1420-1428, 1963.
- COMBS, G.F., JR.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. Orlando: Academic Press, 1986. 180p.
- DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v.43, n.2, p.460-472, 1983.
- DURAN, N.; CADENAS, E. The role of singlet oxygen and triplet carbonyls in biological systems. **Research on Chemical Intermediates**, v. 8, p.147-187, 1987.
- EBEID, T.A. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**, v. 50, n.5, p. 641-647, 2009.
- EDENS, F.W. Efeito da suplementação de selênio orgânico (Sel-Plex) sobre a integridade dos espermatozoides em frangos de corte machos. In: RONDA LATINOAMERICANA DA ALLTECH, 14.; SIMPÓSIO DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS ANIMAL, 2004. **Resumos...** Lexington, Kentucky: ALLTECH, 2004. p.54
- EISLER, R. Selenium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. **Fish and Wildlife Service Biological Report**, v.85, p.5-57, 1985.
- FRANKENBERGER, W.T. JR.; BENSON, S. **Selenium in the environment**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1994. 456p.
- GANTHER, H.E.; LAWRENCE, J.R. Chemical transformations of selenium in living organisms. improved forms of selenium for cancer prevention. **Tetrahedron**, v. 53, n. 36, p. 12299-12310, 1997.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2ed. Oxford: University Press, 1989. 543p.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, n.6, p. 598-620, 1992.

- HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Selenium Bioavailability. In: AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. (Eds.). **Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins**. San Diego: ACADEMIC PRESS, 1995. p. 303-336.
- HILL, D.A.; ALDRICH, G. Essentials of mineral nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. (Eds.). **Pet Food Technology**. Mt. Morris, IL: Watt Publishing Co., 2003. p.121-128.
- JACQUES, K.A. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Eds) **Science and Technology in the Feed Industry**. 2001. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p.319-348.
- JORDÃO JR, A.A., CHIARELLO, P.G., BERNARDES, M.S.M.; VANNUCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v.31, p. 434-449, 1998.
- LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F.W. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 455, p.259-263, 1998.
- LEVANDER, O. Selenium. In: Mertz, W. (Ed.). **Trace elements in human and animal nutrition**. 5ed. Orlando: Academic Press, 1986. p. 209-279.
- LYONS, M.P.; PAPAZYAN, T.T.; SURAI, P.F. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 20, n.7, p.1135-1155, 2007.
- MAHAN, L.J. Organic selenium: using nature's model to redefining selenium supplementation for animals. In: LYONS, T.P AND JACQUES, K.A (Eds). **Biotechnology in the Feed Industr. Proceeding...** Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p.523-536
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2994-3003, 1997.

- MARKHAM, G.D.; HAFNER, E.W.; TABOR, C.W.; TABOR, H. S-adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 9082-9092, 1980.
- MATEOS, G.G.; LAZARO, R.; ASTILLERO, J.R.; SERRANO, M.P. Trace minerals: what text books don't tell you. In: JA TAYLOR-PICKARD AND LA TUCKER (eds). **Re-defining Mineral Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2004. p. 21-61.
- MCDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. London: Academic Press, 1992. 524p.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- NAKAMURO, K.; OKUNO, T.; HASEGAWA, T.. Metabolism of selenoamino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity. **Journal of Health Science**, v. 46, n. 6, p. 418-421, 2000.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy, 2006. 398p.
- PEHRSON, B.G. Countering selenium deficiency. **Feed International**. 1993.
- PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 8, p.77-89, 1994.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.
- ROTRUCKJ, T.; POPEA, L.; GANTHERH, E.; SWANSONA, B.; HAFEMAND, G.; HOEKSTRAW, G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p. 588-590, 1973.
- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v.79, p. 3292-3293, 1957.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SIMCOCK, S.E.; RUTHERFURD, S.M.; HENDRIKS, W.H. The role of selenium in companion animal health and nutrition. In: LYONS, T.P AND JACQUES, K.A

- (Eds) Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries.2002. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2002. p.511-520.
- SIMCOCK, S.E.; RUTHERFURD, S.M.; WESTER, T.J.; HENDRIKS, W.H. Total selenium concentrations in canine and feline foods commercially available in New Zeland. **New Zeland Veterinary Journal**, v.53, n.1, p.1-5, 2005.
- SURAI, P.F.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J.P.; WISHART, G.J.; CEROLINE, S.; SPARKS, N.H.C. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidante activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 527-533, 1998.
- SURAI, P. F.; FUJIHARA, N.; SPEAKE, B. K.; BRILLARD, J.P.; WISHART, G.J.; SPARKS, N.H.C. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. **Journal. Animal Science**, v. 14, p.1024-1050, 2001.
- SURAI, P.F. **Selenium in nutrition and health**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. 974p.
- SURAI, P.F. Selenium. In: **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 233-304.
- SURAI, P.F. Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2?. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A (Eds) Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries.2003. **Proceedings...** Nottingham University, UK, 2003. p.59-76
- TODD, S.E.; HENDRIKS, W.H. Comparative selenium metabolism in cats and dogs. In: LYONS, T.P AND JACQUES, K.A (Eds). Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries. 2005. **Proceedings**. Nottingham University Press , 2005. p 389-397.
- TODD, S.E.; THOMAS. D.; TUCKER, L. Selenium requirements in cats and dogs. In: D-K LAUE AND LA TUCKER (Eds). **Recent Advances in Pet Nutrition**. NottinghamUniversity Press, 2006. p. 79-89.
- VAN VLEET, J.F. Experimentally induced vitamin E-selenium deficiency in the growing dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.166, n. 8, p.769-774. 1975.
- WANG, C.; LOVELL, R.T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium

- selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 152, n.1-4, p. 223-234, 1997.
- WEDEKIND, K.J., BEVER, R.S.; COMBS. G.F. Is selenium addition necessary in petfoods? **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.12, p.823-5, 1998.
- WEDEKIND, K.J., COWELL, C.; COMBS. G.F. Bioavailability of selenium in petfood ingredients. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, p.360-9, 1997.
- WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v.23, n.4, p.209- 240, 1997.
- WEN, H.; SHI, B.; SPALLHOZ, J. Selenium bioavailability from meats, poultry, seafoods, bread and mushrooms in rats. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, p.159, 1995.
- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **Journal of Nutrition**, v.118, p.846-852, 1988.
- WOLFFRAM, S. Absorption and metabolism of selenium: difference between organic and inorganic sources. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Eds.). *Biotechnology in the Feed Industry*, ed. Nottingham: Nottingham University Press, **Proceedings...**, v.15, p.547-566, 1999.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-161, 1994.
- YU, S.; WEDEKIND, K.J.; KIRK, C.A.; NACHREINER, R.F. Primary hair growth in dogs depends on dietary selenium concentration. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.90, p.137-151, 2006.
- YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

CAPÍTULO 2

BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES

BIODISPONIBILIDADE E FUNÇÕES ANTIOXIDANTES DE FONTES DE SELÊNIO EM DIETAS PARA CÃES

RESUMO O objetivo do trabalho foi comparar a biodisponibilidade e os efeitos antioxidantes de fontes de selênio na forma orgânica e inorgânica em dietas para cães. Foram utilizados 24 cães machos da raça Beagle distribuídos em três tratamentos: controle (TC-0,11 ppm de Se), inorgânico (TI-0,30 ppm de Se na forma de selenito de sódio) e orgânico (TO-0,30 ppm de Se na forma de seleno levedura). O experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados com medidas repetidas no tempo, os animais foram blocados por idade. Os animais foram mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas e submetidos à coleta total de fezes e urina, e mais 70 dias em baias para demais análises. Nas amostras de ração, fezes, urina e pêlos foram feitas análises de selênio. No sangue total foi determinada a atividade da GSH-Px e no 11º dia do experimento foi realizada a curva pós-prandial de absorção de selênio, até doze horas após a ingestão das dietas. O status oxidativo e a capacidade antioxidante foram avaliados no soro sanguíneo através da metodologia de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a capacidade antioxidante total (TAC), respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para as variáveis ingestão de Se, excreção de Se nas fezes e retenção de Se os animais do TC apresentaram menores valores quando comparados aos animais do TI e TO ($P \leq 0,05$). Não houve diferença para a excreção urinária e biodisponibilidade. Houve efeito de período para a concentração de selênio no plasma sanguíneo ocorrendo aumento para todos os animais. As concentrações de Se no pêlo dos animais dos grupos TI e TO foram maiores que as do TC ao final do experimento ($P \leq 0,05$). A área abaixo da curva do Se plasmático dos animais TO foi maior do que as dos demais, mostrando uma maior absorção. Os animais do TO e TI apresentaram maior atividade da GSH-Px, porém não houve diferença significativa para os valores de TBARS. Para o TAC houve efeito de período, sendo que os maiores valores ocorreram aos 80 dias de experimento. Ambas as fontes de selênio nas dosagens empregadas mostraram-se benéficas nos parâmetros avaliados em relação a concentração mínima recomendada pela AAFCO em alimentos para cães.

Palavras-chave: selênio, disponibilidade, GSH-Px, antioxidante, TBARS, cães

BIOAVAILABILITY OF SELENIUM SOURCES AND THEIR ANTIOXIDANTS FUNCTION IN DIETS TO DOGS

ABSTRACT The aim of this study was to compare the bioavailability of organic and inorganic selenium sources and their antioxidants functions in diets to dogs. Twenty-four male dogs were used and distributed in three treatments: control (TC-0,11 ppm of Se), inorganic (TI-0,30 ppm of sodium selenito) and organic (TO-0,30 ppm of Sel-Plex®). The experimental design was in a randomized blocks, the blocking factor was age. The experimental period was 80 days, the selenium balance trial was conducted at the first 10 days then the animals were transferred to kennels and the experiment lasted more 70 days. Feces, hair, urine, blood plasma and food were analyzed for selenium concentrations. The GSH-Px was determined in whole blood and at the 11th day a curve of selenium plasmatic absorption was conducted, the samples of blood plasma were obtained each 2 hours after feeding per 12 hours. The methodologies to access oxidative stress and antioxidant capacity were TBARS and total antioxidant capacity, respectively. The results were performed by analysis of variance and the means were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). For Se intake, fecal excretion of Se and Se retention, dogs from TC group showed lower values then TI and TO animals. There were no difference for urinary excretion of Se and Se bioavailability. For Se concentration in blood plasma the animals showed a higher value within 80 days even for animals from TC group. The concentration of selenium in hair increased within 80 days for animals from the TI and TO group. TO group had the major area under the curve differing statistically from the others groups showing a better absorption. The supplemented groups had the better values for GSH-Px activity. However, there were no significant differences among treatments for TBARS. For TAC there were no differences among the treatments, but during the experimental time the TAC values increased. The results from these studies suggest that both organic and inorganic selenium sources may be used for pet nutrition with similar efficiency.

Keywords: selenium, availability, GSH-Px, antioxidant, TBARS, canine

INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento traço essencial à saúde dos animais e seres humanos. É componente da enzima glutathiona peroxidase e atua ativamente no sistema antioxidante. Este mineral participa, também, de outras metaloenzimas com funções antioxidantes como as selenoproteínas P e W, atua no sistema imune, é responsável pela ativação dos hormônios da tireóide, possui ação anticarcinogênica e age no sistema reprodutivo (SURAI, 2006).

O selênio (Se) é um mineral amplamente distribuído nos tecidos animais, ainda que presente em pequenas quantidades em alguns órgãos ou tecidos (NRC, 2006). As quantidades de selênio nos ingredientes dos alimentos para cães e gatos podem variar muito; as concentrações deste mineral nos vegetais dependem da região geográfica e da concentração de Se no solo (NRC, 2006; SURAI, 2002). Já nos tecidos animais sua concentração depende dos níveis de selênio da dieta (TODD e HENDRIKS, 2005). Devido a esta grande variabilidade da concentração de selênio nos ingredientes, os alimentos para cães e gatos são frequentemente suplementados.

A forma mais antiga de suplementação de selênio é por meio das formas inorgânicas, onde há grandes riscos de intoxicação, interações negativas, efeitos pró-oxidantes e baixa eficiência de transferência para os tecidos (THOMSON, 1998). Em contraste, as formas orgânicas contribuem para o sistema antioxidante, tem baixa toxicidade e alta biodisponibilidade com a habilidade de aumentar as reservas de selênio nos tecidos comparado às fontes inorgânicas (SURAI, 2002).

Uma vez que o selênio possui tantas funções que melhoram a saúde e longevidade dos animais, torna-se necessário conhecer e entender sobre as fontes de selênio usadas na formulação de rações *Pet* e seus efeitos no organismo, buscando alcançar um aproveitamento ótimo deste mineral pelo animal. Os objetivos do trabalho foram os de avaliar a biodisponibilidade de duas fontes de selênio (selenito de sódio e seleno levedura) e avaliar seus efeitos no sistema antioxidante de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, sob o protocolo de número 82/2008-CEUA, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Local e animais

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Foram utilizados vinte e quatro cães adultos da raça Beagle, machos, em manutenção, com idades entre um e dez anos, em boas condições corporais, clinicamente sadios, desverminados e vacinados. O experimento seguiu um delineamento em blocos completos casualizados com medidas repetidas no tempo. Os animais foram blocados por idade.

Dietas

As rações experimentais diferenciaram-se apenas pela inclusão das fontes de selênio avaliadas (selenito de sódio e Sel-Plex®). As dietas foram formuladas para que seus níveis nutricionais e suplementação vitamínico-mineral atendessem as recomendações nutricionais para cães em manutenção da Association of American Feed Control Official (AAFCO, 2004), com exceção dos teores de selênio. Na Tabela 1 estão mostradas as porcentagens de inclusão dos ingredientes em cada ração e suas respectivas composições bromatológicas.

Os animais foram submetidos a três tratamentos: tratamento controle, sem adição de selênio (todo o selênio proveniente dos ingredientes); tratamento inorgânico, controle + selenito de sódio, como fonte inorgânica; e tratamento orgânico, controle + Sel-Plex® (Alltech, Inc., EUA), como fonte orgânica. Os valores analisados de selênio nas fontes utilizadas foram: Selenito de sódio com 448,0 mg de selênio por grama do produto e Sel-Plex® com 1138,7 mg de selênio por quilograma do produto.

A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). As quantidades foram fornecidas para que os animais mantivessem o escore corporal ideal (EC ideal = 5). Os animais foram pesados semanalmente e a quantidade de ração ajustada caso ocorresse aumento ou redução de peso. O alimento foi oferecido duas vezes ao dia, sempre nos mesmos horários, e a água foi fornecida à vontade.

Tabela 1. Inclusão dos ingredientes nas rações e composição bromatológica analisada.

Ingrediente	% Inclusão		
	Controle	Inorgânico	Orgânico
Milho, grão	49,40	49,40	49,40
Farelo de soja, 45%	19,95	19,95	19,95
Protenose, 60%	17,94	17,94	17,94
Óleo de vísceras de aves	7,50	7,50	7,50
Óleo de peixe	2,00	2,00	2,00
Fosfato bicálcico	1,35	1,35	1,35
Calcário calcítico	0,59	0,59	0,59
Sal comum (NaCl)	0,40	0,40	0,40
Cloreto de potássio	0,30	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15
Antifúngico ¹	0,10	0,10	0,10
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01
L-Lisina	0,002	0,002	0,002
Suplemento mineral ³	0,1	0,1	0,1
Suplemento vitamínico ⁴	0,2	0,2	0,2
Selenito de sódio (g) ⁵	-	0,3	-
Selênio levedura (g) ⁶	-	-	135
Composição bromatológica analisada			
Matéria Seca (%)	93,73	92,85	93,62
	Valores expressos em 100% de matéria seca		
Proteína bruta (%)	26,12	26,79	25,87
Extrato etéreo ácido (%)	12,22	12,38	12,06
Energia metabolizável (kcal/kg) ⁷	3.578	3.578	3.578
Concentração de selênio (ppm)	0,11	0,30	0,30

¹ Mold-Zap AS, Alltech, Inc., EUA

² Antiox-RC, Alltech, Inc., EUA

³ Adição por quilograma de dieta: Ferro 150 mg, Cobre 15 mg, Manganês 7 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg.

⁴ Adição por quilograma de dieta: Vit A 15000 UI, Vit D 1000 UI, Vit. E 35 UI, Tiamina 4 mg, Riboflavina 5 mg, Ácido pantotênico 20 mg, Niacina 30 mg, Piridoxina 4 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,04 mg e Colina 1500 mg.

⁵ Selenito de sódio com 448,0 mg de selênio por grama do produto.

⁶ Sel-Plex® (Alltech, Inc., EUA) com 1138,7 mg de selênio por quilograma do produto.

⁷ Valores calculados (NRC, 2006).

Adaptação

Uma ração comercial foi fornecida aos animais por oito semanas antes da introdução das rações experimentais. Esta ração teve como função igualar a condição nutricional dos animais e continha 0,10 ppm de selênio. A fonte de selênio desta ração era o selenito de sódio. O peso dos animais e a ingestão de alimento também foi controlada por todo período de adaptação.

Período experimental e análises

O experimento teve duração de oitenta dias. Nos primeiros dez dias os cães foram alojados em gaiolas metabólicas individuais em aço inoxidável, com dimensões de 90 cm x 80 cm x 90 cm, equipadas com aparato para coleta separada de fezes e urina para realização do ensaio de biodisponibilidade por coleta total, segundo protocolo da AAFCO (2004). No 11º dia os cães foram transferidos para baias cimentadas de 6 m² distribuídos em área coberta e solário onde permaneceram até o fim do experimento.

Ensaio de Biodisponibilidade do Selênio

O ensaio de biodisponibilidade do selênio contou com dois períodos, a adaptação (1º ao 5º dia), onde os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para adaptação à dieta e às gaiolas, e o período de coleta total - CT (6º ao 10º dia), quando foram colhidas fezes e urina. O consumo alimentar foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição.

As fezes foram colhidas integralmente duas vezes ao dia, às 08h00 e 17h00, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. A urina foi recolhida duas vezes ao dia, em recipientes plásticos colocados sob o funil coletor da gaiola, contendo um mililitro de ácido sulfúrico 1N para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. Logo após a colheita foi mensurado o volume de urina produzida, que posteriormente foi armazenada em garrafa plástica identificada e mantida em freezer (-15°C) até realização das análises laboratoriais.

As amostras de fezes de cada cão foram descongeladas e homogeneizadas originando um pool de fezes, que foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas, para promover a pré-secagem. Posteriormente, foram moídas em moinho

tipo faca, com peneira de crivos de 1 mm. As amostras de urina foram descongeladas e homogeneizadas. As fezes e urinas foram enviadas para o Laboratório de Espectrometria Atômica Aplicado do Departamento de Química e Bioquímica/UNESP-Botucatu-SP onde foram realizadas as análises de selênio. Com base nos resultados laboratoriais obtidos foram calculados os coeficientes de biodisponibilidade das fontes de selênio avaliadas. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula (CBSeap = coeficiente de biodisponibilidade aparente do selênio):

$$\text{CBSeap} = \frac{\text{Se ingerido (g)} - (\text{Se excr fezes (g)} + \text{Se excr urina (g)})}{\text{Se ingerido (g)}} \times 100$$

Curva pós-prandial de absorção plasmática de selênio:

As curvas foram realizadas nos dias 11 e 12 do experimento; foi colocado um cateter na veia cefálica de cada animal no dia anterior ao início da curva. Após o jejum de 24 horas, uma amostra de sangue (T0) foi coletada antes do fornecimento da ração; logo após esta coleta a quantidade diária total da ração foi fornecida ao animal e 30 minutos após o animal ingerir todo o alimento, foi coletada mais uma amostra de sangue (T1). Após duas horas do fornecimento da ração foi coletada terceira amostra (T2) e, a partir desse ponto a cada duas horas era feita a coleta de uma nova amostra de sangue. Os pontos foram: T0– antes do fornecimento da ração; T1– 30 min após o fornecimento da ração; T2– 2 horas após o fornecimento da ração; T3– 4 horas após o fornecimento da ração; T4– 6 horas após o fornecimento da ração; T5– 8 horas após o fornecimento da ração; T6– 10 horas após o fornecimento da ração; e T7– 12 horas após o fornecimento da ração.

Após a coleta o sangue foi transferido para o tubo de ensaio com uma gota de EDTA e o plasma separado após centrifugação durante dez minutos em 3000 rpm. As amostras foram analisadas quanto aos teores de selênio.

Determinação da quantidade de selênio: As determinações de selênio foram feitas no laboratório de Espectrometria Atômica Aplicado do Departamento de Química e Bioquímica/UNESP-Botucatu-SP utilizando a técnica de espectrometria atômica e o método por atomização em forno de grafite (SILVA et al, 2007; MORAES et al., 2009). As amostras analisadas para as concentrações de selênio foram: pêlos, fezes, urina e plasma sanguíneo. O pêlo e plasma sanguíneo foram coletados no início e no fim do experimento, como descritos a seguir.

Coleta de pêlos

No primeiro e no último dia do experimento uma área de 6 x 6 cm² foi tosada rente a pele na região dorso-lateral. O pêlo foi armazenado para a determinação da deposição de selênio. Após quinze dias da primeira coleta de pêlo, a região foi novamente tosada para que os pêlos crescessem apenas sob influência das rações dos tratamentos.

Outros parâmetros analisados no sangue e soro

Além da determinação de selênio no plasma sanguíneo, também foram realizadas análises de glutathione peroxidase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e capacidade antioxidante total. As amostras de sangue foram coletas nos dias 0, 40 e 80. Os cães foram mantidos em jejum por 12 horas e coletados aproximadamente 15 ml de sangue de cada cão, em seringas sem anticoagulantes. Tubos de ensaio e microtubos plásticos foram devidamente identificados para a separação do sangue de acordo com as análises.

Glutathione peroxidase: esta enzima foi analisada no sangue total através do kit RANSEL- Glutathione Peroxidase RS505, fabricado por RANDOX Laboratories, Reino Unido. A metodologia é baseada nos trabalhos de Paglia e Valentine (1967).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): A lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozóides foi determinada pelo método espectrofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege e Aust (1978) e Paya et al. (1992), o qual baseia-se na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malonaldeído (MDA), formando um cromógeno de coloração rósea, o qual é quantificado em comprimento de onda de 532 nm. Os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em nmol de MDA/ml mediante curva padrão de MDA realizada ao espectrofotômetro. A curva padrão utilizada para a determinação do TBARS obedeceu a equação: $[MDA] \text{ (nmol/ml)} = (Abs - 0,0369)/0,0098$ ($R^2 = 0,9979$), onde Abs é a leitura da absorbância.

A metodologia de Buege e Aust (1978) quantifica a lipoperoxidação espontânea (LE), onde a quantidade de MDA presente na amostra é medida, já a metodologia de Paya et al. (1992) quantifica a lipoperoxidação induzida ou catalisada pelo ferro (LCF),

o ferro estimula a oxidação e esta reação tem por objetivo medir todo o potencial que a amostra tem em gerar o radical.

Capacidade antioxidante total (TAC): o TAC foi determinado no soro sanguíneo. Para esta análise foi utilizado o kit SIGMA CS0709 desenvolvido para a avaliação da capacidade antioxidante dos fluidos biológicos, representando indiretamente as concentrações e interações entre os antioxidantes de baixo e alto peso molecular e enzimas. O kit fornece todo o material necessário para a análise (MILLER e RICE-EVANS, 1997; RICE-EVANS, 2000; PROTEGGENTE et al., 2002; HUANG et al., 2005).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias entre grupos e dentro dos grupos ao longo do tempo foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, com o auxílio do procedimento GLM do SAS (2002). Para as variáveis GSH-Px, TBARS e TAC o nível de significância considerado foi de 10%. A área abaixo da curva foi calculada por meio do software GraphPad Prism 5.0, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Na Tabela 2 estão os valores de ingestão de selênio, excreção fecal, excreção urinária, retenção de selênio e biodisponibilidade. Os animais do tratamento controle ingeriram menos selênio, uma vez que a ração controle não foi suplementada com fonte de selênio e o teor deste mineral era de 0,11 ppm, enquanto o teor de selênio dos demais tratamentos era de 0,30 ppm. A ingestão energética entre os grupos foi a mesma ($P>0,05$). A excreção fecal foi mínima, o que era esperado, já que a excreção de selênio ocorre principalmente pela via urinária. Os animais dos tratamentos suplementados com selênio apresentaram maior excreção fecal comparados aos animais do tratamento controle. A excreção urinária deste mineral foi semelhante entre os grupos ($P>0,05$). No entanto foi verificada maior retenção de selênio nos grupos orgânico e inorgânico em relação ao grupo controle, não havendo diferença entre os grupos que receberam fontes deste mineral ($P>0,05$).

Tabela 2. Média e erro padrão dos valores de ingestão de selênio, excreção fecal e urinária, retenção de selênio e biodisponibilidade.

Parâmetros	Tratamentos		
	Controle	Inorgânico	Orgânico
Ingestão Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	25,7 $\pm$ 0,7 ^b	60,3 $\pm$ 2,0 ^a	62,9 $\pm$ 2,6 ^a
Ingestão Se ($\mu\text{g}/\text{PM}/\text{dia}$)	4,0 $\pm$ 0,03 ^b	10,0 $\pm$ 0,1 ^a	9,9 $\pm$ 0,08 ^a
Excreção Se fezes (ng/dia)	2,0 $\pm$ 0,1 ^b	6,0 $\pm$ 0,6 ^a	6,0 $\pm$ 0,4 ^a
Excreção Se fezes (ng/PM/dia)	0,23 $\pm$ 0,01 ^b	1,0 $\pm$ 0,07 ^a	1,0 $\pm$ 0,05 ^a
Excreção Se urina ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	3,0 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4
Excreção Se urina ($\mu\text{g}/\text{PM}/\text{dia}$)	0,46 $\pm$ 0,2	0,39 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,06
Retenção Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	22,7 $\pm$ 1,2 ^b	57,9 $\pm$ 1,9 ^a	60,5 $\pm$ 2,5 ^a
Retenção Se ($\mu\text{g}/\text{PM}/\text{dia}$)	3,5 $\pm$ 0,2 ^b	9,6 $\pm$ 0,1 ^a	9,5 $\pm$ 0,1 ^a
Biodisponibilidade (%)	88,5 $\pm$ 4,3	96,1 $\pm$ 0,6	96,3 $\pm$ 0,6

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). PM = peso metabólico em kg ($\text{PM} = \text{PV}^{0,75}$, onde PV = peso vivo em kg).

Na Tabela 3 estão apresentadas as concentrações de selênio no plasma sanguíneo no início e fim do experimento. Não houve interação entre tratamento e período e nem efeito de tratamento ($P > 0,05$), apenas observou-se efeito de período ($P \leq 0,05$), sendo que a concentração de selênio no plasma sanguíneo foi maior ao final do experimento.

Tabela 3. Média e erro padrão das concentrações de selênio no plasma sanguíneo e no pêlo nos dias 0 e 80 do experimento.

	Dias de Experimento		Médias
	0	80	
Se plasma sanguíneo ($\mu\text{g}/\text{L}$)			
Controle	30,8 $\pm$ 1,1	53,3 $\pm$ 3,9	42,0 $\pm$ 3,5
Inorgânico	34,1 $\pm$ 1,9	56,1 $\pm$ 4,0	45,1 $\pm$ 3,6
Orgânico	35,5 $\pm$ 1,5	54,8 $\pm$ 1,8	45,2 $\pm$ 2,7
Médias	33,5 $\pm$ 1,0 ^b	54,7 $\pm$ 1,9 ^a	
Se pêlo (ng/kg)			
Controle	44,6 $\pm$ 1,0 ^b	53,5 $\pm$ 1,6 ^{aB}	49,1 $\pm$ 1,5
Inorgânico	45,9 $\pm$ 0,9 ^b	133,5 $\pm$ 3,8 ^{aA}	89,7 $\pm$ 11,5
Orgânico	46,1 $\pm$ 0,8 ^b	136,0 $\pm$ 2,9 ^{aA}	91,1 $\pm$ 11,7
Médias	45,5 $\pm$ 0,5	107,7 $\pm$ 8,2	

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ($P \leq 0,05$).

A concentração de selênio no pêlo também está apresentada na Tabela 3, houve efeito de tratamento, período e interação entre tratamento e período ($P \leq 0,05$). Os animais dos grupos que receberam dietas suplementadas com selênio apresentaram maior concentração de selênio no pêlo ao longo do experimento.

Na Tabela 4 podemos observar os valores da curva pós-prandial de absorção plasmática de selênio a cada 2 horas. Não houve interação de tratamento e período e

nem efeito de tratamento ($P>0,05$), apenas sendo observado o efeito de período ($P\leq 0,05$). Na Figura 1 estão mostradas as curvas pós-prandiais de absorção plasmática de selênio para cada tratamento.

Tabela 4. Médias e erro padrão das concentrações de selênio plasmático antes da alimentação e após 0, 1/2, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas da alimentação.

Tempo (h)	Se ($\mu\text{g/L}$)			Médias
	Controle	Inorgânico	Orgânico	
0	1,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1 ^H
1/2	12,1 $\pm$ 0,4	12,7 $\pm$ 0,5	12,4 $\pm$ 0,7	12,4 $\pm$ 0,3 ^G
2	21,5 $\pm$ 0,2	22,6 $\pm$ 0,7	24,5 $\pm$ 1,5	22,9 $\pm$ 0,6 ^F
4	32,3 $\pm$ 0,5	32,4 $\pm$ 0,9	34,2 $\pm$ 1,4	33,0 $\pm$ 0,6 ^E
6	42,8 $\pm$ 0,6	43,9 $\pm$ 1,0	44,1 $\pm$ 1,4	43,6 $\pm$ 0,6 ^D
8	52,9 $\pm$ 0,4	53,2 $\pm$ 0,8	55,8 $\pm$ 1,8	54,0 $\pm$ 0,7 ^C
10	62,1 $\pm$ 0,5	62,8 $\pm$ 0,7	64,2 $\pm$ 1,5	63,1 $\pm$ 0,6 ^B
12	72,4 $\pm$ 0,6	72,7 $\pm$ 0,7	74,8 $\pm$ 1,6	73,3 $\pm$ 0,6 ^A
Médias	37,2 $\pm$ 2,9	37,8 $\pm$ 2,9	39,0 $\pm$ 3,0	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

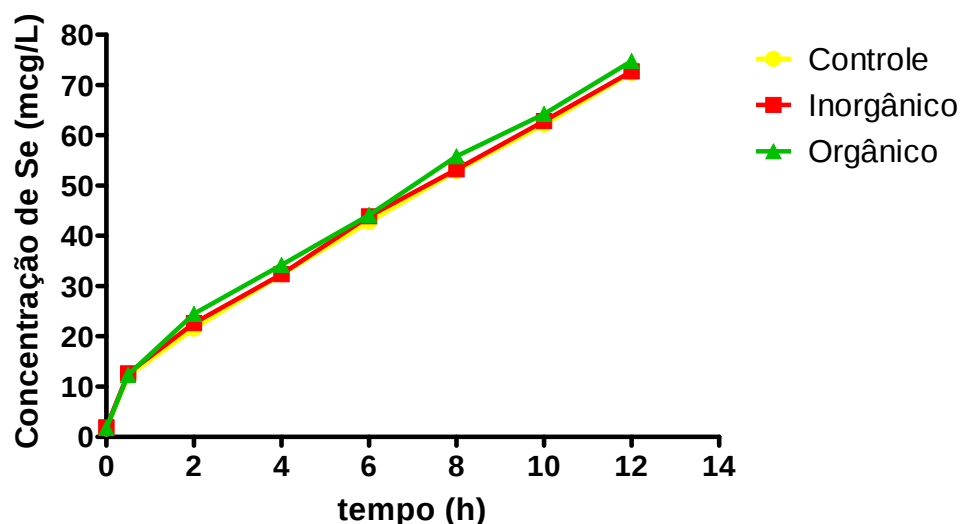


Figura 1. Concentrações plasmáticas de selênio 0, 1/2, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas após a ingestão da ração

Na Tabela 5 estão apresentados as concentrações médias e máximas da absorção de selênio durante a curva pós-prandial e área abaixo da curva. Houve diferença significativa para a área abaixo da curva ($P < 0,01$), mostrando uma maior área para o tratamento orgânico que diferiu dos demais.

Tabela 5. Concentração plasmática de selênio pós prandial média e máxima e área abaixo da curva dos grupos controle, inorgânico e orgânico.

Selênio	Tratamentos		
	Controle	Inorgânico	Orgânico
Concentração média ($\mu\text{g/L}$)	37,56	38,11	39,15
Concentração máxima ($\mu\text{g/L}$)	72,39	72,70	74,76
Área abaixo da curva	502,8 ^b	510,0 ^b	527,1 ^a
CV ¹ (%)	66,56	65,50	65,45

¹ CV = coeficiente de variação. ^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Os parâmetros de oxidação plasmáticos estão apresentados na Tabela 6. Não houve interação entre tratamento e período ($P > 0,10$), nem efeito de período ou tratamento para lipoperoxidação espontânea (TBARS LE) durante o experimento. Houve efeito de período para a lipoperoxidação catalisada pelo ferro, sendo que aos 40 dias de experimento os animais apresentaram menores concentrações de TBARS nas amostras ($P \leq 0,10$). Para lipoperoxidação catalisada pelo ferro não houve efeito de tratamento e interação entre tratamento e período ($P > 0,10$).

Quanto a capacidade antioxidante total (TAC) foi observado efeito de período ($P \leq 0,10$) para TAC, com os maiores valores observados aos 80 dias de experimento mostrando que os animais aumentaram a capacidade antioxidante. Mas não houve efeito de tratamento e interação de tratamento e período ($P > 0,10$).

Houve interação entre tratamento e período para GSH-Px ($P \leq 0,10$), a atividade da GSH-Px dos animais do tratamento orgânico e inorgânico foi superior ao do tratamento controle ($P \leq 0,10$) aos 80 dias. Dentro do tratamento controle, a atividade da GSH-Px foi diminuindo com o decorrer do experimento.

Tabela 6. Média e erro padrão dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na lipoperoxidação espontânea (TBARS LE) e na lipoperoxidação catalisada pelo ferro (TBARS LCF), capacidade antioxidante total (TAC) no soro sanguíneo e atividade da glutatona peroxidase (GSH-Px) no sangue total.

Parâmetros	Dias de Experimento			Médias
	0	40	80	
TBARS LE (nmol de MDA/ml)				
Controle	8,8±0,9	9,0±0,7	11,1±0,9	9,7±0,5
Inorgânico	9,4±0,8	9,3±0,7	9,4±0,7	9,3±0,4
Orgânico	8,4±0,3	8,4±0,6	8,3±0,8	8,3±0,3
Médias	8,8±0,4	8,9±0,4	9,6±0,5	
TBARS LCF (nmol de MDA/ml)				
Controle	14,7±1,4	13,0±1,0	16,1±1,1	14,6±0,7
Inorgânico	16,0±1,8	12,8±0,7	13,9±0,8	14,2±0,7
Orgânico	13,6±0,9	12,8±0,7	13,1±0,7	13,1±0,5
Médias	14,7±0,8 ^a	12,9±0,4 ^b	14,4±0,6 ^{ab}	
TAC (eq/TROLOX mM)				
Controle	0,253±0,03	0,257±0,03	0,246±0,02	0,252±0,01
Inorgânico	0,215±0,02	0,185±0,02	0,280±0,03	0,227±0,02
Orgânico	0,249±0,03	0,200±0,03	0,245±0,02	0,231±0,02
Médias	0,239±0,02 ^{ab}	0,214±0,02 ^b	0,257±0,01 ^a	
GSH-Px (U/g de Hb)				
Controle	456,5±48,1 ^a	407,7±18,0 ^{ab}	362,9±18,5 ^{bB}	409,0±19,1
Inorgânico	437,0±23,8	430,7±15,8	446,3±26,6 ^A	438,0±12,5
Orgânico	443,0±35,4	462,7±12,6	518,5±22,2 ^A	474,7±15,4
Médias	445,5±20,5	433,7±9,8	442,6±18,2	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,10$).

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, numa mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,10$).

DISCUSSÃO

Com relação à ingestão diária de selênio os animais dos tratamentos que receberam dietas suplementadas apresentaram maior ingestão em relação ao tratamento controle ($P \leq 0,05$). A retenção de selênio foi maior nos animais dos tratamentos suplementados, apontando uma maior biodisponibilidade do selênio de ambas as fontes estudadas. Mahan e Parret (1996) estudando duas fontes de selênio (Sel-Plex® e selenito de sódio) em três concentrações (0,1ppm, 0,3ppm e 0,5ppm) para suínos encontraram que a retenção aumenta quando aumenta a dosagem, e que nas mesmas dosagens as fontes possuem comportamento diferente, a orgânica apresentou os melhores valores de retenção em comparação à inorgânica.

Com relação às fontes, não houve diferença para a biodisponibilidade, contudo, muitos estudos mostram que a fonte orgânica de selênio possui maior

biodisponibilidade do que a fonte inorgânica (WANG e LOVELL, 1997; MATEOS et al., 2004; TODD e HENDRIKS, 2005), neste experimento as duas fontes apresentaram valores semelhantes para biodisponibilidade que não diferiram do tratamento controle. O selênio dos ingredientes (tratamento controle) apresentou biodisponibilidade 10% inferior comparado com as fontes inorgânica e orgânica. Há certas dificuldades para se estabelecer a biodisponibilidade do Se de ingredientes e dos alimentos, pois não há critério universal que quantifique este mineral. Wang e Lovell (1997) encontraram valores de biodisponibilidade muito altos para fontes orgânicas, sendo a biodisponibilidade destas fontes duas a três vezes maior do que a do selenito de sódio.

A excreção de selênio na urina não diferiu entre os tratamentos. O esperado era encontrar menor quantidade de selênio na urina dos animais do grupo controle, já que o selênio estava em baixas concentrações na ração. Shiobara et al. (1998) mostraram que a urina é a principal via de excreção de selênio e que não há diferenças entre as fontes, sugerindo que ambas as fontes possuem eficiência similar no organismo; porém a excreção depende da quantidade de selênio administrada na dieta. Os valores de excreção urinária apresentados neste experimento podem ser interpretados como valores de excreção mínima obrigatória do selênio, uma vez que o tratamento controle apresenta quantidades de selênio próximas a quantidade mínima deste mineral.

Os valores da Tabela 3 mostram que todas as fontes de selênio utilizadas foram eficientes em aumentar a quantidade de selênio no plasma sanguíneo ao longo do experimento. Mesmo os animais não suplementados com selênio, cuja ração tinha 0,11 ppm de Se, tiveram seus teores de selênio aumentados isso indica que há um controle homeostático do Se plasmático. Outra possibilidade é que a biodisponibilidade do selênio da ração controle parece ser maior comparada a do selênio da ração de adaptação já que os valores de selênio no plasma sanguíneo aumentaram inclusive nos animais do tratamento controle.

O selênio da ração controle é oriundo dos ingredientes vegetais presentes na dieta, sendo considerado selênio orgânico. Talvez, o elevado teor de selênio presente no plasma sanguíneo dos cães que receberam o tratamento controle se deva a dois fatores: por este selênio ser de origem orgânica e mais biodisponível, e também, pelo fato destes animais não terem sido submetidos a um período de deficiência de selênio. Scott et al. (1998) encontraram concentrações mais altas de selênio no plasma sanguíneo de

homens suplementados com ambas as fontes de selênio, quando comparados a homens que não receberam suplementação.

Iwanier e Zachara (1995) avaliaram a suplementação de selênio em homens, utilizando dois tratamentos, um com 200µg/dia de selênio orgânico e outro com 200µg/dia de selenito de sódio. A concentração de selênio no plasma sanguíneo após duas semanas foi, maior em homens que receberam o selênio orgânico. Assim permaneceu até a oitava semana, quando a fonte de selênio inorgânico alcançou os mesmos patamares que a orgânica. Este estudo mostrou que o selênio orgânico eleva a quantidade de selênio nos tecidos mais rapidamente que o selenito de sódio e concorda com outros estudos (THOMSON et al., 1989; BUTLER et al., 1991). No presente estudo não foi avaliada a concentração de selênio no plasma sanguíneo durante o experimento, apenas no início e na décima segunda semana. Os animais de todos os tratamentos apresentaram aumento na concentração de selênio. Yu et al. (2006) avaliaram as concentrações de selênio em soro sanguíneo e encontraram que estas concentrações não se alteram com níveis entre 0,09 e 0,5 ppm de selênio na dieta.

A concentração de selênio no pêlo aumentou ($P \leq 0,05$) nos animais que receberam ração suplementada com as fontes orgânicas e inorgânicas em comparação aos animais do grupo controle. O selênio presente no pêlo é dependente do acúmulo deste elemento durante meses, e pode indicar a longo prazo o status de selênio no organismo (COTTRILL, 2002). Existe uma correlação positiva entre o selênio presente no pêlo e o selênio presente no sangue (CHRISTODOULOPOULOS et al., 2003). Salbe et al. (1990) em experimento com ratos, encontraram diferenças na concentração de selênio no pêlo para fontes utilizadas. Os ratos que receberam a fonte orgânica apresentaram maiores concentrações de selênio no pêlo.

Shiobara et al. (1998) avaliaram a concentração de selênio no pêlo de ratos utilizando cinco tratamentos (controle – deficiência de selênio; selenito de sódio com níveis adequados de Se; selenito de sódio com Se em excesso; selenometionina com níveis adequados; e selenometionina com Se em excesso) e verificaram que os níveis de selênio no pêlo diminuíram com a deficiência e aumentaram com o aumento da quantidade utilizada na ração. Porém, verificaram que animais que receberam fonte orgânica em excesso apresentaram níveis muito mais elevados de selênio do que os animais que receberam selenito de sódio em excesso e que os animais com excesso de

selenito na dieta apresentaram níveis semelhantes aos que estavam em deficiência de selênio. No estudo de Shiobara et al. (1998), os animais passaram por um período de adaptação com depleção de selênio.

Yu et al. (2006) mostraram que o crescimento do pêlo em cães Beagle adultos é dependente da concentração de selênio na dieta. Porém, tanto baixas concentrações de selênio (0,04 a 0,09 mg/kg da dieta) quanto altas concentrações (5,04 mg /kg da dieta) reduzem a taxa de crescimento do pêlo. Estes autores sugeriram que a quantidade ótima de selênio na dieta para a saúde do pêlo está entre 0,12 a 1,03 mg de Se/kg.

Quanto a curva de absorção plasmática de selênio não foram encontrados na literatura dados que justificassem o comportamento dos animais do tratamento controle, pois estes apresentaram a mesma curva que os animais dos demais tratamentos. A área abaixo da curva do tratamento orgânico foi maior do que a dos demais tratamentos, mostrando que a fonte orgânica é melhor aproveitada. As doze horas de coleta não foram suficientes para avaliar o pico da concentração de selênio, sugerindo que curvas com maior número de pontos precisam ser estudadas para o melhor entendimento da absorção do selênio. Porém deve ser levado em consideração se o selênio presente no plasma sanguíneo é a melhor forma para avaliar a absorção de selênio, uma vez que o plasma sanguíneo tende a manter a homeostase do organismo.

Neste estudo não foram encontrados efeitos positivos das fontes e nem da dose utilizada em comparação ao controle para as características TBARS e TAC. Porém, as duas fontes aumentaram a atividade da GSH-Px ao final do experimento. Muitos trabalhos mostram que a atividade desta enzima é alterada quando se aumenta a quantidade de selênio na dieta (BUTLER et al., 1991; IWANIER e ZACHARA, 1995), porém a atividade da GSH-Px diminui quando o selênio é fornecido em excesso na dieta (Shiobara et al., 1998).

Mahan e Parret (1996) estudando duas fontes de selênio (Sel-Plex® e selenito de sódio) em três concentrações (0,1ppm, 0,3ppm e 0,5ppm) para suínos encontraram que a atividade da GSH-Px aumentou com o aumento das concentrações de selênio, mas não encontraram diferença significativa entre as fontes. A concentração de selênio nos tecidos, principalmente músculos é maior quando os animais são alimentados com fontes orgânicas do que quando alimentados com fontes inorgânicas, porém, a atividade

da GSH-Px parece não se alterar quando se compara os dois tipos de fontes (WHANGER e BUTLER, 1988).

Ebeid (2009) avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de selênio orgânico (0-controle, 0,1ppm, 0,2ppm e 0,3ppm de Sel-Plex®) no status antioxidante de galos sob condições de estresse térmico. Os animais suplementados com 0,3 ppm apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de TBARS e melhora na atividade da glutathione peroxidase no sangue total, mostrando que a suplementação com Sel-Plex® melhorou o status antioxidante dos animais.

Em um estudo realizado na China em solos deficientes em selênio, seres humanos foram divididos em 12 grupos que receberam suplementação de selênio orgânico e inorgânico nas quantidades de 0, 15, 30, 45, 60 ou 75µg de Se/dia para cada fonte. Os que receberam o selênio orgânico alcançaram a atividade máxima da enzima GSH-Px no sangue total com menor (37µg de Se/dia) quantidade de suplementação de selênio do que os que receberam o selênio inorgânico (66 µg de Se/dia). A fonte orgânica foi duas vezes mais efetiva em manter a atividade máxima desta enzima do que a fonte inorgânica e o aumento de sua atividade foi diretamente proporcional a ingestão de selênio (XIA et al., 2005).

No presente estudo não foram observadas diferenças nos valores TBARS e TAC. Estes valores mantiveram-se praticamente inalterados, mostrando que nem a fonte e nem a quantidade de selênio fornecida aos animais foram eficientes em melhorar o status antioxidante. Isto pode ter ocorrido, pelo fato dos animais não terem enfrentado período de estresse intenso, não exigindo maior ação do sistema antioxidante que se manteve constante durante o experimento.

São poucos os estudos que avaliam o estresse oxidativo no plasma sanguíneo de animais saudáveis e muitos relacionam a concentração de TBARS com diversas doenças, tendo respostas positivas com a suplementação de selênio tanto em sua forma orgânica quanto inorgânica. Neste estudo foram utilizados animais saudáveis que sempre foram alimentados com rações que possuíam níveis adequados de todos os minerais e vitaminas. Outro ponto a ser considerado é o fato de que não há na literatura dados sobre os parâmetros normais dos valores de TBARS e da capacidade antioxidante total para cães adultos; além do fato de que esses valores podem ser alterados pela temperatura ou qualquer fator do ambiente.

CONCLUSÃO

Ambas as fontes de selênio são biodisponíveis e sua suplementação (0,3 ppm) na dieta melhora a saúde dos cães, desta forma, as duas fontes de selênio podem ser utilizadas nas rações de cães. O selênio na forma orgânica é absorvido mais rapidamente e melhora a atividade antioxidante no organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. **Dog and cat food substantiation methods**, Ottawa, p. 444, 2004.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p. 302-10, 1978.
- BUTLER, J.A.; THOMSON, C.D.; WHANGER, P.D.; ROBINSON, M.F. Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 748-754, 1991.
- CHRISTODOULOPOULOS, G.; ROUBIES, N.; KARATZIAS, H.; PAPASTERIADIS, A. Selenium concentration in blood and hair of Holstein dairy cows. **Biological Trace Element Research**, v.91, p. 145-150, 2003
- COTTRILL, B.R. The benefits of increasing milk selenium and the role of selenium methionine. In: Navigating from Niche Markets to Mainstream. **Proceedings of Alltech Biotechnology 16th Annual European, Middle Eastern and African Lecture Tour**, p. 74-95, 2002.
- EBEID, T.A. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**, v. 50, n.5, p. 641-647, 2009.
- HUANG, H.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p.1841-1856, 2005.
- IWANIER, K.; ZACHARA, B.A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoa quality characteristics in subfertile men. **Journal of Andrology**, v. 16, n.5, p.441-447, 1995.

- MAHAN, D.C.; PARRET, N.A. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2967-2974, 1996.
- MATEOS, G.G. et al. Trace minerals: what text books don't tell you. In: JA TAYLOR-PICKARD AND LA TUCKER (eds). **Re-defining Mineral Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2004. p. 21-61.
- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Factors influencing the antioxidants activity determined by ABTS+ radical cation assay. **Free Radical Research**, v. 26, p. 195-199, 1997.
- MORAES, P.M.; MILANTONIO, R.B; CAGNANI, G.S.; SANTOS, F.A.; PADILHA, C.C.F.; LIMA, P.M.; PADILHA P.M. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 409-414, 2009. DOI: 10.1007/s00217-009-1068-2.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy, 2006. 398p.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p.158-9, 1967.
- PAYA, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 205-214, 1992.
- PROTEGGENTE, A.R; ENGLAND, T.G.; REHMAN, A.; RICE-EVANS, C.A.; HALLIWELL, B. Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. **Free Radical Research**, v. 36, p. 157-162, 2002.
- RICE-EVANS, C.A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. **Free Radical Research**, v. 33, p.59-66, 2000.
- SALBE, A.D.; LEVANDER, O.A. Effect of various dietary factors on the deposition of selenium in the hair and nails of rats. **The Journal of Nutrition**, v.120, p.200-206, 1990.

- SAS Institute Inc., User Installation Guide for the SAS® System, Version 9.0 for Microsoft® Windows®, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002.
- 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, p. 76-80, 1998.
- SHIOBARA, Y.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, K.T. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood and urine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.152, p.309-314, 1998.
- SILVA, FA.; NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.O.M.A.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; PADILHA P.M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, v. 68, p. 1542-1547, 2007.
- SURAI, P.F. Selenium. In: **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 233-304.
- THOMSON, C.D. Selenium speciation in human body fluids. **The Analyst**, v. 123, p.827-831, 1998.
- THOMSON, C.D.; ROBINSON, M.F.; WHANGER, P.D. Selenium (Se) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood components of New Zealand women during long-term supplementation with selenite or selenomethionine (Semet). In: Wendel, A. ed. **Selenium in Biology and Medicine**. Berlin: Springer Verlag, 1989. p. 254-257.
- TODD, S.E.; HENDRIKS, W.H. Comparative selenium metabolism in cats and dogs. In: LYONS, T.P AND JACQUES, K.A (Eds). Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries. 2005. **Proceedings**. Nottingham University Press , 2005. p 389-397.
- WANG, C.; LOVELL, R.T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 152, n.1-4, p. 223-234, 1997.

- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of Various Dietary Levels of Selenium as Selenite or Selenomethionine on Tissue Selenium Levels and Glutathione Peroxidase Activity in Rats. **Journal of Nutrition**, v.118, p.846-852, 1988.
- XIA, Y.; HILL, K.E.; BYRNE, D.W.; XU, J.; BURK, R.F. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 829-830, 2005.

CAPÍTULO 3

FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS E NO STATUS ANTIOXIDANTE DO SÊMEN DE CÃES

FONTES DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS E NO STATUS ANTIOXIDANTE DO SÊMEN DE CÃES

RESUMO O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de fontes de selênio na qualidade do sêmen de cães. Foram utilizados 24 cães distribuídos em 3 tratamentos: controle (TC-0,11 ppm de Se), inorgânico (TI-0,30 ppm de selenito de sódio) e orgânico (TO-0,30 ppm de Sel-Plex®). O delineamento foi em blocos casualizados com medidas repetidas no tempo, sendo os animais bloqueados pela idade e concentração espermática por ml (CONC). O experimento durou 80 dias e as coletas de sêmen para volume (VOL), motilidade (MOT), vigor (VIG), CONC e número total de espermatozoides no ejaculado (NTE) ocorreram a cada 20 dias. As coletas de plasma seminal (PS) para determinação da atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total (TAC) foram realizadas nos dias 0, 40 e 80, junto com as de sêmen para morfologia espermática (ME) e integridade de membrana. A quantidade de selênio no PS foi determinada nos dias 0 e 80. Os dados foram submetidos a análise de variância e médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para VOL, MOT e VIG não houve diferença entre tratamentos. Para CONC houve diferença significativa entre tratamentos. Aos 60 dias os animais TO ($P \leq 0,05$) apresentaram diferença dos animais TC, mas não dos animais do TI; aos 80 dias cães TO apresentaram maior CONC os dos demais tratamentos. Os animais do TO apresentaram maiores NTE aos 40 e 80 dias que os do TC, mas não dos TI. Aos 80 dias os cães do TO apresentaram maior porcentagem de membranas integras comparado com os TI e TC. Quanto a ME, não houve diferença entre os tratamentos para defeitos maiores, os cães do TO apresentaram menores porcentagens de defeitos menores em relação ao TC. Para defeitos totais (DT) os cães do TI e TO apresentaram menores porcentagens de DT do que do TC. Houve apenas efeito de período para a concentração de Se no PS. Não houve diferença entre tratamentos para GSH-Px e TBARS. Houve efeito de período e de tratamento para TAC, os animais do TO apresentaram os melhores resultados. Estes resultados indicam que para cães em reprodução o uso de seleno levedura melhora as características reprodutivas.

Palavras-chave: selênio levedura, selenito de sódio, antioxidante, plasma seminal, GSH-Px

SELENIUM SOURCES AND THEIR EFFECTS ON SEMEN CHARACTERISTICS AND ANTIOXIDANT STATUS IN DOGS

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate two sources of selenium on semen quality. Twenty-four male dogs were used and distributed in three treatments: control (TC-0,11 ppm of Se), inorganic (TI-0,30 ppm of sodium selenito) and organic (TO-0,30 ppm of Sel-Plex®). The experimental design was in a randomized blocks, the blocking factors were age and spermatic concentration per ml (CONC). The experimental period were 80 days and the semen samplings for volume (VOL), motility (MOT), vigor (VIG), CONC and total sperm count per ejaculate (TSC) were obtained each 20 days. The glutathione peroxidase activity (GSH-Px), thiobarbituric reactive substances and total antioxidant capacity were obtained from seminal plasma in days 0, 40 and 80, together with semen collection for sperm morphology and membrane integrity. The selenium concentration in seminal plasma was determined at the first and the last experimental days. The results were performed by analysis of variance and the means among and into the treatments were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). There were no significant differences among treatments for VOL, MOT and VIG. At day 60, the animals of TO group showed significant difference between TC, but not between TI for CONC, at day 80 TO group showed higher CONC than the others two groups ($P \leq 0.05$). At days 40 and 80 TO group showed higher TSC than the others groups, but it did not differ statistically from TI, only from TC. For membrane integrity, TO groups had the best values, it differed statistically from TI and TC ($P \leq 0.05$). There were no significant differences among treatments for major defects ($P > 0.05$), but for minor defects the TO group showed better results than TC ($P > 0.05$), and ha similar results of TI group ($P \leq 0.05$). For total defects, both TO and TI differed statistically from TC ($P \leq 0.05$). There were no differences among treatments for selenium concentration in seminal plasma, neither for GSH-Px and TBARS. For TAC, TO group showed better values than the others groups, but it did not differ statistically from TI, only from TC. The beneficial effects of selenium yeast on reproduction characteristics of dogs suggest that organic selenium from selenium yeast may be a superior form of Se for dogs in reproduction.

Keywords: selenium yeast, sodium selenite, antioxidant, seminal plasma, GSH-Px

INTRODUÇÃO

O selênio possui diversas funções no organismo entre elas estão: ser componente essencial da enzima glutathione peroxidase atuando ativamente no sistema antioxidante; participar de muitas selenoproteínas, como por exemplo, a selenoproteína P e W; atuar no sistema imune; estar relacionado com a ativação dos hormônios da tireóide; possuir ação anticarcinogênica; e também agir no sistema reprodutivo (SURAI, 2006).

O selênio demonstrou entre todos os minerais indicados como essenciais ser um dos mais importantes na reprodução. É necessário para manter a integridade da membrana espermática e suas propriedades fisiológicas fundamentais para o sucesso da fertilização e motilidade dos espermatozóides, pois é componente da enzima glutathione peroxidase (SURAI, 2002).

Além da presença da glutathione peroxidase com função antioxidante no sistema reprodutivo, também está presente a glutathione peroxidase hidropéroxido fosfolipídica (PH-GSH-Px) que, além da ação antioxidante, possui função estrutural, fazendo parte na membrana celular e das mitocôndrias na peça intermediária dos espermatozóides (SURAI, 2006). Atua, principalmente, protegendo a mitocôndria, organela que está localizada na peça intermediária e é responsável pela motilidade, pela flexibilidade e fluidez da membrana. Para que realize estas propriedades, a mitocôndria necessita altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, que tornam a célula mais vulnerável à oxidação e à produção de radicais livres (SURAI, 2002).

Na deficiência de selênio, há menor síntese de PH-GSH-Px, comprometendo a gametogênese. Como consequência, os espermatozóides apresentam diversos problemas morfológicos como cabeça e caudas isoladas, deformações na cabeça e peça intermediária, inclusive com ruptura estrutural, diminuição do número de espermatozóides por ejaculado e aumento na morte de espermatozóides (ALVIM e SOUZA, 2005). Este trabalho tem o objetivo de avaliar a influência das fontes de selênio nas características seminais e nos níveis de oxidação do sêmen de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, sob o protocolo de número 82/2008-

CEUA, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Local e animais

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”. Foram utilizados vinte e quatro cães adultos da raça Beagle, machos, em manutenção, com idades entre um e dez anos, em boas condições corporais, clinicamente sadios, desverminados e vacinados. O experimento seguiu um delineamento em blocos completos casualizados com medidas repetidas no tempo. Os animais foram blocados por idade e concentração espermática por mililitro.

Dietas

As rações experimentais diferenciaram-se apenas pela inclusão das fontes de selênio avaliadas (selenito de sódio e Sel-Plex®). As dietas foram formuladas para que seus níveis nutricionais e suplementação vitamínico-mineral atendessem as recomendações nutricionais para cães em manutenção da Association of American Feed Control Official (AAFCO, 2004), com exceção dos teores de selênio. Na Tabela 1 estão mostradas as porcentagens de inclusão dos ingredientes em cada ração e suas respectivas composições bromatológicas.

Os animais foram submetidos a três tratamentos: tratamento controle, sem adição de selênio; tratamento inorgânico, controle + selenito de sódio, como fonte inorgânica; e tratamento orgânico, controle + Sel-Plex® (Alltech, Inc., EUA), como fonte orgânica. Os valores analisados de selênio nas fontes utilizadas foram: Selenito de sódio com 448,0 mg de selênio por grama do produto e Sel-Plex® com 1138,7 mg de selênio por quilograma do produto.

A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). As quantidades foram fornecidas para que os animais mantivessem o escore corporal ideal (EC ideal = 5). Os animais foram pesados semanalmente e a quantidade de ração ajustada caso

ocorresse aumento ou redução de peso. O alimento foi oferecido duas vezes ao dia, sempre nos mesmos horários, e a água foi fornecida à vontade.

Tabela 1. Inclusão dos ingredientes nas rações e composição bromatológica analisada.

Ingrediente	% Inclusão		
	Controle	Inorgânico	Orgânico
Milho, grão	49,40	49,40	49,40
Farelo de soja, 45%	19,95	19,95	19,95
Protenose, 60%	17,94	17,94	17,94
Óleo de vísceras de aves	7,50	7,50	7,50
Óleo de peixe	2,00	2,00	2,00
Fosfato bicálcico	1,35	1,35	1,35
Calcário calcítico	0,59	0,59	0,59
Sal comum (NaCl)	0,40	0,40	0,40
Cloreto de potássio	0,30	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15
Antifúngico ¹	0,10	0,10	0,10
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01
L-Lisina	0,002	0,002	0,002
Suplemento mineral ³	0,1	0,1	0,1
Suplemento vitamínico ⁴	0,2	0,2	0,2
Selenito de sódio (g) ⁵	-	0,3	-
Selênio levedura (g) ⁶	-	-	135
Composição bromatológica analisada			
Matéria Seca (%)	93,73	92,85	93,62
	Valores expressos em 100% de matéria seca		
Proteína bruta (%)	26,12	26,79	25,87
Extrato etéreo ácido (%)	12,22	12,38	12,06
Matéria mineral (%)	5,48	5,53	5,72
Energia metabolizável (kcal/kg) ⁷	3.578	3.578	3.578
Concentração de selênio (ppm)	0,11	0,30	0,30

¹ Mold-Zap AS, Alltech, Inc., EUA

² Antiox-RC, Alltech, Inc., EUA

³ Adição por quilograma de dieta: Ferro 150 mg, Cobre 15 mg, Manganês 7 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg.

⁴ Adição por quilograma de dieta: Vit A 15000 UI, Vit D 1000 UI, Vit. E 35 UI, Tiamina 4 mg, Riboflavina 5 mg, Ácido pantotênico 20 mg, Niacina 30 mg, Piridoxina 4 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,04 mg e Colina 1500 mg.

⁵ Selenito de sódio com 448,0 mg de selênio por grama do produto.

⁶ Sel-Plex® com 1138,7 mg de selênio por quilograma do produto.

⁷ Valores calculados (NRC, 2006).

Adaptação

Uma ração comercial foi fornecida aos animais por oito semanas antes da introdução das rações experimentais. Esta ração teve como função igualar a condição nutricional dos animais e continha 0,10 ppm de selênio. A fonte de selênio desta ração era o selenito de sódio e o peso dos animais e a ingestão de alimento também foi controlada por todo período de adaptação. Ainda neste período, os cães foram condicionados ao manejo de coleta de sêmen, de forma que eram manipulados duas vezes por semana e o ejaculado era descartado.

Período experimental e análises

O período experimental foi de 80 dias. A coleta de sêmen foi realizada por manipulação digital do pênis em tubo graduado com funil acoplado. Nos dias 0, 20, 40, 60 e 80 o sêmen foi coletado e mantido em banho-maria a 37°C. As análises realizadas no sêmen foram:

Volume: mensuração realizada por meio da visualização direta no tubo graduado.

Motilidade e vigor espermático: as avaliações foram realizadas segundo método descrito por Krause (1966), onde uma gota de sêmen foi colocada sobre lâmina aquecida (38-40°C) e recoberta por lamínula. A motilidade foi classificada numa escala de 0 a 100% e o vigor através de um escore de 0 a 5 (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal -CBRA, 1996), com utilização de microscópio com aumento de 100x.

Concentração espermática: foi determinada por meio da contagem em câmara de Neubauer, com diluição de 1:20. O número de espermatozóides foi expresso por ml.

Número total de espermatozóides no ejaculado: é a concentração espermática por ml multiplicada pelo valor do volume.

Nos dias 0, 40 e 80 do período experimental foram realizadas as análises:

Morfologia espermática: foi realizado um esfregaço por animal, fixado em formol salino por 10 minutos (CUNHA, 1997) e a coloração feita pelo método de Karras modificado (PAPA et al., 1986). Foram avaliadas 100 células de cada esfregaço e os resultados expressos em porcentagem, registrados individualmente. A classificação da patologia espermática foi feita segundo Oetllé e Soley (1988). As patologias foram

divididas em defeitos maiores (correlacionados negativamente com a fertilidade do animal) e menores (não associados com a fertilidade do animal).

Integridade de membrana: foi realizada por meio de sondas fluorescentes. A coloração fluorescente foi realizada de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990), e adaptada por Cunha et al. (1996). Após 10 minutos da diluição do sêmen, uma gota do material foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência com objetiva de 40x. Foram contadas 200 células e classificadas como: células com membrana íntegra (células coradas em verde fluorescente) e células com membrana lesada (células coradas em vermelho ou em verde fluorescente e vermelho). O resultado foi dado em porcentagem de células integras e lesadas.

Nos dias 0, 40 e 80 do período experimental, o sêmen foi coletado e seu plasma seminal separado em centrifuga refrigerada por 15 minutos a 10.000g. Após este procedimento as amostras de plasma foram congeladas a -20°C até o momento das análises de glutathione peroxidase e análises de estresse oxidativo: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total (TAC).

Glutathione peroxidase: O kit RANSEL- Glutathione Peroxidase RS505, fabricado por RANDOX Laboratories, Reino Unido, foi utilizado para esta análise. A metodologia foi baseada nos trabalhos de Paglia e Valentine (1967).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): A lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozóides foi determinada pelo método espectrofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege e Aust (1978) e Paya et al. (1992), o qual baseia-se na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malonaldeído (MDA), formando um cromógeno de coloração rósea, o qual é quantificado em comprimento de onda de 532 nm. Os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em nmol de MDA/ml mediante curva padrão de MDA realizada ao espectrofotômetro. A curva padrão utilizada para a determinação do TBARS obedeceu a equação: $[MDA] \text{ (nmol/ml)} = (Abs - 0,0369)/0,0098$ ($R^2 = 0,9979$), onde Abs é a leitura da absorbância.

A metodologia de Buege e Aust (1978) quantifica a lipoperoxidação espontânea (LE), onde a quantidade de MDA presente na amostra é medida, já a metodologia de

Paya et al. (1992) quantifica a lipoperoxidação induzida ou catalisada pelo ferro (LCF), o ferro estimula a oxidação e esta reação tem por objetivo medir todo o potencial que a amostra tem em gerar o radical.

Capacidade antioxidante total (TAC): Para esta análise foi utilizado o kit SIGMA CS0709 que foi desenvolvido para a avaliação da capacidade antioxidante dos fluidos biológicos, representando indiretamente as concentrações e interações entre os antioxidantes de baixo e alto peso molecular e enzimas. O kit fornece todo o material necessário para a análise (MILLER e RICE-EVANS, 1997; RICE-EVANS, 2000; PROTEGGENTE et al., 2002; HUANG et al., 2005).

Ainda no plasma seminal foram quantificados os teores de selênio no primeiro e último dia do experimento:

Determinação da quantidade de selênio no plasma seminal: As determinações de selênio foram feitas no laboratório de Espectrometria Atômica Aplicado do Departamento de Química e Bioquímica/UNESP-Botucatu-SP utilizando a técnica de espectrometria atômica e o método por atomização em forno de grafite (SILVA et al., 2007; MORAES et al., 2009).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias entre os grupos e dentro dos grupos ao longo do tempo foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, com o auxílio do procedimento GLM do SAS (2002). Para as variáveis GSH-Px, TBARS e TAC o nível de significância considerado foi de 10%.

RESULTADOS

Os teores de selênio no plasma seminal estão apresentados na Tabela 2. Não houve interação entre tratamentos e período e nem efeito dos tratamentos ($P > 0,05$). Entretanto, ocorreu um aumento significativo no conteúdo de Se no plasma seminal do primeiro para o último dia do experimento ($P \leq 0,05$).

Tabela 2. Média e erro padrão das concentrações de selênio no plasma seminal nos dia 0 e 80 do experimento.

Se plasma seminal (µg/L)	Dias de Experimento		Médias
	0	80	
Controle	5,7±0,5	23,7±0,8	14,7±2,4
Inorgânico	5,5±0,8	24,1±0,9	14,8±2,5
Orgânico	6,5±0,9	25,3±1,0	15,9±2,5
Médias	5,9±0,4 ^b	24,4±0,6 ^a	

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si (P≤0,05).

Os resultados de volume, motilidade e vigor estão apresentados na Tabela 3. Não houve interação entre tratamento e período e nem efeito (P>0,05) de tratamentos para estas variáveis. Foram observadas diferenças entre os períodos (P≤0,05) apenas para volume.

Tabela 3. Médias e erro padrão das características seminais: volume (ml), motilidade (%) e vigor nos dias 0, 20, 40, 60 e 80 do experimento.

Parâmetros	Dias de Experimento					Média
	0	20	40	60	80	
Volume (ml)						
Controle	2,7±0,6	4,2±0,6	4,0±0,8	6,6±1,2	5,1±1,2	4,5±0,4
Inorgânico	3,5±0,8	4,8±0,8	5,8±0,7	5,9±0,7	5,7±1,2	5,1±0,4
Orgânico	2,6±0,4	3,5±0,5	4,7±0,7	5,0±0,8	3,9±0,8	3,9±0,3
Média	2,9±0,3 ^c	4,2±0,4 ^{bc}	4,8±0,4 ^{ab}	5,8±0,5 ^a	4,9±0,6 ^{ab}	
Motilidade (%)						
Controle	85,0±1,9	87,5±1,6	81,3±6,1	78,8±6,1	77,5±5,9	82,0±2,1
Inorgânico	80,0±3,8	78,8±4,4	80,±4,2	82,9±2,9	78,8±4,0	80,0±1,7
Orgânico	85,0±2,7	83,8±1,8	77,4±9,9	88,8±1,3	88,8±1,3	84,8±2,1
Média	83,3±1,7	83,3±1,8	79,5±3,4	83,5±2,4	81,7±2,5	
Vigor						
Controle	4,1±0,1	4,2±0,2	3,9±0,3	3,8±0,3	3,9±0,3	4,0±0,1
Inorgânico	3,7±0,2	3,9±0,2	3,9±0,2	4,1±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1
Orgânico	3,9±0,2	4,0±0,1	4,3±0,1	4,3±0,1	4,4±0,1	4,2±0,1
Média	3,9±0,1	4,0±0,1	4,4±0,1	4,1±0,1	4,1±0,1	

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, numa mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Na Tabela 4 estão mostrados os resultados de concentração espermática por ml e número total de espermatozóides no ejaculado. Houve interação entre tratamento e período para estas duas variáveis. A concentração espermática por ml diferiu significativamente (P≤0,05) entre os tratamentos após 60 dias de experimento, quando o tratamento controle apresentou menor concentração espermática por ml que o tratamento orgânico. O tratamento inorgânico não diferiu significativamente dos demais tratamentos. Aos 80 dias de experimento o tratamento orgânico apresentou maior

concentração espermática e diferiu significativamente dos outros dois tratamentos ($P \leq 0,05$), inorgânico e controle, os quais não diferiram entre si ($P > 0,05$). Não houve efeito de período dentro de nenhum dos tratamentos avaliados ($P > 0,05$).

O número total de espermatozoides no ejaculado (NTE) não acompanhou por completo a concentração espermática por ml; aos 40 dias o tratamento orgânico diferiu ($P \leq 0,05$) dos demais tratamentos, apresentando uma maior NTE. Este fato foi também verificado aos 80 dias de experimento ($P \leq 0,05$), porém não houve diferença significativa entre animais dos tratamentos, inorgânico e orgânico ($P > 0,05$). Não houve diferença entre os períodos dentro dos tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 4. Médias e erro padrão para as características seminais: concentração de espermatozoides por ml ($\times 10^6$ sptz/ml) e número total de espermatozoides no ejaculado ($\times 10^6$ sptz).

Parâmetros	Dias de Experimento				
	0	20	40	60	80
Concentração ($\times 10^6$ sptz/ml)					
Controle	100,3 $\pm$ 26,8	58,3 $\pm$ 10,2	60,4 $\pm$ 14,8	38,8 $\pm$ 11,6 ^B	49,8 $\pm$ 10,2 ^B
Inorgânico	98,0 $\pm$ 31,9	63,5 $\pm$ 16,9	49,0 $\pm$ 13,9	56,4 $\pm$ 14,9 ^{AB}	64,0 $\pm$ 17,5 ^B
Orgânico	101,9 $\pm$ 16,6	133,8 $\pm$ 47,6	139,1 $\pm$ 53,8	138,7 $\pm$ 65,3 ^A	167,1 $\pm$ 54,9 ^A
Nº total de sptz no ejaculado ($\times 10^6$ sptz)					
Controle	216,6 $\pm$ 51,0	248,5 $\pm$ 58,2	212,3 $\pm$ 43,1 ^B	217,8 $\pm$ 58,7	228,1 $\pm$ 25,0 ^B
Inorgânico	271,7 $\pm$ 83,9	271,7 $\pm$ 61,3	252,8 $\pm$ 67,9 ^B	313,5 $\pm$ 71,1	309,5 $\pm$ 88,7 ^{AB}
Orgânico	277,8 $\pm$ 75,1	372,0 $\pm$ 99,9	506,3 $\pm$ 159,4 ^A	430,4 $\pm$ 88,4	504,1 $\pm$ 148,8 ^A

A,B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Houve interação ($\leq 0,05$) entre tratamento e período para a percentagem de membranas íntegras e membranas lesadas (Tabela 5). Os animais do tratamento orgânico apresentaram maior percentagem de membranas íntegras e menor percentagem de membranas lesadas ao final do experimento ($P \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento controle e o inorgânico ($P > 0,05$) ao final para estas variáveis; estes dois tratamentos apesar de apresentarem maior percentagem de membranas lesadas, possuem valores que estão dentro dos parâmetros normais esperados para cães saudáveis.

Ainda na Tabela 5 podem ser observados os dados relacionados à morfologia espermática, que foi dividido em defeitos maiores, menores e totais. Não houve interação entre tratamento e período, nem efeito de tratamento para defeitos maiores ($P > 0,05$). Porém, os cães ao final de 80 dias apresentaram mais ($P \leq 0,05$) defeitos maiores no sêmen que no início do experimento. Para defeitos menores, pode ser

observado que o tratamento orgânico diferiu do tratamento controle, mas não diferiu do inorgânico ($P>0,05$) aos 40 e 80 dias. Aos 80 dias o tratamento controle apresentou a maior porcentagem de defeitos totais e diferiu dos demais tratamentos ($P\leq 0,05$) e os dois tratamentos suplementados com selênio não diferiram entre si ($P>0,05$). O tratamento controle apresentou efeito de período ($P\leq 0,05$) para ambas as variáveis, defeitos menores e defeitos totais, sendo que aos 80 dias os valores foram maiores que no início do experimento.

Tabela 5. Médias e erro padrão das variáveis relacionadas ao teste de integridade de membrana e morfologia espermática nos dias 0, 40 e 80 do experimento.

Parâmetros	Dias de Experimento			Média
	0	40	80	
Membranas íntegras (%)				
Controle	89,9±3,5	90,4±1,2	86,4±0,7 ^B	88,9±1,3
Inorgânico	93,0±1,9	90,7±2,0	85,3±3,5 ^B	89,6±1,6
Orgânico	90,1±2,2	92,3±1,6	96,2±0,5 ^A	92,9±1,0
Média	91,0±1,5	91,1±0,9	89,5±1,6	
Membranas lesadas (%)				
Controle	10,1±3,5	9,6±1,2	13,6±0,7 ^B	11,0±1,3
Inorgânico	7,0±1,8	9,3±2,0	14,7±3,5 ^B	10,4±1,6
Orgânico	9,9±2,2	7,7±1,6	3,8±0,5 ^A	7,2±1,0
Média	9,0±1,5	8,9±0,9	10,6±1,6	
Defeitos Maiores (%)				
Controle	2,9±1,6	3,8±0,9	9,1±2,2	5,3±1,1
Inorgânico	2,4±0,8	2,6±1,3	5,4±1,2	3,5±0,7
Orgânico	6,4±1,9	6,5±2,3	6,0±1,7	6,3±1,1
Média	3,9±0,9 ^b	4,3±1,0 ^{ab}	6,9±1,0 ^a	
Defeitos Menores (%)				
Controle	15,4±3,1 ^b	25,9±1,9 ^{abA}	30,3±6,0 ^{aA}	23,8±2,6
Inorgânico	11,6±2,2	15,1±1,8 ^{AB}	19,6±1,1 ^{AB}	15,5±1,2
Orgânico	14,6±0,9	10,8±1,8 ^B	13,1±1,1 ^B	12,8±0,8
Média	13,9±1,3	17,3±1,7	21,0±2,5	
Defeitos Totais (%)				
Controle	18,3±4,2 ^b	29,6±1,6 ^{ab}	39,4±6,3 ^{aA}	29,0±3,1
Inorgânico	14,0±2,6	17,8±2,3	25,0±1,4 ^B	18,9±1,5
Orgânico	21,0±1,4	17,3±1,8	19,1±1,6 ^B	19,1±0,9
Média	17,8±1,7	21,5±1,6	27,8±2,8	

A,B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P\leq 0,05$). a,b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, numa mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Os parâmetros de oxidação estão apresentados na Tabela 6. Não houve interação entre tratamento e período ($P>0,10$) para as três variáveis analisadas. Na lipoperoxidação catalisada pelo ferro foi observado efeito de período ($P\leq 0,10$) sendo que ao final do experimento os valores de TBARS aumentaram no plasma seminal,

mostrando uma maior capacidade de oxidação da amostra. Foi observado efeito de período ($P \leq 0,10$) e efeito de tratamento ($P \leq 0,10$) para TAC, os animais do tratamento controle apresentaram menor capacidade antioxidante total do que os animais do tratamento orgânico ($P \leq 0,10$), porém este não apresentou diferença do tratamento inorgânico ($P > 0,10$). Não houve efeito de tratamento ($P > 0,10$), porém houve efeito de período para GSH-Px, aos 40 dias do experimento houve uma melhora na atividade da GSH-Px.

Tabela 6. Média e erro padrão dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na lipoperoxidação espontânea (TBARS LE) e na lipoperoxidação catalisada pelo ferro (TBARS LCF), capacidade antioxidante total (TAC) e atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) do plasma seminal.

Parâmetros	Dias de Experimento			Média
	0	40	80	
TBARS LE (nmol de MDA/ml)				
Controle	13,5±2,3	11,5±1,9	9,5±1,0	11,5±1,2
Inorgânico	8,6±1,5	10,0±1,6	9,7±1,5	9,4±0,9
Orgânico	10,2±1,5	9,6±1,5	12,1±1,1	10,6±0,8
Média	10,8±1,2	10,4±0,9	10,4±0,7	
TBARS LCF (nmol de MDA/ml)				
Controle	17,9±3,3	13,7±1,6	21,4±2,2	17,7±1,5
Inorgânico	13,9±2,5	11,7±1,6	15,9±1,9	13,6±1,1
Orgânico	15,4±1,9	13,2±1,9	22,3±1,4	17,0±1,3
Média	15,5±1,5 ^b	12,9±0,9 ^b	19,9±1,2 ^a	
TAC (eq/TROLOX mM)				
Controle	0,292±0,03	0,342±0,03	0,347±0,05	0,327±0,02 ^B
Inorgânico	0,323±0,02	0,303±0,03	0,393±0,02	0,340±0,02 ^{AB}
Orgânico	0,350±0,03	0,363±0,04	0,426±0,03	0,379±0,02 ^A
Média	0,321±0,02 ^b	0,336±0,02 ^{ab}	0,389±0,01 ^a	
GSH-Px (U/g de Hb)				
Controle	108,1±31,3	124,8±11,6	97,6±19,9	110,2±12,6
Inorgânico	93,3±13,2	184,0±14,0	126,2±14,0	134,5±10,9
Orgânico	96,7±23,6	185,1±27,7	154,2±16,4	145,3±14,8
Média	99,4±13,2 ^b	164,7±12,1 ^a	126,0±10,5 ^b	

A,B Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,10$). a,b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, numa mesma linha, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,10$).

DISCUSSÃO

Os valores da Tabela 2 mostram que todas as rações foram eficientes em aumentar a quantidade de selênio no plasma seminal ao longo do experimento independente da fonte de selênio utilizada. Mesmo os animais não suplementados, cuja

ração tinha 0,11 ppm de Se, tiveram seus teores de selênio aumentados. Estes dados são diferentes dos encontrados em carneiros por Baiomy et al. (2009), que suplementaram a ração com 0,20 ppm e 0,50 ppm de selênio orgânico e obtiveram maior concentração de selênio no grupo suplementado com 0,50 ppm. Pappas et al. (2005) relataram que a inclusão de selênio orgânico (Sel-Plex®) na dieta de galos aumentou em duas vezes a concentração de selênio no sêmen, comparados aos animais que não receberam dietas suplementadas.

Hawkes e Turek (2001) estudaram o efeito do selênio na qualidade seminal de homens saudáveis. Nos primeiros 21 dias do experimento todos os indivíduos receberam dieta com 47µg de selênio e, então, foram separados em dois grupos, o primeiro recebendo dieta com 13µg de selênio e o segundo dieta com 297µg por 99 dias. Estes autores encontraram aumento da concentração de selênio no plasma seminal com o aumento da ingestão de selênio. Segerson et al. (1981) verificaram que a injeção de 0,33 mg de Se/kg de peso vivo aumentou a concentração de selênio no plasma seminal de suínos em comparação aos que não receberam a injeção.

Iwanier e Zachara (1995) avaliaram a suplementação de selênio em homens com baixa fertilidade, utilizando dois tratamentos, um com 200µg/dia de selênio orgânico e outro com 200µg/dia de selenito de sódio. A concentração de selênio no plasma seminal após duas semanas foi maior em homens que receberam o selênio orgânico, porém após quatro semanas não havia mais diferença entre tratamentos e esta condição permaneceu até o fim do experimento na décima segunda semana. Este estudo mostrou que o selênio orgânico eleva a quantidade de selênio no plasma seminal, mais rapidamente que o selenito de sódio e concorda com outros estudos (Butler et al., 1991; Thomson et al., 1989). No presente estudo não foi avaliada a concentração de selênio no plasma seminal durante o experimento, apenas no início e na décima segunda semana. Todos os tratamentos apresentaram aumento na concentração de selênio, mesmo o controle.

Estudos com selênio marcado mostram que existe grande relação entre o selênio e o sistema reprodutor e que em casos de deficiência este sistema retém mais selênio do que os outros (Burk et al., 1972; Smith et al. 1979; Behne et al., 1982; Shalini e Bansal, 2006). Marin-Guzman et al. (1997) trabalhando com suínos sugerem que o sistema reprodutor tem prioridade em reter e utilizar o selênio, e quando este se encontra deficiente na dieta, o organismo tenta manter os níveis adequados retirando o selênio de

tecidos que possam funcionar como reserva. Esta pode ser uma possível explicação para os valores encontrados neste estudo, uma vez que o NRC (2006) recomenda 0,35 ppm de selênio para animais em fase de reprodução e a administração da ração controle foi de 0,11 ppm de selênio, o que pode ter induzido deficiência de selênio para este órgão, uma vez que esta quantidade é adequada somente para animais em manutenção.

O selênio da ração controle é oriundo dos ingredientes vegetais presentes na dieta, sendo considerado selênio orgânico. No metabolismo de minerais o organismo absorve mais o mineral quando este está em baixas concentrações. Talvez, o elevado teor de selênio presente no plasma seminal para o tratamento controle se deva a quatro fatores: maior absorção em função da baixa quantidade de selênio na ração, este selênio ser de origem orgânica, mais disponível, ao fato do organismo favorecer o acúmulo de selênio no sistema reprodutor, mesmo em uma quantidade considerada baixa para animais em reprodução e por último estes animais não terem sido submetidos a um período de depleção de selênio, o que acontece na maioria dos experimentos.

Não há relatos de que o selênio influencia o volume do ejaculado. O aumento no volume obtido neste trabalho se deve ao manejo de coleta de sêmen, pois este manejo estimula a produção de plasma seminal e, por consequência, o volume. Este efeito também pode variar de indivíduo para indivíduo e entre coletas em um mesmo indivíduo.

Também não há relatos de que o selênio influencia no vigor dos espermatozóides. Porém, está intimamente relacionado com a motilidade espermática, sendo que muitos trabalhos têm demonstrado este efeito, tanto para o selênio orgânico quanto para o inorgânico (Wu et al., 1973; Marin-Guzman et al., 1997). A motilidade pode ser reduzida tanto em baixas quantidades de selênio quanto em altas concentrações, consideradas tóxicas. No presente estudo a motilidade não foi alterada nem pela diferença de concentração de selênio na dieta e nem pelas fontes utilizadas. Castellini et al. (2002) estudando o efeito do selênio no sêmen de coelhos não encontraram diferença na motilidade espermática do grupo controle (0,1ppm de Se) e do grupo suplementado com selênio (0,4 ppm de Se); os autores destacam a possibilidade de que todas as concentrações fornecidas aos animais são adequadas e que a maioria dos trabalhos que mostram resultados satisfatórios da utilização do selênio são realizados, principalmente, com animais em que foi provocada a deficiência de selênio.

Iwanier e Zachara (1995) também não encontraram diferença entre selênio orgânico e selenito de sódio quanto à motilidade como observado por Scott et al. (1998). Wu et al. (1973) avaliando o efeito do selênio em ratos nascidos de mães que receberam dieta deficiente de selênio, verificaram que os animais que receberam dietas com 0,1 ppm de selênio apresentaram maior motilidade e melhor morfologia do que aqueles que não receberam selênio na dieta. Os ratos não suplementados apresentaram motilidade 0 (zero) e menos de 20% de espermatozóides normais, mesmo recebendo outros antioxidantes. Outros estudos evidenciaram a influência do selênio na motilidade espermática quando se aumenta o selênio na dieta (Marin-Guzman et al., 1997). Isso mostra que o selênio atua diretamente na motilidade e na espermatogênese. Ebeid (2009) avaliando os efeitos do selênio orgânico nos parâmetros reprodutores de galos verificou que as características seminais foram dose-dependente; os animais que receberam maiores níveis de selênio orgânico na dieta apresentaram melhores desempenhos reprodutivos sob condições de estresse térmico.

Os valores de motilidade encontrados no presente trabalho ao final do experimento (controle 77,5%, inorgânico 78,8% e orgânico 88,8%), apesar de não diferirem estatisticamente, são numericamente diferentes. Quando se trata de congelar o sêmen para possível inseminação artificial, os animais do tratamento orgânico deveriam ser os escolhidos por apresentarem motilidade maior que 80%.

A concentração de espermatozóides por ml foi maior no tratamento orgânico a partir dos 60 dias diferindo apenas do tratamento controle, e aos 80 dias diferiu estatisticamente tanto do controle quanto do inorgânico. Já para o número total de espermatozóides no ejaculado, o tratamento inorgânico não diferiu do orgânico estatisticamente aos 80 dias, apesar de os valores serem bem diferentes numericamente (Tabela 4). Isso resulta em influência tanto da fonte suplementada na ração dos cães quanto da quantidade utilizada. Provavelmente este aumento tanto da concentração espermática por ml quanto do número total de espermatozóides se deva a redução da apoptose nas células espermáticas.

Iwanier e Zachara (1995) não encontraram diferença significativa entre selênio orgânico e selenito de sódio para concentração espermática e morfologia concordando com outros estudos (Roy et al., 1990; Behne et al., 1988). Há trabalhos onde a suplementação de selênio auxilia apenas um fator. Em humanos 100µg/dia de selênio

elevou a motilidade, mas não alterou a concentração espermática quando comparado ao grupo que não recebeu selênio (Scott et al., 1998). Segerson et al. (1981) verificaram que a injeção de 0,33 mg de Se/kg de peso vivo não alterou a morfologia espermática em suínos, porém a concentração total de espermatozóides apresentou diferença significativa; os autores sugerem que a ração de adaptação tinha concentrações ideais de selênio (0,16 ppm de Se) que mantiveram o bom funcionamento do sistema reprodutor.

Liu et al. (1982) relataram que a prolongada deficiência de selênio em suínos diminuiu a concentração e motilidade espermática. Marin-Guzman et al. (1997) avaliando o efeito do selênio em suínos verificaram que animais que receberam dietas suplementadas com 0,5 ppm de selênio apresentaram maior concentração espermática por ml e maior concentração espermática total do que aqueles que não receberam dieta suplementada.

No presente estudo não foram encontradas diferenças nem entre as fontes e nem entre as quantidades de selênio administrada para defeitos maiores. Porém, para defeitos menores pode ser constado efeito de doses, já que aos 80 dias o grupo controle apresentou mais defeitos do que os outros dois grupos, diferindo significativamente do tratamento orgânico. Para percentagem de defeitos totais, ambos os grupos tratados com selênio foram diferentes significativamente ($P \leq 0,05$) do grupo controle. Edens (2002) relatou que, quando dietas de galos são suplementadas com 0,2 ppm de selênio orgânico, a porcentagem de espermatozóides normais aumentou para 98,7%. Wu et al. (1973) ao estudar ratos que receberam dietas deficientes em selênio verificaram que estes animais apresentavam menos de 10% de espermatozóides normais, enquanto que os que receberam 0,1 ppm de selênio apresentaram 97% de espermatozóides normais. Iwanier e Zachara (1995) não encontraram diferença significativa entre as fontes de selênio quando estudaram a morfologia espermática em humanos; as fontes foram fornecidas na mesma quantidade e mantiveram a morfologia sem diferenças por 12 semanas. Edens e Sefton (2009) encontraram diferença entre as fontes utilizadas, selenito de sódio e Sel-Plex®, sendo que a fonte orgânica favoreceu a morfologia espermática.

Quanto à integridade de membrana, são poucos trabalhos que avaliaram este parâmetro, mas pode-se observar neste estudo que a utilização do selênio orgânico aumentou o número de espermatozóides com membrana íntegra. Isto está relacionado

com os fatores antioxidantes, uma vez que protegem as membranas de rupturas causadas pelo estresse oxidativo. O limite aceitável é de 30% de membranas lesadas e, nenhum dos grupos atingiu esse limite, mostrando que todos os grupos estão dentro dos parâmetros considerados normais. Porém os animais do grupo orgânico diferiram ($P \leq 0,05$) dos demais, apresentando menor número de membranas lesadas e maior proteção ao estresse oxidativo.

Neste estudo não foram encontrados efeitos das fontes em comparação ao controle na diminuição da concentração de TBARS tanto na metodologia da lipoperoxidação espontânea quanto na da lipoperoxidação catalisada pelo ferro. Inclusive ocorreu aumento na concentração de TBARS na reação catalisada pelo ferro, mostrando que ao final do experimento os animais tinham maior capacidade de oxidação, o que não era esperado. Uma possível explicação para esse aumento na oxidação pode estar relacionado a algum fator externo, já que o estresse oxidativo pode ter como estímulo qualquer alteração no ambiente. Outro ponto é que não há informações sobre quais são as concentrações normais de TBARS em cães, quais são os limites considerados aceitáveis e qual a faixa de variação, e também à quais estímulos as concentrações de TBARS respondem.

Galos sob condições de estresse térmico apresentaram menores concentrações de TBARS no plasma seminal quando a dieta foi suplementada com 0,3 ppm de selênio orgânico e maiores valores para a atividade da GSH-Px e TAC, mostrando o efeito positivo da fonte orgânica no status antioxidante quando os animais enfrentaram período de estresse (Ebeid, 2009). Castellini et al. (2002) avaliando as concentrações de TBARS no plasma seminal de coelhos constataram que 200ppm de selênio não foram suficientes para diminuir os valores de TBARS para animais não sofreram nenhum tipo de estresse.

O presente estudo concorda com o trabalho de Ebeid (2009) para a variável TAC, já que em ambos os estudos, a fonte orgânica apresentou melhores valores para a capacidade antioxidante total mostrando uma maior proteção contra o estresse oxidativo.

Quanto à atividade da GSH-Px, muitos trabalhos mostram que a atividade desta enzima é alterada quando aumenta-se a quantidade de selênio na dieta (Bartle et al., 1980; Butler et al., 1991; Iwanier e Zachara, 1995), mas quando o selênio encontra-se

em níveis excessivos na dieta a atividade desta enzima também diminui. Castellini et al. (2002) avaliaram quatro tratamentos em coelhos (Controle – 0,1ppm de Se; VitE+0,1ppm de Se; Selênio – 0,4 ppm de Se; VitE+Se – 0,4 ppm) quanto a atividade da GSH-Px no plasma seminal e verificaram que os animais dos tratamentos suplementados com 0,4 ppm de selênio apresentaram maior atividade da enzima diferenciando-se dos demais, e não houve diferença significativa entre tratamentos Selênio e VitE+Se, mostrando que o aumento foi apenas da inclusão de selênio. Marin-Guzman et al. (1997) mostraram aumento da atividade da GSH-Px no plasma seminal quando suínos foram suplementados com 0,5 ppm de selênio. A inclusão de 0,3 ppm na dieta de frangos eleva a atividade da enzima GSH-Px no fígado, testículos, espermatozóides e plasma seminal, resultando em decréscimo da susceptibilidade do espermatozoide à lipoperoxidação (Surai et al., 1998).

Em estudo realizado com homens inférteis utilizando-se a mesma concentração de selênio, porém com duas fontes diferentes, uma orgânica e outra inorgânica, foi verificado que a atividade da enzima GSH-Px foi alterada apenas com a fonte orgânica, a fonte inorgânica não melhorou a atividade desta enzima (Iwanier e Zachara, 1995).

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos valores de GSH-Px e TBARS e, isto pode ter ocorrido, pois os animais não enfrentaram um período de estresse intenso, não exigindo maior ação do sistema antioxidante que se manteve inalterado durante o experimento.

CONCLUSÃO

A fonte orgânica de selênio mostra benefícios em relação a fonte inorgânica para características seminais dos cães e pode ser uma ótima alternativa para suplementação de selênio em alimentos para cães. A concentração de 0,30 ppm de selênio é a mais indicada quando se trata de animais reprodutores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, F.; SOUZA, G.M. De. Influência dos principais micro minerais na reprodução de bovinos (Parte final). 2005. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1006>. Acesso em: 12 fev. 2010.

- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. **Dog and cat food substantiation methods**, Ottawa, p. 444, 2004.
- BAIOMY, A.A.; MOHAMED, A.E.; MOTTELIB, A.A. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on productive and reproductive performance in rams. **Beni-Suef Veterinary Medical Journal**, v.19, n.1, p.39-43, 2009.
- BARTLE, J.L.; SENGGER, P.L.; HILLERS, J.K. Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. **Biology of Reproduction**, v.23, p.1007-1013, 1980.
- BEHNE, D.; HILMERT, H.; SCHEID, S.; GESSNER, H.; ELGER, W.; Evidence for specific selenocysteine target tissues and new biologically important selenoproteins. **Biochimie et Biophysica Acta**, v.966, p.12- 21, 1988.
- BEHNE, D.; HOFER, T; BERSWORDT-WALLRABE, R.V.; ELGER, W. Selenium in the Testis of the Rat: Studies on Its Regulation and Its Importance for the Organism. **Journal of Nutrition**, v.112, p.1682-1687, 1982.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D.. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p. 302-10, 1978.
- BURK, R.F.; BROWN, D.G.; SEELY, R.J.; SCAIEF, C.C. Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3^{-2}$ in the rat. **Journal of Nutrition**, v.102, p.49-56, 1972.
- BUTLER, J.A.; THOMSON, C.D.; WHANGER, P.D.; ROBINSON, M.F. Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 748-754, 1991.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A. et al. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v.58, p.1723-1732, 2002.
- CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1996. 65p. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 017/1996).
- CUNHA, I.C.N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicinagema**. Botucatu, 1997. 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

- CUNHA, I.C.N., LOPES M.D., ZÚCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande, 1996. p.411.
- EBEID, T.A. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**, v. 50, n.5, p. 641-647, 2009.
- EDENS, F.W. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction, in: LYONS, T.P. & JACQUES, T.A. (Eds) Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. **Proceedings** of 18th Alltech's Annual Symposium, Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 29-42.
- EDENS, F.W.; SEFTON, A.E. Sel-Plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.9, p. 853-861, 2009.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 88, p.343-52, 1990.
- HAWKES, W.C.; TUREK, P.J. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 764-772, 2001.
- HUANG, H.; OU, B.; PRIOR, R.L..The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p.1841-1856, 2005.
- IWANIER, K.; ZACHARA, B.A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoa quality characteristics in subfertile men. **Journal of Andrology**, v. 16, n.5, p.441-447, 1995.
- KRAUSE, D. **Untersuchungen am bullensperma unter berücksicertigung der fertilitäts diagnostis chen bedeutung der befunde.** Hannover, 1966. 165p. Tese (Livre Docência) – Tierärztliche Hochs Chule, Hannover.
- LIU, C.H.; CHEN, Y.M.; ZHANG, J.Z.; HUANG, M.Y.; SU, Q.; LU, Z.H.; YIN, R.X.; SHAO, G.Z.; FENG, D.; ZHENG, P.L. Preliminary studies on influence of selenium deficiency to the developments of genital organs and spermatogenesis of infancy boars. **Acta Vet. Zootech. Sin.** v.13, p.73-77, 1982.

- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2994-3003, 1997.
- MILLER, N.J.; RICE-EVABS, C.A. Factors influencing the antioxidants activity determined by ABTS+ radical cation assay. **Free Radical Research**, v. 26, p. 195-199, 1997.
- MORAES, P.M.; MILANTONIO, R.B; CAGNANI, G.S.; SANTOS, F.A.; PADILHA, C.C.F.; LIMA, P.M.; PADILHA P.M. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 409-414, 2009. DOI: 10.1007/s00217-009-1068-2.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy, 2006. 398p.
- OETTLÉ E.E.; SOLEY, J.T.: Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopy study. **Veterinary Medical Review**, v.59, p.28-70, 1988.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N.. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p.158-9, 1967.
- PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., BICUDO, S.D., LOPES, M.D., RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthypnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA CELULAR, 5, 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1986. p.86.
- PAPPAS, A.C.; KARADAS, F.; SPEAKE, B.K.; SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Detection and dietary manipulation of selenium in avian semen. **British Poultry Science**, v.1, 60-61, 2005.
- PAYA, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 205-214, 1992.
- PROTEGGENTE, A.R; ENGLAND, T.G.; REHMAN, A.; RICE-EVANS, C.A.; HALLIWELL, B.. Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. **Free Radical Research**, v. 36, p. 157-162, 2002.

- RICE-EVANS, C.A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. **Free Radical Research**, v. 33, p.59-66, 2000.
- ROY, A.C.; KARAUNANITHY, R.; RATHAM, S.S.; Correlation of serum level in human semen with sperm count/motility. **Archives of Andrology**, v.25, p.59-62, 1990.
- SAS Institute Inc., User Installation Guide for the SAS® System, Version 9.0 for Microsoft® Windows®, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002.
- 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, p. 76-80, 1998.
- SEGERSON, E.C.; GETZ, W.R.; JOHNSON, B.H. Selenium and reproductive function in boars fed low selenium diet. **Journal of Animal Science**, v.53, p.1360-1367, 1981.
- SHALINI, S.; BANSAL, M.P. Role of selenium in spermatogenesis: Differential expression of cjun and cfos in tubular cells of mice testis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 292, p. 27-38, 2006.
- SILVA, FA.; NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.O.M.A.; BARROS,M.M.; PEZZATO, L.E.; PADILHA P.M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, v. 68, p. 1542-1547, 2007.
- SMITH, D.G.; SENGER, P.L.; McCUTCHAN, J.F.; LANDA, C.A. Selenium and Glutathione Peroxidase Distribution in Bovine Semen and Selenium-75 Retention by the Tissues of the Reproductive Tract in the Bull. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 377-383, 1979.
- SURAI, P.F. Selenium in nutrition and health. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. 974p.
- SURAI, P.F. Selenium. In: **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 233-304.
- SURAI, P.F.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J.P.; WISHART, G.J.; CEROLINE, 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.

THOMSON, C.D.; ROBINSON, M.F.; WHANGER, P.D. Selenium (Se) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood components of New Zealand women during long-term supplementation with selenito or selenomethionine (Semet). In: Wendel, A. ed. **Selenium in Biology and Medicine**. Barlin: Springer Verlag, 1989. p. 254-257.

WU, S.H.; OLDFIELD, J.E.; WHANGER, P.D.; WESWIG, P.H. Effect of selenium, Vitamin E and antioxidants on testicular function in rats. **Biology of Reproduction**, v. 8, p.625-629, 1973.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

O conhecimento do valor nutritivo dos alimentos associado ao conhecimento das exigências nutricionais são indispensáveis para formulação de alimentos balanceados e fundamentais para os estudos de nutrição animal. Conhecimentos básicos sobre aproveitamento e biodisponibilidade são necessários para que nutricionistas possam ter informações precisas a respeito dos ingredientes em uso. Entretanto, poucas informações existem a respeito da biodisponibilidade de ingredientes para cães e gatos e, a grande parte dos trabalhos científicos avalia o efeito do ingrediente na dieta, não considerando a sua digestibilidade, de modo que informações primordiais à formulação adequada de dietas para animais não vem sendo estudadas.

O selênio está presente nos ingredientes na forma de selenometionina e selenocisteína, e acredita-se que ingredientes de origem vegetal apresentem menos quantidade desses seleno aminoácidos que os de origem animal. Muitos estudos mostram que os seleno aminoácidos são melhor absorvidos e utilizados do que o selenito de sódio e que podem ser armazenados no organismo.

A fonte de selênio comumente usada nos alimentos para cães e gatos é a fonte inorgânica. O seleno levedura pode ser boa alternativa para o uso de selenito de sódio em alimentos classificados como padrão e básica, pois estes apresentam ingredientes com baixa digestibilidade ou de qualidade inferior, e possuem poucos produtos de origem animal, sendo seu teor de selênio menor. Contudo, há de se considerar o preço deste produto em novas pesquisas.

Recentemente, foram lançados no mercado alimentos para cães reprodutores. O selênio orgânico neste estudo mostrou ser mais eficiente que o selenito de sódio em melhorar as características seminais; portanto, o uso do selênio orgânico neste tipo de alimento seria muito interessante.

Porém, ainda são necessários estudos sobre este mineral, tendo em vista que o selênio possui tantas funções que melhoram a saúde e longevidade dos animais de estimação. Torna-se necessário conhecer e entender sobre as fontes de selênio que são usadas na formulação de rações *Pet* e seus efeitos no organismo, podendo talvez alcançar um aproveitamento ótimo deste mineral, tanto pelo animal quanto pela indústria.