



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE
ANIMAL**

GUILHERME PEPINO BASTOS

**EFEITOS DA VITAMINA B12 E ÔMEGA 3 NA TEMPERATURA DO ESCROTO,
CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA, QUALIDADE ESPERMÁTICA E
HISTOLOGIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DOSE TÓXICA
DE CICLOFOSFAMIDA**

Presidente Prudente - SP
2019



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE
ANIMAL**

GUILHERME PEPINO BASTOS

**EFEITOS DA VITAMINA B12 E ÔMEGA 3 NA TEMPERATURA DO ESCROTO,
CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA, QUALIDADE ESPERMÁTICA E
HISTOLOGIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DOSE TÓXICA
DE CICLOFOSFAMIDA**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

Presidente Prudente - SP
2019

636.085
B324e

Bastos, Guilherme Pepino
Efeitos da vitamina B12 e ômega 3 na temperatura do escroto, concentração de testosterona, qualidade espermática e histologia testicular de ratos Wistar submetidos à dose tóxica de ciclofosfamida / Guilherme Pepino Bastos. Presidente Prudente, 2019.
56 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

1. Sêmen de ratos Wistar. 2. Vitamina B12. 3. Ômega 3.
I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mologni – CRB 8/6204

GUILHERME PEPINO BASTOS

EFEITOS DA VITAMINA B12 E ÔMEGA 3 NA TEMPERATURA DO ESCROTO, CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA, QUALIDADE ESPERMÁTICA E HISTOLOGIA TESTICULAR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DOSE TÓXICA DE CICLOFOSFAMIDA

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

Presidente Prudente, 24 de Junho de 2019.

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur (Orientador)
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Carlos Antonio de Miranda Bomfim
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Araçatuba - SP

Prof. Dr. Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Sandra Cristina Genaro
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Sandra Helena Gabaldi Wolf
Centro Universitário de Adamantina - UNIFAI
Adamantina - SP

DEDICATÓRIA

Dedico aqueles que foram realmente importantes para a conclusão deste projeto, a aqueles que inúmeras vezes me forneceram ajuda financeira e psicológica sempre que necessitei: meu pai José Carlos Bastos, minha mãe Vania Maria Pepino Bastos e minha avó Nilza Maçuquete Bastos. Aos meus colegas e amigos que me apoiaram e ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a meus pais e familiares que tornaram possível essa conquista.

Agradeço ao meu colega e amigo Prof. Edison Vieira Gonçalves, por toda a ajuda que me prestou para que eu pudesse compreender e explorar melhor os dados da estatística deste projeto.

Agradeço a meu coorientador Prof. Dr. Luís Roberto Almeida Gabriel Filho e sua esposa Profa. Dra. Camila Pires Cremasco por terem realizado as análises estatísticas deste projeto.

Agradeço a meus amigos Cléo Trevisan e Marcos Roberto Ramos, por terem me ajudado no processamento dos materiais.

Ao Prof. Paulo Felipe Izique Goiozo por todas as vezes que me ajudou durante o processamento e análise dos materiais.

Ao meu colega e amigo Leandro Costa Pereira que me ajudou e apoiou sempre que precisei no meu emprego, tornando possível a conclusão deste projeto.

Aos senhores e mestres que muito me ensinaram e influenciaram no meu caráter.

Aos professores que muito me ensinaram durante toda minha vida.

Ao professor Luiz Carlos Moura Leite (*In memoriam*), que na época de minha graduação em medicina veterinária incentivou a chegar onde cheguei.

A professora Liane Ziliotto pelo que me ensinou no grupo de estudos em oncologia e em suas aulas durante minha graduação em medicina veterinária, conhecimento este, que me ajudou muito neste trabalho.

Aos meus amigos animais de estimação, pelo apoio emocional e companhia que sempre me deram.

Aos meus colegas e parceiros de trabalho Luci Mara Miura Yamada e João Victor Rodrigues Amoris, por todas as vezes que me deram uma ajuda extra neste projeto.

A Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, por todo apoio prestado para a realização do projeto.

Ao programa de Pós graduação de Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, pelo apoio e pelo conhecimento sedido.

A CAPES pelo apoio financeiro fornecido durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr Marcelo George Mungai Chacur (Orientador) pelo esforço e dedicação durante a realização do projeto.

“Quando o comandante demonstrar fraqueza, não tiver autoridade, suas ordens não forem claras e seus oficiais e tropas forem indisciplinados, o resultado será o caos e a desorganização absoluta”. (Sun Tzu)

RESUMO

Efeitos da vitamina B12 e ômega 3 na temperatura do escroto, concentração de testosterona, qualidade espermática e histologia testicular de ratos Wistar submetidos à dose tóxica de ciclofosfamida

O dano aos túbulos seminíferos e aos espermatozoides causados pelo fármaco ciclofosfamida é um dos fatores limitantes para seu uso, podendo levar a infertilidade, devido a toxicidade marcante nos órgãos associada ao estresse oxidativo, sendo necessário o uso de substâncias antioxidantes como é o caso do ômega 3 e da vitamina B12. Objetivou-se estudar a influência da vitamina B12 e ômega 3, na histologia e funções dos testículos de ratos tratados com ciclofosfamida. Foram utilizados 96 ratos Wistar, divididos em oito grupos; controle, ômega 3, ciclofosfamida, ômega 3 e ciclofosfamida, vitamina B12, ômega 3 e vitamina B12, vitamina B12 e ciclofosfamida, ômega 3 com vitamina B12 e ciclofosfamida; recebendo alimentação padrão, e os respectivos tratamentos e suplementações durante 30, 45 e 60 dias, a dose tóxica de ciclofosfamida foi aplicada no 59º dia. Foram realizadas análises histológica e morfométrica, dos túbulos seminíferos, determinando-se o diâmetro, diâmetro da luz, altura do epitélio, motilidade e morfologia espermática, com leituras em microscópio óptico considerando o número de espermatozoides normais, com patologia de cabeça e cauda, com gota distal e proximal e o número total de defeitos, concentração de testosterona, e imagens termográficas do escroto para mensurar a temperatura. Os resultados foram submetidos a análise de variância, seguido de teste de Tukey, com significância de 5% ($P \leq 0,05$). Foram obtidos valores de diferenças significativas para diâmetro da luz do túbulo seminífero e ciclofosfamida (valores médios de $155,40 \pm 19,45 \mu\text{m}$ no grupo controle sem a ciclofosfamida, $112,00 \pm 24,29 \mu\text{m}$ no grupo controle com a ciclofosfamida); diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações (valores médios de $136,90 \pm 11,96 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 sem ciclofosfamida, $104,80 \pm 8,10 \mu\text{m}$ no grupo ômega 3 sem ciclofosfamida, $119,00 \pm 7,17 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 e ômega 3 sem ciclofosfamida); diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações com ciclofosfamida (valores médios de $116,30 \pm 20,48 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 com ciclofosfamida, $119,80 \pm 11,69 \mu\text{m}$ no grupo ômega 3 com ciclofosfamida, $119,90 \pm 9,58 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 e ômega 3 com ciclofosfamida); altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações (valores médios de $77,08 \pm 3,43 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 sem ciclofosfamida, $81,8 \pm 14,01 \mu\text{m}$ no grupo ômega 3 sem ciclofosfamida, $82,15 \pm 4,58 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 e ômega 3 sem ciclofosfamida); altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações com ciclofosfamida (valores médios de $75,58 \pm 6,60 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 com ciclofosfamida, $70,14 \pm 4,15 \mu\text{m}$ no grupo ômega 3 com ciclofosfamida, $73,72 \pm 4,92 \mu\text{m}$ no grupo vitamina B12 e ômega 3 com ciclofosfamida); motilidade espermática e ciclofosfamida; espermatozoides com gota distal e suplementação; e espermatozoides com gota distal e suplementação com ciclofosfamida. A suplementação realizada com ômega 3 demonstra eficiência para diminuir o número de espermatozoides com gota distal ($12,50 \pm 11,30\%$) dos grupos tratados com a ciclofosfamida. E a vitamina B12 tem melhor influência para baixar a incidência de espermatozoides com gota proximal ($0,25 \pm 0,46\%$) e com patologia de cauda ($11,40 \pm 4,70\%$), demonstrou ser a melhor para os níveis de testosterona no sangue dos ratos, quando comparados com as demais suplementações, se destacou na manutenção da altura do epitélio do túbulo seminífero ($77,08 \pm 3,43 \mu\text{m}$,

ciclofosfamida ausente, e $75,58 \pm 6,60 \mu\text{m}$, ciclofosfamida presente), a temperatura do escroto no 60º dia. A vitamina B12 e ômega 3 em conjunto geraram um efeito positivo para o diâmetro da luz do túbulo seminífero ($119,00 \pm 7,17 \mu\text{m}$, ciclofosfamida ausente, e $119,90 \pm 9,58 \mu\text{m}$, ciclofosfamida presente), e para a temperatura do escroto. Pode-se concluir que a suplementação realizada com ômega 3 demonstra eficiência para diminuir o número de espermatozoides com gota distal dos grupos tratados com a ciclofosfamida. Observa-se que a vitamina B12 influenciou de forma benéfica na qualidade do sêmen por reduzir a porcentagem de gota citoplasmática proximal. Observou-se também que a presente suplementação com vitamina B12 e ômega 3, não influenciou para melhoria da qualidade do sêmen com relação a patologia de cauda, patologia de cabeça e concentração sérica de testosterona nos animais tratados ou não com ciclofosfamida. Para as temperaturas do escroto houve influência negativa da ciclofosfamida associada ao ômega 3 na temperatura do escroto aos 60 dias do experimento. O diâmetro do túbulo seminífero sofreu influência positiva da associação do ômega 3 com a vitamina B12 aos 45 dias do experimento em relação a esse mesmo momento para os demais grupos experimentais.

Palavras chaves: túbulos seminíferos, termografia por infravermelho, motilidade dos espermatozoides, morfologia espermática, antioxidantes.

ABSTRACT

Effects of vitamin B12 and omega 3 on the temperature of the scrotum, testosterone concentration, sperm quality and testicular histology of Wistar rats submitted to the toxic dosage of cyclophosphamide

The damage to the seminiferous tubules and to the spermatozoa caused by the drug cyclophosphamide is one of the limiting factors for its use, which can lead to infertility due to marked toxicity in the organs associated with oxidative stress, being necessary the use of antioxidant substances as is the case of the omega 3 and vitamin B12. The aim of this study was to study the influence of vitamin B12 and omega 3 on the histology and functions of the testes of rats treated with cyclophosphamide. Wistar rats were divided into eight groups; control, omega 3, cyclophosphamide, omega 3 and cyclophosphamide, vitamin B12, omega 3 and vitamin B12, vitamin B12 and cyclophosphamide, omega 3 with vitamin B12 and cyclophosphamide; receiving standard feeding, and the respective treatments and supplements during 30, 45 and 60 days, the toxic dose of cyclophosphamide was applied on the 59th day. Histological and morphometric analyzes of the seminiferous tubules were performed, determining the diameter, light diameter, height of the epithelium, motility and sperm morphology, with optical microscope readings considering the number of normal spermatozoa with head and tail pathology, with distal and proximal drop and the total number of defects, testosterone concentration, and thermographic images of the scrotum to measure the temperature. The results were submitted to analysis of variance, followed by Tukey test, with significance of 5% ($P \leq 0.05$). Significant differences were obtained for the diameter of the seminiferous tubule and cyclophosphamide (mean values of $155.40 \pm 19.45 \mu\text{m}$ in the control group without cyclophosphamide, $112.00 \pm 24.29 \mu\text{m}$ in the control group with cyclophosphamide); seminiferous tubule light and supplements (mean values of $136.90 \pm 11.96 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 group without cyclophosphamide, $104.80 \pm 8.10 \mu\text{m}$ in the omega 3 group without cyclophosphamide, $119.00 \pm 7.17 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 and omega 3 group without cyclophosphamide); diameter of seminiferous tubule lumen and supplementation with cyclophosphamide (mean values of $116.30 \pm 20.48 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 group with cyclophosphamide, $119.80 \pm 11.69 \mu\text{m}$ in the omega 3 group with cyclophosphamide, $119.90 \pm 9, 58 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 and omega 3 group with cyclophosphamide); (mean values of $77.08 \pm 3.43 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 group without cyclophosphamide, $81.8 \pm 14.01 \mu\text{m}$ in the omega-3 group without cyclophosphamide, $82.15 \pm 4.58 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 and omega 3 group without cyclophosphamide); height of seminiferous tubule epithelium and supplementation with cyclophosphamide (mean values of $75.58 \pm 6.60 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 group with cyclophosphamide, $70.14 \pm 4.15 \mu\text{m}$ in the omega 3 group with cyclophosphamide, $73.72 \pm 4, 92 \mu\text{m}$ in the vitamin B12 and omega 3 group with cyclophosphamide); sperm motility and cyclophosphamide; spermatozoa with distal gout and supplementation; and spermatozoa with distal gout and cyclophosphamide supplementation. Omega 3 supplementation demonstrates efficiency in decreasing the number of spermatozoa with distal gout ($12.50 \pm 11.30\%$) in the groups treated with cyclophosphamide. And vitamin B12 has a better influence in lowering the incidence of spermatozoa with proximal gout ($0.25 \pm 0.46\%$) and with tail pathology ($11.40 \pm 4.70\%$), has been shown to be the best for testosterone in the rats compared to the other supplements was observed in maintaining the height of the seminiferous tubule epithelium ($77.08 \pm 3.43 \mu\text{m}$, absent cyclophosphamide and

75.58 ± 6.60 µm, cyclophosphamide present) , the temperature of the scrotum on the 60th day. Vitamin B12 and omega 3 together generated a positive effect on the diameter of the lumen of the seminiferous tubule (119.00 ± 7.17 µm, absent cyclophosphamide, and 119.90 ± 9.58 µm, cyclophosphamide present), and for the temperature of the scrotum. It can be concluded that the supplementation performed with omega 3 demonstrates efficiency to decrease the number of spermatozoa with distal gout in the groups treated with cyclophosphamide. It is observed that vitamin B12 had a beneficial influence on semen quality by reducing the percentage of proximal cytoplasmic droplet. It was also observed that the present supplementation with vitamin B12 and omega 3 did not influence the improvement of semen quality in relation to tail pathology, head pathology and serum testosterone concentration in animals treated with cyclophosphamide or not. For the scrotal temperatures, there was a negative influence of omega-3-associated cyclophosphamide at the temperature of the scrotum at 60 days of the experiment. The diameter of the seminiferous tubule was positively influenced by the association of omega 3 with vitamin B12 at 45 days of the experiment in relation to this same moment for the other experimental groups.

Keywords: seminiferous tubules, infrared thermography, sperm motility, sperm morphology, antioxidants.

SUMÁRIO

1	ARTIGO 1	13
2	ARTIGO 2	29
	ANEXO 1	46
	ANEXO 2	48

ARTIGO 1

**ARTIGO A SER ENVIADO PARA O PERIÓDICO ARQUIVO BRASILEIRO
DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Efeito da vitamina B12 e ômega 3 nos espermatozoides e concentração de testosterona
de ratos Wistar tratados com ciclofosfamida

Effect of vitamin B12 and omega-3 on spermatozoa and testosterone concentration of
Wistar rats treated with cyclophosphamide

Resumo

Objetivou-se estudar a influência da vitamina B12 e ômega 3, na motilidade e morfologia de espermatozoides da cauda do epidídimo; e concentração sérica de testosterona de ratos Wistar tratados com uma dose tóxica de ciclofosfamida. Foram utilizados 96 ratos Wistar, divididos em oito grupos, recebendo alimentação padrão, e suplementados com vitamina B12 (3 μ g) e ômega 3 (1g/Kg) pela via intraperitoneal, durante 30, 45 e 60 dias, recebendo uma dose de ciclofosfamida (200mg por Kg de peso) no 59º dia. Foram avaliadas a motilidade e morfologia espermáticas, e mensurada a concentração de testosterona presente no soro sanguíneo por radioimunoensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguido do teste de Tukey, com significância de 5% ($P \leq 0,05$). No presente trabalho, obtive-se correlações significativas ($P \leq 0,05$) para: motilidade espermática e quimioterapia; espermatozoides com gota distal e suplementação; e espermatozoides com gota distal e suplementação com quimioterapia. A suplementação realizada com ômega 3 demonstrou eficiência para diminuir o número de espermatozoides com gota distal (12,50 \pm 11,30%) dos grupos tratados com a ciclofosfamida. A vitamina B12 teve melhor influência para baixar a incidência de espermatozoides com gota proximal (0,25 \pm 0,46%).

Palavras chaves: termografia por infravermelho, motilidade dos espermatozoides, morfologia espermática, antioxidantes, reprodução.

Abstract

The objective of this study was to study the influence of vitamin B12 and omega 3 on the motility and morphology of spermatozoa in the tail of the epididymis; and serum testosterone concentration of Wistar rats treated with a toxic dose of cyclophosphamide.

A total of 96 Wistar rats were divided into eight groups, receiving standard feed and supplemented with vitamin B12 (3µg) and omega-3 (1g / kg) intraperitoneally for 30, 45 and in 60 days receiving a dose of cyclophosphamide (200mg per kg of body weight) on the 59th day. Sperm motility and morphology were evaluated and the concentration of testosterone present in the blood serum was measured by radioimmunoassay. Data were submitted to analysis of variance, followed by the Tukey test, with significance of 5% ($P \leq 0.05$). In the present study, significant correlations ($P \leq 0.05$) were obtained for: sperm motility and chemotherapy; spermatozoa with distal gout and supplementation; and spermatozoa with distal gout and supplementation with chemotherapy. Omega 3 supplementation demonstrated efficiency in decreasing the number of spermatozoa with distal gout ($12.50 \pm 11.30\%$) in the groups treated with cyclophosphamide. Vitamin B12 had a better influence in lowering the incidence of spermatozoa with proximal gout ($0.25 \pm 0.46\%$).

Keywords: infrared thermography, sperm motility, sperm morphology, antioxidants, reproduction.

Introdução

A ciclofosfamida é amplamente utilizada como agente antineoplásico e imunossupressor. É bem absorvida pelo sistema digestório, amplamente distribuída em tecidos e fluidos corporais, e metabolizada principalmente no fígado. Seu uso clínico é restrito devido sua toxicidade associada ao aumento do estresse oxidativo. Os danos as células do sistema reprodutor é um de seus efeitos colaterais, e pode levar a infertilidade pelo aumento das anormalidades espermáticas (Afkhami-Ardakani et al., 2018; Aghaie et al, 2016; Hegazy et al., 2015; Salimnejad et al., 2018).

Patrick-Iwuanyanwu et al. (2015) relataram que produtos químicos podem gerar danos à morfologia espermática, podendo ocorrer perdas significativas na motilidade, e o aumento significativos dos defeitos nos espermatozoides.

Os espermatozoides que contêm no DNA os materiais genômicos necessários para a reprodução, isto faz da célula espermática o alvo para as lesões podendo ter consequências adversas na função do esperma. Danos ao DNA juntamente com outros danos aos gametas podem afetar a fertilidade masculina (Ita et al., 2019).

O principal hormônio sexual masculino é a testosterona, o qual desempenha funções importantes no crescimento, desenvolvimento, espermatogênese e fertilidade masculina. Sua produção inicia-se durante a vida intrauterina e aumenta acentuadamente na puberdade, e depois diminui com a idade. Em ratos e camundongos machos com mais de 20 meses de idade, ocorre a queda na produção de testosterona, em conjunto com o declínio na fertilidade (Ayaz e Howlett, 2015; Risso et al, 2016).

Mendeluk et al. (2015) relataram que a maior ingestão de gorduras ômega-3 influencia positivamente na morfologia dos espermatozoides pela incorporação da membrana celular nos espermatozoides, pois podem ser usados para estruturar os componentes das membranas celulares e a bicamada lipídica, proporcionando fluidez e permeabilidade. Existem relatos que variam sobre o efeito da suplementação com ômega-3 nas concentrações de testosterona em diferentes espécies, sendo que em ratos aumenta a concentração de testosterona (Risso et al., 2016). Cardoso et al. (2018) citam a carne e o óleo de peixe como fontes de ômega-3 e também a presença deste em alguns vegetais. Merey et al. (2018) citaram a linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ω -3, podendo ser consumida na forma de farinha ou óleo.

A vitamina B12 é um elemento hidrossolúvel. Desempenha papel importante na síntese de DNA e divisão celular, sendo essencial para os processos que exigem alta taxa de renovação celular. Sua deficiência pode aumentar o número de espermatozoides anormais e diminuir a motilidade e a velocidade dos espermatozoides, reduzir a espermatogênese, bem como causar azoospermia em ratos machos. Porém a sua suplementação pode reverter estes quadros, sendo também utilizada para tratamento da infertilidade masculina (Damayanti et al., 2018; Beltrame e Sasso-Cerri, 2017; Nagao e Hirokawa, 2017; Hannibal et al., 2016; Vasiliausha et al., 2016; Hamedani et al., 2013).

A hipótese foi estudar se a vitamina B12 e o ômega 3 reduziriam os efeitos negativos da ciclofosfamida nos espermatozoides e na concentração de testosterona em ratos Wistar.

Objetivo

Estudar a influência da suplementação previa da vitamina B12 e ômega 3, na motilidade e morfologia de espermatozoides, e concentração sérica de testosterona de ratos Wistar quando tratados com a dose tóxica da ciclofosfamida.

Material e métodos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista, sob o protocolo 2995.

Foram utilizados 96 ratos machos Wistar, adultos jovens, pesando em média 284g, alimentados com água e ração (Padrão MP77®, Moinho Primor S.A., Brasil) a vontade e mantidos em biotério com ciclo de claro e escuro de 12/12 horas, em gaiolas coletivas, contendo quatro animais em cada gaiola.

Os ratos foram divididos em oito grupos (12 ratos por grupo) de forma aleatória. O primeiro grupo foi o controle (Ct) e recebeu água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; o segundo (ω 3) água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); o terceiro (Cc) água, ração padrão e ciclofosfamida; o quarto (ω 3Cc) água, ração padrão, ciclofosfamida, ômega-3; o quinto (B12) água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); o sexto (ω 3B12) água, ração padrão, ômega-3, e vitamina B12; o sétimo (B12Cc) água, ração padrão, vitamina B12 e ciclofosfamida; e o oitavo (ω 3B12Cc) água, ração padrão, ômega-3, vitamina B12, e ciclofosfamida.

Cada grupo de ratos foi subdividido em três caixas (quatro animais por caixa) onde permaneceram por 30, 45 e 60 dias, recebendo a solução salina estéril a 0,9%, ou o ômega-3-óleo de peixe (Ômega 3, Equaliv, Brasil) 1g/kg (Hirabara et al., 2013), e/ou a vitamina B12 (Monovin B12®, Bravet, Brasil) 3 μ g (Oliveira, 2013); por via intraperitoneal diariamente, nos respectivos grupos, as 9:00 h, durante todo período de experimento. Em cada intervalo de tempo foram eutanasiados quatro ratos (uma gaiola) de cada um dos grupos, fazendo uso de exsanguinação via punção cardíaca sob anestesia com tiobarbitúrico (Thiopentax®, Cristália, Brasil) com dose de 80 mg/kg de peso corpóreo via intraperitoneal.

A ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter, Brasil, São Paulo - SP) foi aplicada no 59º dia de experimento pela via intraperitoneal nos grupos Cc, ω 3Cc, B12Cc e ω 3B12Cc, em uma dose de 200mg por Kg de peso (20mL por Kg), de acordo com Kanno et al (2009). Nestes grupos não ocorreram sacrifícios aos 45 dias para se aumentar o número de ratos que receberam a ciclo fosfamida no 59º dia.

As análises da motilidade (capacidade de locomoção) e morfologia espermática foram realizadas nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento, após o sacrifício, dissecando a cauda do epidídimo para obter uma amostra de espermatozoides

depositada em lâmina e coberta por lamínula aquecidas a 37°C, e observada por microscopia óptica com contraste de fase (Eclipse 200®, Nikon, Japão).

Realizou-se a leitura da morfologia espermática em microscopia óptica com contraste de fase (1000x), contando-se 200 espermatozoides; considerando o número de espermatozoides normais, com patologia de cabeça, com patologia de cauda, com gota distal, com gota proximal e o número total de defeitos (Filler, 1993).

A dosagem do hormônio testosterona foi realizada com o uso do kit RIA testosterone direct (Beckman Coulter®), na Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu, São Paulo, Brasil, dosando a testosterona presente no soro sanguíneo, extraído por meio de punção cardíaca, de todos os ratos eutanasiados nos dias 30, 45 e 60 de todos os grupos experimentais.

Para Análise estatística foram usados os *softwares Minitab® 16.0* (Minitab, 2010) e *SigmaStat*. Os resultados foram submetidos a análise de variância, seguido de teste de Tukey, com significância de 5% ($P \leq 0,05$).

O delineamento considerado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8 x 3, para as variáveis com interação significativa entre os fatores (suplementação x épocas), foram realizadas comparações das épocas em cada tratamento alimentar, e também comparados os tratamentos em cada época. Já para as variáveis com interação não significativa, foram comparadas somente as épocas entre si ou somente os tratamentos alimentares entre si.

Resultados

No presente experimento, obteve-se correlações significativas ($P \leq 0,05$) para motilidade espermática e quimioterapia; espermatozoides com gota distal e suplementação; e espermatozoides com gota distal e suplementação com quimioterapia.

Quando estabeleceu-se uma comparação entre Motilidade Espermática, Número de Espermatozoides Normais e Número Total de Defeitos em Espermatozoides (Tabela 1), percebemos que a motilidade espermática geral (quando avaliado todos os grupos em conjunto) diminuiu no 60º dia, e o número total de defeitos aumentou. Parte deste aumento ocorreu devido a elevação do número de espermatozoides com gota distal como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 1. Médias das porcentagens de motilidade espermática (%), espermatozoides normais (%) e número total de espermatozoides (%) nos grupos experimentais nos momentos: 30, 45 e 60 dias.

Momentos (dias)	Motilidade espermática	Espermatozoides Normais	Total de Defeitos
30	88,40 ± 9,20 ^A	67,00 ± 12,50 ^A	32,90 ± 12,50 ^B
45	84,40 ± 7,30 ^{AB}	51,40 ± 16,20 ^B	48,60 ± 16,20 ^A
60	81,50 ± 8,90 ^B	55,90 ± 16,40 ^B	44,10 ± 16,40 ^A

Legenda: Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Observa-se na Tabela 2 que o ômega 3 influenciou os espermatozoides dos grupos com quimioterápico, e que com a presença do quimioterápico houve um aumento significativo na gota distal aos 60 dias, no qual o grupo que recebeu apenas a ciclofosfamida (Cc) obteve uma média e desvio padrão de $14,10 \pm 10,20$ %, respectivamente, enquanto o grupo que recebeu ômega 3 e ciclofosfamida ($\omega 3$ Cc) obteve $12,50 \pm 11,30$ %. No mesmo momento, o grupo $\omega 3$ apresentou uma média e desvio padrão ($8,30 \pm 3,50$ %) inferiores ao grupo Ct ($16,00 \pm 11,50$ %).

Na Tabela 3, observa-se que ao comparar os grupos $\omega 3$ Cc, B12Cc e $\omega 3$ B12Cc, no 60° dia, podemos perceber que obteve uma menor média e desvio padrão, para espermatozoides com gota proximal, foi o B12Cc ($0,25 \pm 0,46$ %), tendo a vitamina B12 apresentado uma melhor reação à ciclofosfamida para preservar os espermatozoides.

As variáveis número de espermatozoides com patologia de cauda (Tabela 4), número de espermatozoides com defeitos de cabeça (Tabela 5) e concentração sérica de Testosterona (Tabela 6), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e datas. Vale ressaltar que, a média de tais variáveis, acerca de todos dados observados (englobando todos grupos e datas), são $1,1 \pm 0,7$ ng/mL para a concentração sérica de Testosterona, $2,1 \pm 1,9$ % para a número de espermatozoides com defeitos de cabeça e $19,7 \pm 10$ % para a número de espermatozoides com defeitos de cauda.

A quantidade de espermatozoides com gota distal foi a que mais influenciou no número total de defeitos em espermatozoides.

Tabela 2: Médias de porcentagens de gota citoplasmática distal nos momentos de colheita nos grupos experimentais.

Grupo	Momentos (dias)		
	30	45	60
Ct	4,50 ± 4,00 ^{Aa}	24,00 ± 14,80 ^{Aa}	16,00 ± 11,50 ^{Ab}
ω3	5,80 ± 3,90 ^{Ba}	28,50 ± 17,80 ^{Aa}	8,30 ± 3,50 ^{ABb}
Cc	3,30 ± 2,90 ^{Aa}	—	14,10 ± 10,20 ^{Ab}
ω3Cc	11,50 ± 12,20 ^{Aa}	—	12,50 ± 11,30 ^{Ab}
B12	10,00 ± 9,80 ^{Aa}	22,80 ± 4,50 ^{Aa}	11,00 ± 9,70 ^{Ab}
ω3B12	6,70 ± 8,10 ^{Ba}	24,00 ± 26,00 ^{ABa}	32,30 ± 20,40 ^{AAb}
B12Cc	13,30 ± 9,70 ^{Ba}	—	40,30 ± 14,20 ^{Aa}
ω3B12Cc	15,80 ± 12,20 ^{Aa}	—	19,10 ± 11,50 ^{Ab}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Tabela 3: Médias de porcentagens de gota citoplasmática proximal nos momentos de colheita nos grupos experimentais.

Grupos	Momentos das colheitas (dias)		
	30	45	60
Ct	0,00 ± 0,00 ^{Ab}	0,50 ± 0,58 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Ab}
ω3	0,50 ± 1,00 ^{Bab}	1,25 ± 1,50 ^{ABa}	2,67 ± 2,31 ^{Aa}
Cc	2,50 ± 1,92 ^{Aa}	—	0,14 ± 0,38 ^{Bb}
ω3Cc	1,25 ± 1,89 ^{Aab}	—	0,29 ± 0,49 ^{Ab}
B12	1,50 ± 1,73 ^{Aab}	0,50 ± 0,58 ^{Aa}	0,50 ± 0,58 ^{Aab}
ω3B12	1,00 ± 1,73 ^{Aab}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	1,00 ± 1,16 ^{Ab}
B12Cc	0,50 ± 0,58 ^{Aab}	—	0,25 ± 0,46 ^{Aab}
ω3B12Cc	0,25 ± 0,50 ^{Aab}	—	0,88 ± 1,25 ^{Aab}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Tabela 4: Médias de porcentagens de defeitos de cauda nos momentos de colheita nos grupos experimentais.

Grupos	30	45	60
Ct	20,00 ± 5,00 ^{Aa}	29,50 ± 6,60 ^{Aa}	14,50 ± 10,70 ^{Aa}
ω3	18,50 ± 12,40 ^{Aa}	16,00 ± 2,40 ^{Aa}	29,00 ± 3,60 ^{Aa}
Cc	28,80 ± 24,20 ^{Aa}	-	18,50 ± 11,20 ^{Aa}
ω3Cc	25,00 ± 17,60 ^{Aa}	-	24,10 ± 15,00 ^{Aa}
B12	15,50 ± 4,40 ^{Aa}	16,80 ± 9,00 ^{Aa}	21,50 ± 5,70 ^{Aa}
ω3B12	24,00 ± 9,50 ^{Aa}	19,50 ± 0,60 ^{Aa}	13,30 ± 3,80 ^{Aa}
B12Cc	14,30 ± 3,50 ^{Aa}	-	11,40 ± 4,70 ^{Aa}
ω3B12Cc	27,00 ± 14,30 ^{Aa}	-	21,60 ± 6,70 ^{Aa}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras iguais não diferem entre si.

Tabela 5: Médias de porcentagens de defeitos de cabeça nos momentos de colheita nos grupos experimentais.

Grupos	30	45	60
Ct	4,80 ± 4,30 ^{Aa}	1,30 ± 1,00 ^{Aa}	4,00 ± 1,80 ^{Aa}
ω3	0,80 ± 1,00 ^{Aa}	4,00 ± 1,60 ^{Aa}	1,70 ± 2,10 ^{Aa}
Cc	1,00 ± 2,00 ^{Aa}	-	2,10 ± 1,50 ^{Aa}
ω3Cc	1,30 ± 0,50 ^{Aa}	-	2,10 ± 1,90 ^{Aa}
B12	1,80 ± 2,90 ^{Aa}	3,00 ± 2,60 ^{Aa}	2,30 ± 2,10 ^{Aa}
ω3B12	0,70 ± 0,60 ^{Aa}	3,00 ± 2,40 ^{Aa}	2,80 ± 2,10 ^{Aa}
B12Cc	0,80 ± 0,50 ^{Aa}	-	1,40 ± 1,20 ^{Aa}
ω3B12Cc	1,30 ± 0,50 ^{Aa}	-	2,60 ± 0,90 ^{Aa}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras iguais não diferem entre si.

Tabela 6 – Médias das concentrações séricas de testosterona (ng/mL) nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento nos grupos experimentais.

Grupos	Datas		
	30	45	60
Ct	1,40 ± 0,90 ^{Aa}	1,10 ± 0,90 ^{Aa}	0,90 ± 0,30 ^{Aa}
ω3	1,10 ± 0,30 ^{Aa}	1,10 ± 0,50 ^{Aa}	1,80 ± 0,70 ^{Aa}
Cc	1,70 ± 0,80 ^{Aa}	---	1,50 ± 1,10 ^{Aa}
ω3Cc	1,60 ± 0,80 ^{Aa}	---	0,50 ± 0,20 ^{Aa}
B12	1,20 ± 1,50 ^{Aa}	0,90 ± 0,20 ^{Aa}	1,80 ± 1,70 ^{Aa}
ω3B12	1,30 ± 0,20 ^{Aa}	0,70 ± 0,20 ^{Aa}	1,00 ± 0,10 ^{Aa}
B12Cc	1,30 ± 0,90 ^{Aa}	---	0,60 ± 0,30 ^{Aa}
ω3B12Cc	0,80 ± 0,20 ^{Aa}	---	0,50 ± 0,10 ^{Aa}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Letras iguais não diferem entre si.

Discussão

No presente experimento, percebeu-se que em todos os grupos tratados com quimioterápico ocorreu um aumento no número total de defeitos em espermatozoides e uma queda na motilidade espermática. Aghaie et al. (2015) relataram em sua pesquisa que nos ratos tratados com Ciclofosfamida, a motilidade dos espermatozoides diminuiu e os anormais ou mortos aumentaram significativamente. Isso pode ocorrer devido ao aumento da quantidade de radicais livres derivados do oxigênio, pois os espermatozoides são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo (Afkhami-Ardakani et al., 2018; Alahmar, 2019). Além disso, o aumento do estresse oxidativo pode afetar adversamente as proporções de ácidos graxos poliinsaturados, que são importantes para fornecer fluidez durante eventos de fusão de membrana, como a reação acrossômica, as interações entre o espermatozoide e a motilidade (Alahmar, 2019). Sabeti et al. (2016) relataram que o ROS (espécies reativas de oxigênio) causam danos aos espermatozoides como cabeça anormal, defeitos de acrossomos, gota citoplasmática e defeitos de cauda, sendo que, o citoplasma residual ou a gota citoplasmática podem

ser considerados como um dos mais importantes. No presente experimento, o defeito que ocorreu com maior frequência foi a gota citoplasmática distal.

O ômega 3 teve seu melhor resultado para diminuir o número de espermatozoides com gota citoplasmática distal quando analisados os grupos Cc e ω 3Cc, sendo este um fato importante para o presente experimento, pois a gota citoplasmática distal teve forte impacto no número de defeitos totais em espermatozoides. Segundo Lass e Belluzzi (2019), a aquisição de motilidade durante a maturação espermática e a passagem pelo epidídimo está intimamente relacionada à função mitocondrial e parece ocorrer paralelamente à migração das gotas citoplasmáticas. E segundo Hosseini et al. (2019), o ômega-3 aumenta significativamente a motilidade espermática.

A vitamina B12 foi a melhor suplementação para diminuir a incidência de espermatozoides com gota proximal, quando comparado aos demais grupos que receberam a ciclofosfamida. Yamada et al. (2019) relataram em seu artigo que ao avaliar a morfologia espermática de ratos que receberam apenas vitamina B12 como suplementação apresentaram maior número de espermatozoides normais em comparação com os grupos controle, suplementados com ômega 3 e suplementados com ômega 3 e vitamina B12.

No experimento, a concentração sérica de testosterona não revelou significância estatística entre os grupos e momentos. Porém, Afkhami-Ardakani et al. (2018) relataram que além do estresse oxidativo, a Ciclofosfamida pode gerar também alterações enzimáticas e hormonais.

Uma dieta rica em antioxidantes pode influenciar na qualidade de vida dos indivíduos tratados com a Ciclofosfamida, minimizando os efeitos colaterais adversos (Olayinka et al., 2015; Masara et al., 2015; Afkhami-Ardakani et al., 2018; Salimnejad et al., 2018; Hegazy et al., 2015). No presente experimento pode-se perceber que o uso de antioxidantes, na forma de suplementação parenteral, teve um impacto benéfico na qualidade dos espermatozoides, principalmente em relação a diminuição do número de espermatozoides com gota citoplasmática distal, fator este que foi o principal responsável pelo aumento do número de defeitos totais em espermatozoides, em ratos machos tratados com ciclofosfamida.

Conclusão

Pode-se concluir que a suplementação realizada com ômega 3 demonstra eficiência para diminuir o número de espermatozoides com gota distal dos grupos tratados com a ciclofosfamida. Observa-se que a vitamina B12 influenciou de forma benéfica os espermatozoides por reduzir a porcentagem de gota citoplasmática proximal. Observou-se também que a presente suplementação com vitamina B12 e ômega 3, não influenciou para melhoria da qualidade dos espermatozoides com relação a defeitos de cauda e cabeça e concentração sérica de testosterona nos animais tratados ou não com ciclofosfamida.

Referências bibliográficas

AFKHAMI-ARDAKANI, M.; HASANZADEH, S.; SHAHROOZ, R.; DELIREZH, N.; MALEKINEJAD, H. Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Veterinary Research Forum*. v.9, p.35–41. 2018.

AGHAIE, S.; NIKZAD, H.; MAHABADI, J.A.; TAGHIZADEH, M.; AZAMI-TAMEH, A.; TAHERIAN, A.; SAJJADIAN, S.M.S.; KAMANI, M.; Protective effect of combined pumpkin seed and ginger extracts on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with cyclophosphamide. *Anatomical Science International*. v.91. p.382–390. 2016.

ALAHMAR, A.T. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *Journal of Human Reproductive Sciences*. v.12. p.4-18. 2019.

AYAZ, O.; HOWLETT S.E. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biology of Sex Differences*. v.6. 2015.

BELTRAME, F.L.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B12-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian Journal of Andrology*. v.19. p.567–572. 2017.

CARDOSO, I.B.; BARBOSA, L.B.; GARRIDO, J.G.S; VASCONCELOS, S.M.L. consumo de ômega 3 em hipertensos de Maceió-AL. *GEP News*, v.1. n.1, p.99-104. 2018.

DAMAYANTI, D.; JACELDO-SIEGL, K.; BEESON, W.L.; FRASER, G.; ODA, K.; HADDAD, E.H. Foods and Supplements Associated with Vitamin B12 Biomarkers among Vegetarian and Non-Vegetarian Participants of the Adventist Health Study-2 (AHS-2) Calibration Study. *Nutrients*. v.10. p.722. 2018.

FILLER, R. Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: CHAPIN, J.H.H. (Ed.). *Male reproductive toxicology*. California: Academic Press, p.334-343. 1993.

HAMEDANI, M.A.; TAHMASBI, A.M.; AHANGARI, Y.J. Effects of vitamin b₁₂ supplementation on the quality of ovine spermatozoa. *Open Vet J*. v.3. p.140–144. 2013.

HANNIBAL, L.; LYSNE, V.; BJØRKE-MONSEN, A.L.; BEHRINGER. S.; GRÜNERT, S.C.; SPIEKERKOETTER, U.; JACOBSEN, D.W.; HENK, J.; BLOM, H.J. Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin b12 deficiency *Frontiers in Molecular Biosciences*. v.3. 2016.

HEGAZY, R.M.; FARUK, E.M.; ELGENDY, F.S.; MEHLAB, E.M. Melatonin versus omega-3 fatty acid as possible antioxidants against cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in adult albino rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. v.6. p.440 – 452. 2015.

HIRABARA, S.M.; FOLADOR, A.; FIAMONCINI, J.; LAMBERTUCCI, R.H. RODRIGUES JR, C.F.; ROCHA, S.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI. R.K.; MARTINS, A.R.; RODRIGUES, A.C.; CARPINELLI, A.R.; PITHON-CURI, T.C.; FERNANDES, L.C.; GORJÃO, R.; CURI, R. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *J. Nutr. Biochem*. v.24. p.1136-1145. 2013.

HOSSEINI, B.; NOURMOHAMADI, M.; HAJIPOUR, S.; TAGHIZADEH, M.; ASEMI, Z.; KESHAVARZ, S.A.; JAFARNEJAD, S. The Effect of Omega-3 Fatty Acids, EPA, and/or DHA on Male Infertility: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Dietary Supplements*. v.16. p.245-256. 2019.

ITA, S.O.; FRANCIS, E.E.; EDA, A.U.; ABIA, E.R. Anti-Inflammation Potentials of Ageratum Conyzoides against Crude Oil-Induced Inflammation and Sperm DNA Damage in Male Wistar Rats. *Journal of Current Medical Research and Opinion*. v.2. p.66-71. 2019.

KANNO, T.Y.N.; SENSIAE, L.A.; PAULA, N.A.; SALLES, M.J.S. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.45. n.2. p.313-319. 2009.

LASS, A.; BELLUZZI, A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and IVF treatment. *Reproductive BioMedicine Online*.v.38. p.95-99. 2019.

MANSARA, P.; KETKAR, M.; DESHPANDE, R.; CHAUDHARY, A.; SHINDE, K.; KAUL-GHANEKAR, R. Improved antioxidant status by omega-3 fatty acid supplementation in breast cancer patients undergoing chemotherapy: a case series, Mansara et al. *Journal of Medical Case Reports*. v.9. p.148. 2015.

MENDELUK, G.R.; COHEN, M.I.; FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Nutrition and reproductive health: sperm versus erythrocyte lipidomic profile and ω -3 intake. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2015.

MEREY, L.S.F.; PALHARES, D.B.; PORTO, K.R.A.; MULLER K.T.C. Ácidos graxos polinsaturados no sangue de gestantes suplementadas com ômega-3 e óleo de linhaça dourada. *Interações*. v.19. n.4. p.845-853. 2018.

NAGAO, T.; HIROKAWA, M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *Journal of General and Family Medicine*. v.18. p.200-204. 2017.

OLIVEIRA, B. *Vitamina B12 exerce um efeito benéfico sobre a espermatogênese após depleção de espermatogônias causada pelo Busulfan®*. 2013. 50f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

PATRICK-IWUANYANWU, K.C.; UDOWELLE, N.A.; OKEREKE, C.J. Testicular toxicity and sperm quality following exposure to Solignum®: A Permethrin-containing wood preservative in adult male Wistar rats. *Journal of Interdisciplinary Histopathology*. v.0. n.0. p.0-0. 2015.

RISSO, A.; PELLEGRINO, F.J.; RELING, A.E.; CORRADA, Y. Effect of long-term fish oil supplementation on semen quality and serum testosterone concentrations in male dogs *Int J Fertil Steril*. v.10. p.223–231. 2016.

SABETI, P.; POURMASUMI, S.; RAHIMINIA, T. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int. J. Reprod. Biomed*. v.14. p.231-240. 2016.

SALIMNEJAD, R.; RAD, J.S.; NEJAD, D.M. Protective Effect of Ghrelin on Oxidative Stress and Tissue Damages of Mice Testes Followed by Chemotherapy With Cyclophosphamide. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*. v.5. p.138–143. 2018.

VASILIAUSHA, S.R.; BELTRAME, F.L.; SANTI, F.; CERRI, P.S.; CANEGUIM, B.H.; SASSO-CERRI, E. Seminiferous epithelium damage after short period of busulphan treatment in adult rats and vitamin B12 efficacy in the recovery of spermatogonial germ cells. *International Journal of Experimental Pathology*. v.97. p.317–328. 2016.

YAMADA, L.M.M.; SOUZA, C.D.; BRANCO, I.T.; ANDRADE, I.B.; DEAK, F.L.G.B.; BASTOS, G.P.; SILVA, J.G.; AMORIS, J.V.R.; YAMADA, L.Y.; GOIOZO, P.F.I.; CREMASCO, C.P.; GABRIEL FILHO, L.R.A.; CHACUR, M.G.M. Efeito do ômega 3 e da vitamina B12 no espermograma, na histomorfometria dos órgãos reprodutivos e nas temperaturas do corpo com termografia infravermelha em ratos Wistar. *Agruivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.v.71. n.1. p.211-218. 2019.

ARTIGO 2

**ARTIGO A SER ENVIADO PARA O PERIÓDICO ARQUIVO BRASILEIRO
DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Efeito da vitamina B12 e ômega 3 na histologia e temperatura dos testículos de ratos
Wistar tratados com ciclofosfamida

Effect of vitamin B12 and omega-3 on histology and temperature of Wistar rat testis
treated with cyclophosphamide

Resumo

Objetivou-se estudar a influência da vitamina B12 e ômega 3 na histomorfometria e na temperatura de testículos de ratos Wistar tratados com ciclofosfamida. Foram utilizados 96 ratos Wistar, divididos em oito grupos, suplementados com vitamina B12, ômega 3 durante 30, 45 e 60 dias, recebendo uma dose de ciclofosfamida no 59º dia. Foram realizadas análises histológicas e morfométrica, dos túbulos seminíferos, determinando-se os diâmetros do túbulo seminífero, da luz do túbulo seminífero, altura do epitélio do túbulo seminífero, e imagens termográficas do escroto para mensurar a temperatura. Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey, com significância de 5% ($P \leq 0,05$). Foram obtidos valores de $P < 0,05$ para diâmetro da luz do túbulo seminífero e ciclofosfamida; diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações; diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações com ciclofosfamida; altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações; altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações com ciclofosfamida. A B12 destacou-se na manutenção da altura do epitélio do túbulo seminífero e na temperatura do escroto no 60º dia. A B12 e ômega 3 em conjunto geraram efeito positivo para o diâmetro da luz do túbulo seminífero, e para a temperatura do escroto.

Palavras chaves: reprodução, termografia por infravermelho, suplementação, antioxidantes, túbulos seminíferos.

Abstract

The aim of this study was to study the influence of vitamin B12 and omega 3 on the histomorphometry and temperature of test of Wistar rats treated with cyclophosphamide. Wistar rats were divided into eight groups, supplemented with vitamin B12, omega 3 for 30, 45 and in 60 days, receiving a dose of cyclophosphamide

on the 59th day. Histological and morphometric analyzes were performed on the seminiferous tubules, determining the seminiferous tubule diameters, seminiferous tubule light, seminiferous tubule epithelium height, and thermographic images of the scrotum to measure temperature. The results were submitted to analysis of variance, followed by Tukey test, with significance of 5% ($P \leq 0.05$). P values < 0.05 were obtained for the diameter of the seminiferous tubule and cyclophosphamide light; seminiferous tubule lumen diameter and supplementation; diameter of seminiferous tubule lumen and cyclophosphamide supplementation; height of seminiferous tubule epithelium and supplementation; height of seminiferous tubule epithelium and cyclophosphamide supplementation. B12 was characterized in maintaining the height of the epithelium of the seminiferous tubule and the temperature of the scrotum on the 60th day. B12 and omega 3 together has generated a positive effect on the diameter of the lumen of the seminiferous tubule and on the temperature of the scrotum.

Keywords: reproduction, infrared thermography, supplementation, antioxidants, seminiferous tubules.

Introdução

Os túbulos seminíferos são estruturas tubulares especiais nos testículos que produzem espermatozoides continuamente. Eles se desenvolvem a partir dos cordões testiculares das gônadas embrionárias. O epitélio seminífero adulto é dividido em 14 a 12 estágios em ratos com base na associações de células espermatogênicas em quatro ciclos de espermatogênese. Em contraste, as características gerais dos próprios túbulos seminíferos de ratos permanecem largamente desconhecidas. Os túbulos externos e internos de ratos formam redes funil e cônica, respectivamente. Os túbulos externos entram em contato com a túnica albugínea, enquanto os internos não (Nakata et al., 2015).

O uso clínico da ciclofosfamida é restrito devido sua toxicidade marcante nos órgãos associada ao aumento do estresse oxidativo, da inflamação, lesões em tecidos normais, disfunções bioquímicas, aumento dos níveis de ácido, infertilidade por danos ao sistema reprodutor, alquilação de moléculas de DNA. O crescente uso desta droga levou a procura por compostos eficazes em proteger os usuários contra os efeitos colaterais indesejáveis em múltiplos órgãos. É amplamente utilizada como agente antineoplásico e imunossupressor (Afkhami-Ardakani et al., 2018; Aghaie et al, 2016;

Hegazy et al., 2015; Nafees et al., 2015; Olayinka et al., 2015; Oyagbemi et al., 2016; Salimnejad et al., 2018; Satyam e Kurady, 2016).

Os ácidos graxos ômega-3 (ω -3) são ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs) de origem vegetal e marinha. São essenciais e não podem ser sintetizados pelo corpo humano, devendo ser derivados de fontes alimentares. Muitos estudos documentam seus efeitos antioxidantes, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios (Hegazy et al., 2015). Cardoso et al. (2018) citaram a carne e o óleo de peixe como fontes de ômega-3 e também a presença deste em alguns vegetais. Meroy et al. (2018) citaram a linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte de ω -3, podendo ser consumida na forma de farinha ou óleo.

A vitamina B12 (“cobalamina”, o nome químico) é um elemento essencial solúvel em água sendo um micronutriente exigido por todas as células do corpo, pois desempenha papel importante na síntese de DNA e divisão celular. É um cofator essencial para a metionina sintase durante a produção de purinas e pirimidinas, sendo necessária para os processos que exigem alta taxa de renovação celular. Sua deficiência é a causa mais comum de anemia megaloblástica, além de gerar alterações testiculares como redução do peso dos testículos, atrofia dos túbulos seminíferos. A suplementação dos animais com vitamina B12 tem mostrado recuperar as funções testiculares (Beltrame e Sasso-Cerri, 2017; Damayanti et al., 2018; Hamedani et al., 2013; Hannibal et al., 2016; Nagao e Hirokawa, 2017; Vasiliausha et al., 2016).

De acordo com Rios et al. (2019), a termografia infravermelha é uma técnica não invasiva que atrai cada vez mais atenção, sendo acompanhada pelo avanço nas características das câmeras de infravermelho, que veio junto com sua redução progressiva de custos, expandindo o uso dessa técnica para muitas aplicações. Segundo Fidut-Wrońska et al. (2019), por meio de uma câmera termográfica, é possível avaliar as mudanças na temperatura do corpo na área examinada. Całkosiński et al. (2015) relataram terem usado a termografia por infravermelho em ratos para avaliar a elevação de temperatura em áreas do corpo inflamadas, e em seu experimento declararam que seu uso apresentou-se vantajoso na espécie, pois permite diminuir o número de animais nos experimentos e possibilita avaliar a ação de fármacos anti-inflamatórios e as fases da inflamação nestes animais.

A hipótese deste estudo é que a vitamina B12 e ômega 3 influenciariam positivamente na manutenção da histomorfometria dos testículos dos animais tratados ou não com ciclofosfamida, e manteriam a temperatura normal no testículo destes animais, devido a diminuição do dano celular.

Objetivo

Estudar a influência da vitamina B12 e ômega 3, na histomorfometria e na temperatura de testículos de ratos Wistar tratados com ciclofosfamida.

Material e métodos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista, sob o protocolo 2995.

Foram utilizados 96 ratos machos Wistar, adultos jovens, pesando em média 284g, alimentados com água e ração (Padrão MP77®, Moinho Primor S.A., Brasil) a vontade e mantidos em biotério com ciclo de claro e escuro de 12/12 horas, em gaiolas coletivas, contendo quatro animais cada gaiola.

Os ratos foram divididos em oito grupos (12 ratos por grupo) de forma aleatória, o primeiro grupo foi o controle (Ct) e recebeu água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; o segundo (ω 3) água, ração padrão e ômega-3; o terceiro (Cc) água, ração padrão e ciclofosfamida; o quarto (ω 3Cc) água, ração padrão, ciclofosfamida, ômega-3; o quinto (B12) água, ração padrão, vitamina B12; o sexto (ω 3B12) água, ração padrão, ômega-3, e vitamina B12; o sétimo (B12Cc) água, ração padrão, vitamina B12 e ciclofosfamida; e o oitavo (ω 3B12Cc) água, ração padrão, ômega-3, vitamina B12, e ciclofosfamida.

Cada grupo de ratos foi subdividido em três caixas (quatro animais por caixa) onde permaneceram por 30, 45 e 60 dias, recebendo a solução salina estéril a 0,9%, ou o ômega-3—óleo de peixe (Ômega 3, Equaliv, Brasil) 1g/kg (Hirabara et al., 2013), e/ou a vitamina B12 (Monovin B12®, Bravet, Brasil) 3 μ g (Oliveira, 2013); por via intraperitoneal diariamente, nos respectivos grupos, as 9:00 h, durante todo período de experimento. Em cada intervalo de tempo foram eutanasiados quatro ratos (uma gaiola) de cada um dos grupos, fazendo uso de exsanguinação via punção cardíaca sob anestesia com tiobarbitúrico (Thiopentax®, Cristália, Brasil) com dose de 80 mg/kg de peso corpóreo via intraperitoneal.

Após as eutanásias foram coletados os testículos (fixados imediatamente em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas; e após em álcool 70°GL até o processamento histológico).

A ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter, Brasil, São Paulo - SP) foi aplicada no 59° dia de experimento pela via intraperitoneal nos grupos Cc, ω 3Cc, B12Cc e ω 3B12Cc, em uma dose de 200mg por Kg de peso (20mL por Kg), de acordo com Kanno et al (2009). Nestes grupos não ocorreram sacrifícios aos 45 dias para se aumentar o número de ratos que receberam a ciclo fosfamida no 59° dia.

Sendo assim, foram consideradas duas classes de delineamentos. A primeira, consistindo em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2, sendo 4 tratamentos de suplementação parenteral (controle, B12, ômega 3, B12 e ômega 3) com 2 características quanto ao quimioterápico (ausência ou presença). Este delineamento foi somente considerado para as amostras da época final do experimento (60 dias).

A segunda classe de delineamento foi também inteiramente casualizada, agora em esquema fatorial 8 x 3 (8 tratamentos de suplementação alimentar em 3 épocas distintas), com 12 repetições.

Após a fixação, os testículos foram processados e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análises histológica e morfométrica em cortes de 5 μ m de espessura. Os cortes foram fotografados em microscópio trilocular (TIM-108®, Opton, Japão) com a câmera Opton TA0124 1,3 megapixel® (Opton, Japão). Para as análises morfométricas, utilizou-se programa computacional (*Software Motic Images Plus® version 2.0*) (Motic China Group CO., LTD, 2010) e foram realizadas mensurações de 10 campos, dos componentes teciduais dos testículos.

Nos testículos (Fig. 1), determinou-se o diâmetro, diâmetro da luz, e altura do epitélio do túbulo seminífero.

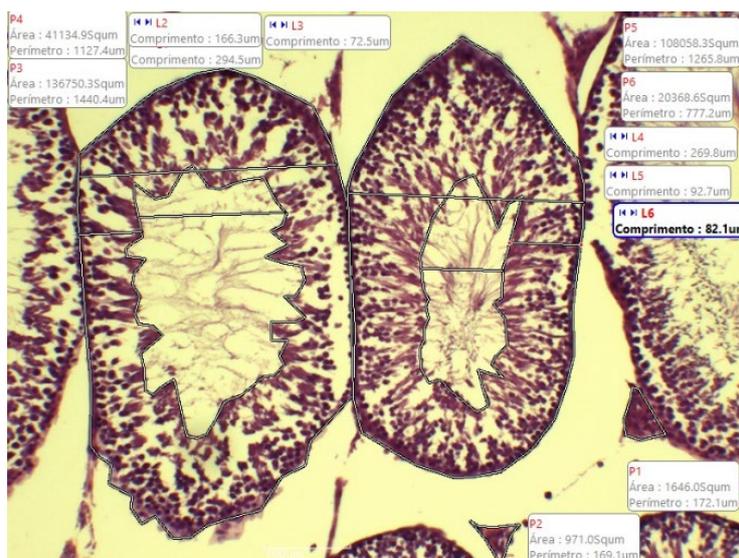


Fig. 1: Imagem de lâmina histopatológica do testículo (túbulos seminíferos) – de um rato pertencente ao grupo Ct (controle) – padrão de mensuração dos cortes nas análises morfométricas.

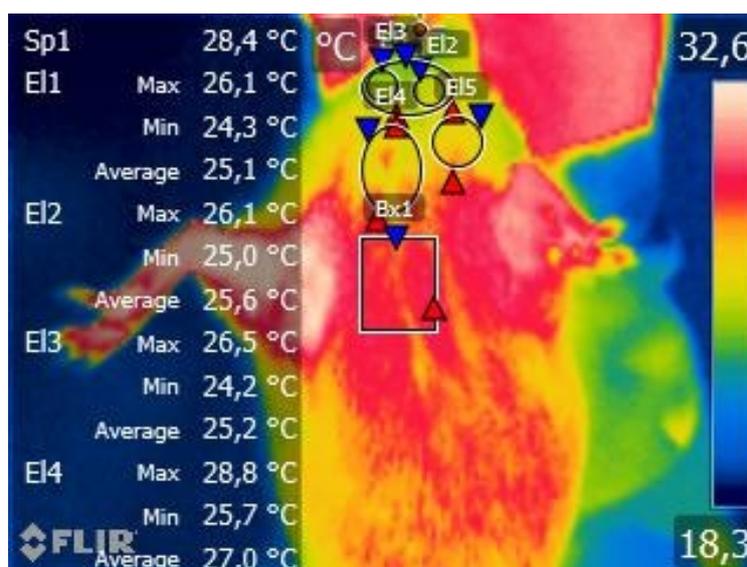


Fig 2: Termografia por infravermelho do escroto (°C) – de um rato pertencente ao grupo Ct (controle) – padrão de aferição de temperatura das imagens termográficas.

Foram feitas imagens termográficas do escroto (Fig. 2) para mensurar a temperatura do mesmo, fazendo uso de uma câmera termográfica Flir E-40, Suécia. Para se avaliar o efeito que a suplementação tem sobre a temperatura do escroto. As imagens termográficas foram feitas durante todo período de experimentação, sempre antes de qualquer outro manuseio dos animais para evitar situações estressantes. Para mitigar o estresse, antes dos procedimentos, os animais foram retirados da caixa, e as

imagens capturadas com o foco emissor a 30cm do escroto. As imagens foram processadas pelo programa *Flir Tools 2.1*® (Flir Systems, EUA), com o uso de polígonos para mensurar temperaturas das áreas estudadas.

Para Análise estatística foram usados os *softwares Minitab*® 16.0 (Minitab, 2010) e *SigmaStat*. Os resultados foram submetidos a análise de variância, seguido de teste de Tukey, com significância de 5% ($P \leq 0,05$).

Para todos delineamentos considerados, para as variáveis com interação significativa entre os fatores (suplementação x épocas), foram realizadas comparações do primeiro fator em cada nível do segundo fator, e também comparados o segundo fator em cada nível do primeiro. Já para as variáveis com interação não significativa, foram comparadas somente os níveis de cada fator que apresentou diferença significativa. Para as variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre os fatores e na interação, não foram realizadas comparações.

Especificamente, a primeira classe de delineamento possuía como primeiro fator os tratamentos de suplementação parenteral, e segundo fator, as características quanto ao presença ou ausência do quimioterápico. Na segunda classe, definiu-se o primeiro fator como sendo os tratamentos de suplementação alimentar, e o segundo fator as épocas distintas.

Resultados

Após o término das análises de correlação obtivemos valores de $P \leq 0,05$ para diâmetro da luz do túbulo seminífero e quimioterapia; diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações; diâmetro da luz do túbulo seminífero e suplementações com quimioterapia; altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações; altura do epitélio do túbulo seminífero e suplementações com quimioterapia.

Avaliando a Tabela 1 percebe-se que ao comparar a presença ou a ausência da ciclofosfamida no grupo controle, ômega 3, vitamina B12, e vitamina B12 e ômega 3, o diâmetro da luz do túbulo seminífero apresentou o valor com menor variação para o grupo que recebeu a suplementação com vitamina B12 e ômega 3, com médias e desvio padrão de $119,00 \pm 7,17 \mu\text{m}$ (sem ciclofosfamida) e $119,90 \pm 9,58 \mu\text{m}$ (com ciclofosfamida). Ao avaliar os mesmos dados para altura do epitélio do túbulo seminífero a menor variação ocorreu para o grupo que recebeu a vitamina B12, com $77,08 \pm 3,43 \mu\text{m}$ (sem ciclofosfamida) e $75,58 \pm 6,60 \mu\text{m}$ (com ciclofosfamida).

Tabela 1: Médias do diâmetro da luz do túbulo seminífero e da altura do epitélio do túbulo seminífero aos 60 dias na ausência ou presença de quimioterápico.

Suplementação	Variável			
	Diâmetro da luz do túbulo seminífero (µm)		Altura do epitélio do túbulo seminífero (µm)	
	Sem ciclofosfamida	Com ciclofosfamida	Sem ciclofosfamida	Com ciclofosfamida
controle	155,40 ± 19,45 ^{Aa}	112,00 ± 24,29 ^{Ba}	54,53 ± 5,72 ^{Ab}	81,58 ± 10,36 ^{Aa}
B12	136,90 ± 11,96 ^{Aab}	116,30 ± 20,48 ^{Ba}	77,08 ± 3,43 ^{Aa}	75,58 ± 6,60 ^{Aab}
Ômega 3	104,80 ± 8,10 ^{Ac}	119,80 ± 11,69 ^{Aa}	81,8 ± 14,01 ^{Aa}	70,14 ± 4,15 ^{Ab}
B12 e ômega 3	119,00 ± 7,17 ^{Abc}	119,90 ± 9,58 ^{Aa}	82,15 ± 4,58 ^{Aa}	73,72 ± 4,92 ^{Aab}

Legenda: Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Durante as análises obtivemos valor médio geral do diâmetro do túbulo seminífero de $381,3 \pm 21,7$ µm aos 30 dias de experimento; $351,8 \pm 53,8$ µm aos 45 dias; e $271,6 \pm 19$ µm aos 60 dias. Percebendo-se uma queda da média após a dose toxica de ciclofosfamida.

Quando avaliados as médias do diâmetro do túbulo seminífero nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento nos grupos experimentais (Tabela 2), percebemos que no 60º dia o valor médio e o desvio padrão mais próximo de Ct ($264,10 \pm 12,60$ µm), dos grupos que receberam ciclofosfamida, foram os dos grupos $\omega 3Cc$ ($262,10 \pm 5,10$ µm), suplementado com ômega 3, e $\omega 3B12Cc$ ($268,50 \pm 11,00$ µm), suplementado com ômega 3 e vitamina B12. Houve diferença significativa nos valores das médias do diâmetro dos túbulos seminíferos de todos os grupos entre os momentos 30 e 60.

Na avaliação das médias da altura do epitélio do túbulo seminífero nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento nos grupos experimentais (Tabela 3), pode-se observar no 60º dia que o grupo que recebeu ciclofosfamida que manteve o valor médio e o desvio padrão mais próximo de Ct ($54,50 \pm 5,70$ µm) foi o $\omega 3Cc$ ($70,10 \pm 4,20$ µm). Porém, se avaliar os grupos que receberam a mesma suplementação e tiveram menor variação sem ou com a presença da ciclofosfamida foram B12 ($77,10 \pm 3,40$ µm) e B12Cc ($75,60 \pm 6,60$ µm), que receberam a suplementação com vitamina B12. Houve uma diferença significativa nos valores das médias da altura do epitélio do túbulo

seminífero de todos os grupos quando comparados os momentos 30 e 60, sendo que a maior diferença ocorreu no grupo Ct e a menor no $\omega 3$.

Tabela 2: Médias do diâmetro do túbulo seminífero (μm) nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento nos grupos experimentais.

Grupos	30	45	60
Ct	379,00 \pm 3,40 ^{Aa}	268,10 \pm 8,90 ^{Bb}	264,10 \pm 12,60 ^{Ba}
$\omega 3$	386,50 \pm 17,60 ^{Aa}	270,30 \pm 12,50 ^{Bb}	268,80 \pm 22,60 ^{Ba}
Cc	394,60 \pm 22,70 ^{Aa}	-	274,20 \pm 24,70 ^{Ba}
$\omega 3\text{Cc}$	380,40 \pm 18,20 ^{Aa}	-	262,10 \pm 5,10 ^{Ba}
B12	376,70 \pm 42,20 ^{Aa}	277,20 \pm 17,00 ^{Bb}	289,30 \pm 13,60 ^{Ba}
$\omega 3\text{B12}$	386,10 \pm 27,70 ^{Aa}	382,60 \pm 17,20 ^{Aa}	286,90 \pm 13,90 ^{Ba}
B12Cc	379,50 \pm 6,40 ^{Aa}	-	270,10 \pm 27,10 ^{Ba}
$\omega 3\text{B12Cc}$	367,80 \pm 23,30 ^{Aa}	-	268,50 \pm 11,00 ^{Ba}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; $\omega 3$ - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; $\omega 3\text{Cc}$ - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); $\omega 3\text{B12}$ - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; $\omega 3\text{B12Cc}$ - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Tabela 3: Médias da altura do epitélio do túbulo seminífero (μm) nos momentos: 30, 45 e 60 dias do experimento nos grupos experimentais.

Grupos	30	45	60
Ct	107,20 \pm 7,80 ^{Aa}	65,00 \pm 6,70 ^{Bb}	54,50 \pm 5,70 ^{Bb}
$\omega 3$	99,90 \pm 10,70 ^{Aa}	61,70 \pm 5,00 ^{Bb}	81,80 \pm 14,00 ^{ABa}
Cc	99,00 \pm 10,20 ^{Aa}	-	81,60 \pm 10,40 ^{Ba}
$\omega 3\text{Cc}$	102,00 \pm 3,40 ^{Aa}	-	70,10 \pm 4,20 ^{Ba}
B12	107,20 \pm 13,90 ^{Aa}	68,80 \pm 6,80 ^{Bb}	77,10 \pm 3,40 ^{Ba}
$\omega 3\text{B12}$	107,10 \pm 9,90 ^{Aa}	92,70 \pm 5,80 ^{Ba}	82,20 \pm 4,60 ^{Ba}
B12Cc	98,60 \pm 3,10 ^{Aa}	-	75,60 \pm 6,60 ^{Ba}
$\omega 3\text{B12Cc}$	100,70 \pm 5,50 ^{Aa}	-	73,70 \pm 4,90 ^{Ba}

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; $\omega 3$ - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; $\omega 3\text{Cc}$ - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); $\omega 3\text{B12}$ - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; $\omega 3\text{B12Cc}$ - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Na tabela 4 pode-se perceber que no momento 60, o grupo ω 3B12Cc ($27,90 \pm 0,40$ °C), que recebeu ciclofosfamida e a suplementação de ômega 3 e vitamina B12, foi o grupo que manteve a temperatura do escroto, quando avaliado o valor médio e o desvio padrão, mais próxima ao do grupo Gt ($27,80 \pm 0,50$ °C). Mas, pode-se observar também que ao avaliar os grupos, no momento 60, que receberam a mesma suplementação e tiveram menor variação de temperatura sem ou com a presença da ciclofosfamida foram B12 ($28,20 \pm 0,30$ °C) e B12Cc ($28,10 \pm 0,50$ °C), que receberam a suplementação com vitamina B12.

Tabela 4: Médias da temperatura do escroto (°C) avaliada por termografia por infravermelho nos grupos experimentais.

Grupos	Datas		
	30	45	60
Ct	$27,10 \pm 0,30^{Aa}$	$27,80 \pm 0,40^{Aa}$	$27,80 \pm 0,50^{Aab}$
ω 3	$27,80 \pm 0,30^{Aa}$	$27,90 \pm 0,50^{Aa}$	$28,80 \pm 1,30^{Aa}$
Cc	$27,30 \pm 0,30^{Ba}$	—	$28,40 \pm 1,30^{Aab}$
ω 3Cc	$28,20 \pm 0,40^{Aa}$	—	$27,40 \pm 0,20^{Ab}$
B12	$28,20 \pm 0,40^{Aa}$	$28,20 \pm 0,60^{Aa}$	$28,20 \pm 0,30^{Aab}$
ω 3B12	$28,50 \pm 1,30^{Aa}$	$28,00 \pm 0,20^{Aa}$	$29,00 \pm 1,30^{Aa}$
B12Cc	$28,10 \pm 0,50^{Aa}$	—	$28,10 \pm 0,50^{Aab}$
ω 3B12Cc	$28,20 \pm 0,60^{Aa}$		$27,90 \pm 0,40^{Aab}$

Legenda: Ct - água, ração padrão, e solução salina estéril a 0,9%; ω 3 - água, ração padrão e ômega-3 (Equaliv®); Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida®; ω 3Cc - água, ração padrão, Ciclofosfamida, ômega-3 (Equaliv®); B12 - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®); ω 3B12 - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), e vitamina B12 (Monovin B12®); B12Cc - água, ração padrão, vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®; ω 3B12Cc - água, ração padrão, ômega-3 (Equaliv®), vitamina B12 (Monovin B12®), e Ciclofosfamida®. Letras maiúsculas diferenciam as colunas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas diferenciam as linhas indicando diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras iguais não diferem entre si.

Discussão

Os grupos que receberam suplementação com vitamina B12 tiveram pouca variação entre os valores das medidas e seus desvios padrões dos grupos ao receberem ou não a ciclofosfamida, para as variáveis da altura do epitélio do túbulo seminífero, a altura do epitélio do túbulo seminífero no 60º dia e a temperatura do escroto no 60º dia. Vasiliausha et al. (2016) compararam os efeitos da vitamina B12 para a manutenção da integridade celular do sistema reprodutor masculino em tratamentos realizados com o

Busulfan® (outro agente quimioterápico), no qual os mesmos relataram que os túbulos seminíferos foram reduzidos independente da presença ou ausência da vitamina B12 nos indivíduos tratados com o Busulfan®. Nos grupos tratados com a vitamina B12 + Bulsofan®, os autores relataram que foram observadas espermatogônias escassas nos túbulos. Segundo Beltrame e Sasso-Cerri (2017) e Vasiliausha et al. (2016), a vitamina B12 mostrou-se capaz de recuperar o dano testicular induzido pela doxorubicina, evitando a atrofia tubular.

O ômega 3 teve forte influência nas médias do diâmetro do túbulo seminífero no 60º dia e nas médias da altura do epitélio do túbulo no 60º dia, mantendo estes dados o mais próximo ao grupo controle. Adelakun et al. (2019), relataram que em seu experimento que os ratos que receberam suplementação a base de óleo de nozes (fonte de ácidos graxos ômega-3) apresentaram uma composição celular normal dos túbulos seminíferos, no seu epitélio germinativo com espermatozoides no lúmen e um interstício normal e células de Leydig proeminentes. Os túbulos seminíferos dos ratos tratados somente com nitrito (a interação entre nitrito e oligoelementos essenciais pode ser uma das razões para a redução dos níveis de enzimas antioxidantes nos testículos de ratos) mostraram redução severa das células da série espermatogênica, hipocelularidade no interstício, alargamento do lúmen tubular, atrofia tubular e menos espermatozoides no lúmen tubular. Os ratos dos grupos nitrito e óleo de nozeira apresentaram células da série espermatogênica e composição celular normal em seu epitélio germinativo com espermatozoides no lúmen e um interstício normal. Assim, ao analisar o presente artigo e o descrito por Adelakun et al. (2019), pode-se perceber que a ação antioxidante do ômega 3 teve boas reações nas células dos túbulos seminíferos.

Pode perceber no presente estudo que a vitamina B12 e ômega 3 em conjunto geraram um efeito positivo para o diâmetro da luz do túbulo seminífero, diâmetro do túbulo seminífero (no 60º dia) e também para a temperatura do escroto. Na pesquisa de Yamada et al. (2019) relataram que o uso do ômega 3 e a vitamina B12 em conjunto, não ocorreram diferenças entre o grupo suplementado com o ômega 3 e a vitamina B12 e o grupo controle, fato este demonstrado na porcentagem de epitélio seminífero e na porcentagem de estroma.

Percebeu-se que uma única dose da ciclofosfamida foi suficiente para gerar danos aos tecidos. Fato este também descrito por Afkhami-Ardakani et al (2018) e Hegazy et

al. (2015), que afirmaram em seus estudos que uma única dose de ciclofosfamida foi o suficiente para aumentar significativamente o nível de peroxidação e o nível de MDA (Malondialdeído, biomarcador frequentemente utilizado) no testículo e no epidídimo. Salimnejad et al. (2018) relataram que em seu experimento a ciclofosfamida reduziu a capacidade antioxidante total o tecido testicular significativamente e a análise histológica revelou alterações degenerativas epitélío dos túbulos seminíferos, como o descolamento celular e redução da espessura do epitélío germinativo, além de reduzir significativamente a atividade da superóxido dismutase (esta é uma das enzimas mais importantes do sistema antioxidante do corpo e neutraliza a toxicidade do superóxido através da decomposição de radicais ânion superóxido - primeiro radical produto do oxigênio - a H₂O₂ e impedir a formação de radicais livres causados pelo superóxido).

Desta forma, no presente artigo observou-se que a suplementação da vitamina B12 e do ômega-3 pode gerar benefícios para diminuir os danos aos tecidos do aparelho reprodutor masculino de ratos Wistar machos, jovens adultos, devido sua ação antioxidante. Dietas ricas em antioxidantes podem influenciar na resposta à ciclofosfamida, e também na qualidade de vida dos pacientes por minimizar os efeito colaterais adversos do fármaco, podendo facilitar o uso clínico (Afkhami-Ardakani et al., 2018; Hegazy et al., 2015; Olayinka et al., 2015; Salimnejad et al., 2018).

Conclusão

Para as temperaturas do escroto, houve influência negativa da ciclofosfamida associada ao ômega 3 na temperatura do escroto aos 60 dias do experimento. O diâmetro do túbulo seminífero sofreu influência positiva da associação do ômega 3 com a vitamina B12 aos 45 dias do experimento em relação a esse mesmo momento para os demais grupos experimentais.

Referências bibliográficas

ADELAKUN, S.A.; UKWENYA, V.O.; OGUNLADE, B.S.; ANIAH, J.A.; IBIAYO, A.G. Nitrite-induced testicular toxicity in rats: therapeutic potential of walnut oil. *JBRA Assist Reprod.* v.23. p.15–23. 2019.

AFKHAMI-ARDAKANI, M.; HASANZADEH, S.; SHAHROOZ, R.; DELIREZH, N.; MALEKINEJAD, H. Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Veterinary Research Forum*. v.9, p.35–41. 2018.

AGHAIE, S.; NIKZAD, H.; MAHABADI, J.A.; TAGHIZADEH, M.; AZAMI-TAMEH, A.; TAHERIAN, A.; SAJJADIAN, S.M.S.; KAMANI, M.; Protective effect of combined pumpkin seed and ginger extracts on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with cyclophosphamide. *Anatomical Science International*. v.91. p.382–390. 2016.

BELTRAME, F.L.; SASSO-CERRI, E. Vitamin B12-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian Journal of Andrology*. v.19. p.567–572. 2017.

CARDOSO, I.B.; BARBOSA, L.B.; GARRIDO, J.G.S; VASCONCELOS, S.M.L. consumo de ômega 3 em hipertensos de Maceió-AL. *GEP News*, v.1. n.1, p.99-104. 2018.

CAŁKOSIŃSKI, I.; DOBRZYŃSKI, M.; ROSIŃCZUK, J.; DUDEK, K.; CHRÓSZCZ, A.; FITA, K.; DYMAREK, R. The Use of Infrared Thermography as a Rapid, Quantitative, and Noninvasive Method for Evaluation of Inflammation Response in Different Anatomical Regions of Rats. *BioMed Research International*. 2015.

DAMAYANTI, D.; JACELDO-SIEGL, K.; BEESON, W.L.; FRASER, G.; ODA, K.; HADDAD, E.H. Foods and Supplements Associated with Vitamin B12 Biomarkers among Vegetarian and Non-Vegetarian Participants of the Adventist Health Study-2 (AHS-2) Calibration Study. *Nutrients*. v.10. p.722. 2018.

FIDUT-WROŃSKA, J.; CHOŁUJ, K.; CHMIEL, J.; PIKTO – PITKIEWICZ, K.; MAJCHER, P. Observation using thermography of post-operative reaction after fascial

manipulation®. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2019. doi:10.26444/aaem/103456.

HAMEDANI, M.A.; TAHMASBI, A.M.; AHANGARI, Y.J. Effects of vitamin b₁₂ supplementation on the quality of ovine spermatozoa. *Open Vet J*. v.3. p.140–144. 2013.

HANNIBAL, L.; LYSNE, V.; BJØRKE-MONSEN, A.L.; BEHRINGER, S.; GRÜNERT, S.C.; SPIEKERKOETTER, U.; JACOBSEN, D.W.; HENK, J.; BLOM, H.J. Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin b₁₂ deficiency. *Frontiers in Molecular Biosciences*. v.3. 2016.

HEGAZY, R.M.; FARUK, E.M.; ELGENDY, F.S.; MEHLAB, E.M. Melatonin versus omega-3 fatty acid as possible antioxidants against cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in adult albino rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. v.6. p.440 – 452. 2015.

HIRABARA, S.M.; FOLADOR, A.; FIAMONCINI, J.; LAMBERTUCCI, R.H. RODRIGUES JR, C.F.; ROCHA, S.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; MARTINS, A.R.; RODRIGUES, A.C.; CARPINELLI, A.R.; PITHON-CURI, T.C.; FERNANDES, L.C.; GORJÃO, R.; CURI, R. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. *J. Nutr. Biochem*. v.24. p.1136-1145. 2013.

KANNO, T.Y.N.; SENSIATE, L.A.; PAULA, N.A.; SALLES, M.J.S. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.45. n.2. p.313-319. 2009.

MEREY, L.S.F.; PALHARES, D.B.; PORTO, K.R.A.; MULLER K.T.C. Ácidos graxos polinsaturados no sangue de gestantes suplementadas com ômega-3 e óleo de linhaça dourada. *Interações*. v.19. n.4. p.845-853. 2018.

NAFEES, S.; RASHID, S.; ALI, N.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFκB/MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions*. v.231. p.98-107. 2015.

NAGAO, T.; HIROKAWA, M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *Journal of General and Family Medicine*. v.18. p.200-204. 2017.

NAKATA, H.; WAKAYAMA, T.; SONOMURA, T.; HONMA, S.; HATTA, T.; ISEKI, S. Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse *J. Anat.* v.227. p.686 - 694. 2015.

OLAYINKA, E.T.; ORE, A.; OLA, O.S.; ADEYEMO, O.A. Ameliorative Effect of Gallic Acid on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Injury and Hepatic Dysfunction in Rats. *Med. Sci.* v.3. p.78-92. 2015.

OLIVEIRA, B. *Vitamina B12 exerce um efeito benéfico sobre a espermatogênese após depleção de espermatogônias causada pelo Busulfan®*. 2013. 50f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

OYAGBEMI, A.A.; OMOBOWALE, T.O.; SABA, A.B.; OLOWU, E.R.; DADA, R.O.; AKINRINDE, A.S. Gallic Acid Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats Through Free Radical Scavenging Activity and Improvement in Antioxidant Defense System. *Journal of Dietary Supplements*. v.13. p.402-419. 2016.

RIOS, R.A.O.; DAVIU, J.A.A.; TRONCOSO, R.J.R. Recent Industrial Applications of Infrared Thermography: A Review. *IEEE Transactions on Industrial Informatics*. v.15. p.615 – 625. 2019.

SALIMNEJAD, R.; RAD, J.S.; NEJAD, D.M. Protective Effect of Ghrelin on Oxidative Stress and Tissue Damages of Mice Testes Followed by Chemotherapy With

Cyclophosphamide. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*. v.5. p.138–143. 2018.

SATYAM, S.M.; KURADY, L.B. Influence Of Zincovit Drop (Nutritional Food Supplement) On Immune System In Normal And Cyclophosphamide Intoxicated Wistar Rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research*. v.9. 2016.

VASILIAUSHA, S.R.; BELTRAME, F.L.; SANTI, F.; CERRI, P.S.; CANEGUIM, B.H.; SASSO-CERRI, E. Seminiferous epithelium damage after short period of busulphan treatment in adult rats and vitamin B12 efficacy in the recovery of spermatogonial germ cells. *International Journal of Experimental Pathology*. v.97. p.317–328. 2016.

YAMADA, L.M.M.; SOUZA, C.D.; BRANCO, I.T.; ANDRADE, I.B.; DEAK, F.L.G.B.; BASTOS, G.P.; SILVA, J.G.; AMORIS, J.V.R.; YAMADA, L.Y.; GOIOZO, P.F.I.; CREMASCO, C.P.; GABRIEL FILHO, L.R.A.; CHACUR, M.G.M. Efeito do ômega 3 e da vitamina B12 no espermograma, na histomorfometria dos órgãos reprodutivos e nas temperaturas do corpo com termografia infravermelha em ratos Wistar. *Agruivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.v.71. n.1. p.211-218. 2019.

ANEXO 1

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação

PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **"INFLUÊNCIA DO ÔMEGA TRÊS E VITAMINA B12 NA ESPERMATOGÊNESE, PERFIL HORMONAL E METABÓLICO EM RATOS MACHOS TRATADOS COM BUSSULFAN"**, cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº **2995** e tendo como participante(s) **MARCELO GEORGE MUNGAI CHACUR (responsável)**, **LUÍS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS (docente)**, **PAULO FELIPE IZIQUE GOIOZO (docente)**, **AUGUSTO CESAR SOARES DE OLIVEIRA (discente)**, **CAMILA DUTRA DE SOUZA (discente)**, **FERNANDA LUIZA GUINOSSI BARBOSA DEAK (discente)**, **GIOVANA JOSE GARCIA ESTANHO (discente)**, **ISAMARA BATATA ANDRADE (discente)**, **LUCAS YUKIO YAMADA (discente)**, **LUCI MARA MIURA YAMADA (discente)**, **TANIA MARA MARIANO PEREIRA (discente)**, **EUNICE OBA (externo)**, **LUIS ROBERTO ALMEIDA GABRIEL FILHO (externo)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 16/03/2016.

Vigência do projeto: 02/2016 a 12/2016.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
RATOS WISTAR MACHOS	96		0		BIOTÉRIO DA UNOESTE

Presidente Prudente, 18 de Maio de 2016.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.

Coordenador Científico da CPDI

Profª Ms. Adriana Falco de Brito

Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/sqp informando o código de segurança
5e9812f538c0aa2cda5cd7632104111c

ANEXO 2



ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial

dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente online, no endereço eletrônico

<<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 2).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de

Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 2). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número do ORCID e com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 3) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2

e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário ,

cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$ 50.00 (fifty dollars) per page, and US\$ 50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 2), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.