



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

Anna Kelly de Lima Pontes Venâncio

Recife

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Anna Kelly de Lima Pontes Venâncio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Orientador

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Recife

2020

Anna Kelly de Lima Pontes Venâncio

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Venâncio, Anna Kelly de Lima Pontes e
Venâncio, Anna Kelly de Lima Pontes
Efeitos de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos: avaliação morfofuncional testicular, renal e hepática
/ Anna Kelly de Lima Pontes Venâncio. - 2020.
94 f. : il.
Orientador: Valdemiro Amaro da Silva.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Glicerina. 2. reprodução. 3. histomorfometria. 4. histopatologia. 5. estresse oxidativo. I., Valdemiro Amaro da Silva, orient. II. Título

CDD 636.089

Efeitos de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos: avaliação morfofuncional testicular, renal e hepática

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (Presidente)

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Francisco Fernando Ramos de Carvalho – (1º Membro)

Departamento de Zootecnia – UFRPE

Prof. Dr. Huber Rizzo – UFRPE (2º Membro)

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof^a. Dr^a Andréa Alice da Fonseca Oliveira (3º Membro)

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr^a. – Sandra Maria de Torres (4º Membro)

PNPD-RENORBIO-UFRPE

Prof^a. Dr^a Márcia Figueiredo Pereira (Suplente)

Departamento de Medicina Veterinária– UFRPE

Prof^a. Dr^a Carolina Akiko Sato Cabral de Araújo (Suplente)

Departamento de Medicina Veterinária– UFRPE

Agradecimentos

A Deus, meu amado pai, que me acolhe e sopra Seu Divino Espírito Santo para me dar alívio, paz e recarregar minhas forças sempre.

À minha amada mãe porque sem ela definitivamente não seria possível a conclusão deste trabalho, ela é quem sempre me impulsionou e impulsiona pra o sucesso, mãe você é o meu exemplo maior.

Ao meu pai (in memorian) que mesmo depois de alguns anos sem tê-lo ao meu lado, nunca esquecerei de suas palavras de incentivo, do brilho do seu olhar e da força que me inspiram até hoje.

À minha filha, minha razão de viver, ela é pra quem eu olho e penso: eu faria qualquer coisa por você!

Ao meu marido, companheiro de vida, que me dá forças, energia e apoio para conseguir meus objetivos.

Ao meu irmão, que sempre me incentivou e incentiva a alcançar o que almejo, ele é quem tem uma fé enorme em mim e é um amigo pra todas as horas.

À Giovanna, que me põe pra cima e que sempre me acolheu como uma segunda mãe.

À minha família em geral, minha base, meu apoio, pra onde sei que posso voltar. Em especial à minha prima irmã Luciana Lima, por acreditar em mim e apostar em meus objetivos.

Ao meu orientador professor Valdemiro Amaro, pela oportunidade, pelo exemplo de perseverança, esforço, honestidade, trabalho e dignidade. Serei sempre grata!

Aos meus amigos companheiros do doutorado e de vida Fabiana Felix, Alluanan Adelson, Giselle Wolley, Jéssica Santana, Simone Monte, Simone Barros, Suelen, Ana Katharyne, Jacilene Lourenço, Bruno Tenório, Vinícios Vasconcelos, Sandra Torres, pelo companheirismo, união e toda ajuda.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo apoio à pesquisa, pela prontidão em ajudar e pela oportunidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ingestão de diferentes níveis de glicerina bruta contendo 80,5% de glicerol sobre a histomorfometria e histopatologia testicular, renal e hepática, níveis plasmáticos de testosterona e estresse oxidativo no parênquima testicular renal e hepático de ovinos. Foram utilizados 40 cordeiros mestiços da raça Santa Inês, machos, não castrados com $21 \text{ kg} \pm 0,8 \text{ kg}$ de peso corporal inicial. Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca. O peso, medidas biométricas do testículo, índice gonadossomático e peso líquido dos testículos foram maiores para os grupos tratados ($P < 0,05$). Dentre os parâmetros tubulares, o comprimento total dos túbulos seminíferos foi maior no G6 ($P < 0,05$). O volume tubular total e o volume do epitélio seminífero aumentaram para todos os grupos tratados ($P < 0,05$). O volume individual da célula de Leydig aumentou no G12 enquanto a população da mesma célula por grama de testículo diminuiu ($P < 0,05$), já no grupo G18 houve uma diminuição no diâmetro nuclear e volume individual da célula de Leydig, enquanto a população por grama de testículo aumentou ($P < 0,05$), porém os níveis plasmáticos de testosterona não foram afetados. Segundo a análise histopatológica do parênquima testicular, os grupos experimentais sofreram descamação de epitélio seminífero e vacuolização de célula de Sertoli. Foram observados espermatócitos em necrose e presença de células gigantes em todos os grupos porém com graus diferentes. Nos grupos G12 e G18 foi observada intensa vacuolização das células de Sertoli. O grupo G12 teve o maior número de espermatócitos em paquíteno sofrendo necrose ($P < 0,05$). O consumo de glicerina influenciou os marcadores do estresse oxidativo nos grupos G12 e G18, sendo o último o mais prejudicado. A produção de SOD aumentou nos grupos G12 e G18 ($P < 0,05$). A produção de catalase aumentou nos grupos G12 e G18 ($P < 0,05$). A produção de GST foi maior no grupo G18 ($P < 0,05$). O nível de óxido nítrico diminuiu para todos os grupos tratados ($P < 0,05$). A produção de MDA aumentou no G18 comparado aos grupos controle e ao G6 ($P < 0,05$). A análise histomorfométrica do fígado revelou que os grupos G12 e G18 tiveram redução de núcleo e aumento de citoplasma de hepatócitos. Qualitativamente a esteatose foi a lesão predominante, os animais do grupo G18 foram os mais prejudicados. Os grupos G12 e G18 tiveram os maiores números de hepatócitos anucleados. Segundo a análise histomorfométrica renal o grupo G12 teve a maior dimensão de glomérulo e cápsula de Bowman, enquanto os grupos G6 e G12 tiveram os maiores valores de espaço capsular.

Qualitativamente os grupos G12 e G18 tiveram maior grau de lesões, a glomerulonefrite proliferativa e membranosa foi predominante, porém a presença de glomérulos atrofiados também foi considerável. A análise de metabólitos de peroxidação lipídica no plasma sanguíneo revelou que os animais do G18 tiveram maiores níveis de MDA. Observou-se com os resultados expostos que a inclusão de até 6% de glicerina bruta na dieta de ovinos é segura, pois, não altera a histomorfometria nem histopatologia dos rins e fígado e melhora diversos aspectos que são indicativos de um bom desempenho reprodutivo do animal sem provocar qualquer estímulo ao estresse oxidativo, podendo assim, ser considerada como suplemento alimentar visando reduzir gastos com alimentação do rebanho sem qualquer prejuízo à saúde dos animais.

Palavras-chave: Glicerina, reprodução, histomorfometria, histopatologia, fígado, rim, estresse oxidativo.

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of ingesting different levels of crude glycerin containing 80.5% glycerol on testicular, renal and hepatic histomorphometry and histopathology, plasma testosterone levels and oxidative stress in the renal and hepatic testicular parenchyma of sheep. Forty male Santa Inês crossbred lambs with $21 \text{ kg} \pm 0.8 \text{ kg}$ of initial body weight were used. The animals were randomly subjected to levels of 0% (Control), 6% (G6), 12% (G12) and 18% (G18) of crude glycerin based on dry matter. Weight, biometric measurements of the testis, gonadosomatic index and net weight of the testicles were higher for the treated groups ($P < 0.05$). Among the tubular parameters, the total length of seminiferous tubules was greater in G6 ($P < 0.05$). The total tubular volume and the volume of the seminiferous epithelium increased for all treated groups ($P < 0.05$). The individual volume of the Leydig cell increased in G12 while the population of the same cell per gram of testis decreased ($P < 0.05$), whereas in the G18 group there was a decrease in the nuclear diameter and individual volume of the Leydig cell, while the population per gram of testicle increased ($P < 0.05$), but plasma testosterone levels were not affected. According to histopathological analysis of the testicular parenchyma, the experimental groups suffered desquamation of seminiferous epithelium and vacuolization of the Sertoli cell. Spermatocytes were observed in necrosis and presence of giant cells in all groups but with different degrees. In groups G12 and G18, intense vacuolization of Sertoli cells was observed. The G12 group had the highest number of spermatocytes in pachytene undergoing necrosis ($P < 0.05$). The consumption of glycerin influenced the markers of oxidative stress in groups G12 and G18, the latter being the most affected. SOD production increased in groups G12 and G18 ($P < 0.05$). Catalase production increased in groups G12 and G18 ($P < 0.05$). GST production was higher in the G18 group ($P < 0.05$). The level of nitric oxide decreased for all treated groups ($P < 0.05$). MDA production increased in G18 compared to control groups and G6 ($P < 0.05$). Histomorphometric analysis of the liver revealed that groups G12 and G18 had a nucleus reduction and an increase in hepatocyte cytoplasm. Qualitatively steatosis was the predominant lesion, the animals in the G18 group were the most affected. Groups G12 and G18 had the highest numbers of anucleated hepatocytes. According to renal histomorphometric analysis, the G12 group had the largest dimension of the glomerulus and Bowman's capsule, while the groups G6 and G12 had the highest values of capsular space. Qualitatively, groups G12 and G18 had a higher degree of lesions, proliferative and

membranous glomerulonephritis was predominant, but the presence of atrophied glomeruli was also considerable. The analysis of lipid peroxidation metabolites in blood plasma revealed that the animals in G18 had higher levels of MDA. It was observed with the exposed results that the inclusion of up to 6% of crude glycerin in the diet of sheep is safe, since it does not alter the histomorphometry or histopathology of the kidneys and liver and improves several aspects that are indicative of a good reproductive performance of the animal without provoking any stimulus to oxidative stress, and thus, it can be considered as a food supplement aiming to reduce spending on feeding the herd without any harm to the health of the animals.

Keywords: Glycerin, reproduction, histomorphometry, histopathology, liver, kidney, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular do glicerol. Fonte: Blieck et al. (2005).....16

Figura 2. Representação de um corte transversal de um túbulo seminífero mostrando a distribuição de células germinativas ao longo do epitélio e a presença das junções de oclusão entre as células de Sertoli, formando a barreira hemato-testicular. Fonte: <https://obgynkey.com/disorders-of-male-reproduction>.....21

Figura 3. Os estágios do ciclo do epitélio seminífero em carneiros. Fig. 1 A: estágio 1; Fig. 1 B: estágio 2; Fig. 1 C: estágio 3; Fig. 1 D e 1 E: estágio 4; Fig. 1 F: estágio 5 a 7; Fig. 1 G e 1 H: início do estágio 8 mostrando o início da espermiacção ; Fig. 1 G e 1 H: final do estágio 8 mostrando os corpos residuais próximo ao lúmen. Fonte: Wrobel et al. (1995).....23

Capítulo I

Figura 1. Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST), metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) e estresse nitroso (NO) em homogeneizado testicular de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.....59

Figura 2. Fotomicrografia de parênquima testicular de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Figura A: Grupo controle com células descamadas no lúmen tubular (estrela). Figura B: Grupo controle, notar túbulo no processo de espermiogênese em estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero. Figura C: Grupo G6 com presença de células gigantes no lúmen tubular (seta fina curta) e células de sertoli vacuolizadas (asterisco). Figura D: grupo G12, notar túbulo degenerado (cabeça de seta) com espessamento de túnica própria (seta larga), vacuolização de células de Sertoli (asterisco) e perda da arquitetura do túbulo com descamação e necrose do epitélio seminífero. Figura E e F: grupo G12, notar aumento do espaço intertubular (seta fina longa), células descamadas no lúmen tubular (estrela), vacuolização de células de Sertoli (asterisco) e células gigantes no epitélio seminífero e lúmen tubular (seta fina curta). Figura G e H: grupo G18, visibilizar redução da altura de epitélio seminífero (seta vazada).....60

Capítulo II

Figura 1: Fotomicrografia de parênquima hepático de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração H.E. Figura A e B: grupo controle com discreta congestão. Figura C: grupo G6, notar presença de vacúolos citoplasmáticos próximos a veia centrolobular caracterizando uma esteatose pericentrolobular. Figuras D e E: grupo G12, notar maior grau de esteatose localizada nas proximidades do espaço porta caracterizando uma macroesteatose periportal. Notar aumento de deposição de colágeno no espaço porta e proliferação de ductos biliares (seta curta). Figura F: grupo G18, notar macro esteatose difusa (seta fina), atrofia dos cordões de

hepatócitos (seta grossa), hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, dilatação dos capilares sinusóides.....77

Figura 2: Fotomicrografia de parênquima hepático de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração PAS (Figuras A, B, C e D correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Coloração Tricrômico de Masson (Figuras E, F, G e H correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Notar presença de grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos (seta). Visibilizar ausência de fibras de colágeno entre os hepatócitos, porém presente no espaço porta.....78

Figura 3: Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração H.E. Figura A: Grupo controle notar descamação dos túbulos contorcidos, glomérulo normal. Figura B e C: Grupo G6, visibilizar atrofia de glomérulo (seta grossa curta), presença de albumina no espaço de Bowman (seta grossa longa), precipitado proteico no lúmen tubular (asterisco). Figura D e E: Grupo G12, notar glomérulo com início de hialinização, túbulos contorcidos atrofícos (cabeça de seta), túbulos contorcidos hipertróficos (seta fina), precipitado protéico no lúmen tubular (asterisco) e presença de precipitado de sais de cálcio nas alças de Henle (estrela). Figura F: G18, visibilizar glomérulos com glomerulonefrite membranoproliferativa, cilindros hialinos (asterisco), túbulos contorcidos hipertróficos (seta fina) e túbulos contorcidos atrofícos (cabeça de seta).....81

Figura 4: Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração PAS (Figuras A, B, C e D correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Coloração Tricrômico de Masson (Figuras E, F, G e H correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). A: notar glomérulo normal e algumas células tubulares com lesão de membrana. B: notar presença de proteína no espaço capsular e no lúmen tubular (seta grossa). C: notar células tubulares em necrose (seta fina) e com extravasamento de conteúdo proteico no lúmen tubular e espaço capsular. D: visibilizar glomerulonefrite proliferativa (asterisco), túbulos contorcidos com conteúdo protéico no lúmen (seta grossa) e espessamento das membranas nos túbulos contorcidos e glomérulo. E: visibilizar marcação negativa. F, G e H: notar discreto depósito de colágeno entre os túbulos contorcidos e entre as alças de Henle (seta pequena).....82

Figura 5. Metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) em plasma sanguíneo de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.....83

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes e composição química das dietas de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	30
---	----

Capítulo I

Tabela 2. Peso corporal, biometria testicular e IGS de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	55
--	----

Tabela 3. Parâmetros tubulares e volume (mL) dos componentes testiculares de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	56
--	----

Tabela 4. População, diâmetro e volume individual da célula de Leydig e níveis plasmáticos de testosterona de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	57
---	----

Tabela 5. Número de necrose e presença de células gigantes nos túbulos seminíferos de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	58
---	----

Capítulo II

Tabela 2. Morfometria dos componentes hepáticos (%) de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	76
--	----

Tabela 3. Parâmetros morfométricos dos corpúsculos renais de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	79
--	----

Tabela 4. Análise qualitativa e determinação do percentual (%) das lesões histopatológicas do parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	80
---	----

Lista de Abreviaturas

SOD (Superóxido Dismutase)

CAT (Catalase)

GST (Glutathione-S-Transferase)

NO (Óxido Nítrico)

MDA (Malondialdeído)

TMPO (Tetramethoxypropane)

CTTS (Comprimento total dos túbulos seminíferos)

PBS (Tampão fosfato de sódio)

HE (Hematoxilina-eosina)

PAS (Ácido Periódico de Schiff)

TM (Tricrômico de Masson)

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão bibliográfica	16
Glicerina.....	16
Glicerina bruta, oriunda da fabricação do biodiesel.....	16
Efeitos do glicerol no desempenho de ruminantes.....	17
Glicerol e metabolismo hepático	18
Glicerol e metabolismo renal.....	18
Glicerol e espermatogênese.....	19
Papel da alimentação na reprodução de ovinos	19
Espermatogênese.....	20
Função das células de Sertoli.....	20
Ciclo do epitélio seminífero em carneiros.....	21
Função das células de Leydig.....	23
Histofisiologia Hepática.....	24
Histofisiologia Renal	25
Estresse oxidativo.....	26
3. Objetivos.....	27
Objetivo Geral.....	27
Objetivos Específicos.....	28
4. Material e métodos.....	29
5. Referências bibliográficas	36
Capítulo I	
Efeito de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos sobre a função testicular: avaliação do histomorfométrica, níveis de testosterona e estresse oxidativo.....	46

Resumo.....	46
Abstract.....	47
1. Introdução	48
2. Material e métodos.....	49
3. Resultados.....	54
4. Discussão.....	61
Conclusão	64
5. Referências.....	65
Capítulo II	
Adição de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos: avaliação morfofuncional renal e hepática.....	69
Resumo.....	69
Abstract.....	70
1. Introdução.....	71
2. Material e métodos.....	72
3. Resultados.....	76
4. Discussão.....	83
Conclusão.....	87
5. Referências.....	87
6. anexos -Autorização do Comitê de Ética do Uso de Animais de Experimentação (CEUA-UFRPE).....	94

1. Introdução

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações (Viana, 2008). Para ovinos, o milho é uma das principais fontes de energia na dieta (Alves et al., 2003), porém o alto custo do grão torna a alimentação onerosa (Lardy, 2018) o que estimula a busca por fontes alternativas de nutrientes para ruminantes, a fim de diminuir a despesas (Andrade et al., 2018).

Entre os diversos subprodutos agroindustriais utilizados atualmente na alimentação de ruminantes, destacam-se aqueles oriundos da produção de biodiesel. A glicerina é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel, constituindo cerca de 10% de seu volume total (Dasari et al., 2005).

O grande interesse na utilização da glicerina bruta na alimentação animal é devido ao seu valor energético (Menten et al., 2008). Outro interesse no reaproveitamento da glicerina bruta gerada a partir da produção de biodiesel está relacionado à responsabilidade ambiental, pois, diante da crescente produção de biodiesel, o mercado tem sido incapaz de absorver toda a glicerina gerada no processo (Silva, 2010).

O potencial de uso de glicerina proveniente da indústria de biodiesel como ingrediente dietético na alimentação de animais é de relevante interesse científico, econômico e ambiental (Gomes et al., 2011). A maior parte da glicerina bruta provinda da fabricação de biodiesel é o glicerol, que pode ser usado para nutrição animal (Yang et al., 2012). No rúmen este composto é convertido em propionato, que funciona como precursor de glicose no fígado (Parsons et al., 2009).

Por outro lado há relatos na literatura afirmando que o glicerol pode provocar prejuízos para a reprodução em machos. Segundo Crisóstomo et al., (2017) o glicerol possui atividade antiespermatogênica. As células de Sertoli sofrem danos quando submetidas à altas concentrações de glicerol (Wiebe et al., 2000). De acordo com a literatura, o estudo das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) pode elucidar a patogênese de 30 - 80% dos casos de infertilidade masculina além de auxiliar a esclarecer quase todas as formas de lesões renais e hepáticas, viabilizando inclusive a compreensão do grau da lesão (Fallahi et al., 2015; Wagner et al., 2018; Ratliff *et al.*, 2016; Cichoż-Lach & Michalak, 2014). Desta forma, foi objetivo deste estudo avaliar o efeito de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos sobre morfofuncionalidade testicular, renal e hepática.

2. Revisão bibliográfica

Glicerina

O termo glicerol se aplica apenas ao produto químico puro 1,2,3 propanotriol, enquanto o termo glicerina geralmente aplica-se a produtos comerciais purificados com conteúdo de glicerol igual ou acima de 95%, portanto, a diferença da glicerina para o glicerol se deve ao conteúdo de glicerol e em outras características como cheiro, cor e traços de impurezas (Appleby, 2005).

O glicerol é o principal componente dos triglicerídeos, encontrado em gordura animal, óleo vegetal ou óleo cru. O glicerol é derivado de sabão ou da produção de biodiesel (Choi, 2008; Foglia et al., 1998). Considera-se que foi descoberto em 1779 pelo farmacêutico suíço K. W. Scheele, que foi o primeiro a isolar o composto, porém só em 1811, o químico francês M. E. Chevreul, estudando a glicerina, definiu as fórmulas químicas dos ácidos, ácidos graxos componentes da glicerina assim como sua fórmula no óleo vegetal e na gordura animal, então patenteou o produto (Quispe et al., 2013). O glicerol é o mais simples dos álcoois, com fórmula química $C_3H_8(OH)_3$ e é conhecido por propano-1,2,3-triol de acordo com a IUPAC. Comercialmente é conhecido como glicerina 1,2,3-propanotriol, tri-hidroxipropano, gliceritol ou álcool glicídico (Rahmat et al., 2010). Trata-se de um líquido oleoso, viscoso, inodoro, incolor e com sabor adocicado. O glicerol é um líquido com três grupos hidroxila hidrofílicos que são responsáveis por ser higroscópico e por sua solubilidade em água Fig 1.

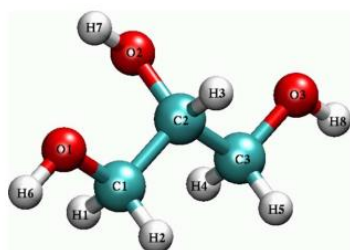


Figura 1. Estrutura molecular do glicerol. Fonte: Blieck et al. (2005).

Glicerina bruta, oriunda da fabricação do biodiesel

Na fabricação de biodiesel são utilizados óleos vegetais ou gorduras animais, que ocorrem como triglicerídeos, gerando glicerina bruta, ou glicerol bruto. A hidrólise desses

triglicerídeos resulta em ácido graxo e glicerina bruta, que é a forma mais comum de co-produto do biodiesel que é comercializável (Choi, 2008; Almeida & Paschoaloto, 2019).

Porém é válido ressaltar que a glicerina bruta de origem animal é proibida para os ruminantes devido à a doença da vaca louca, a encefalopatia espongiforme bovina. Essa doença neurodegenerativa tem sido associada à prática de alimentar o gado com farinha de carne e osso, que poderia estar contaminada com agente scrapie. Por esse motivo, apenas glicerina bruta derivada de óleos vegetais pode ser usada para alimentação de ruminantes. (Almeida & Paschoaloto, 2019).

A glicerina bruta tem glicerol e também contém água, sal e outros materiais orgânicos, incluindo metanol residual bem como como ácidos graxos livres (Thompson & He, 2006), além de quantidades do catalisador utilizado na transesterificação do óleo vegetal (Beatriz et al., 2011), cada componente varia bastante dependendo da matéria-prima utilizada. O glicerol bruto obtido na produção de biodiesel utilizando-se várias matérias-primas tem conteúdo próximo de 60 a 70% em peso (Thompson & He, 2006).

Efeitos do glicerol no desempenho de ruminantes

A inclusão de glicerol na nutrição animal tem sido estudada em várias espécies e relatórios indicam que inclusões moderadas não comprometem o desempenho dos animais (Mach et al., 2009; Lammers et al. , 2008). Entende-se por desempenho a medida da produção de cada animal que tem como principal indicador o ganho de peso vivo, diário (g/dia) ou anual (kg/ano) (Embrapa, 2005). Segundo Gunn et al., (2010) a adição de até 15% glicerina bruta na dietas de cordeiros em confinamento melhorou o desempenho sem qualquer efeito concomitante nas características da carcaça. Ladeira e colaboradores (2016) recomendam a inclusão de glicerina bruta na alimentação de touros jovens em um nível de até 180 g/kg, uma vez que os animais tiveram uma melhora na eficiência alimentar e marmoreio da carne além de não alterar o desempenho e maioria das características da carcaça.

Por outro lado, a glicerina bruta pode ter um efeito prejudicial no crescimento de bactérias estruturais fermentadoras de carboidratos, o que impacta negativamente o crescimento de bactérias celulolíticas, resultando em uma redução na digestibilidade das fibras, consequentemente diminuindo a ingestão de matéria seca e a produção de metano. Já

outros estudos relatam que não houveram efeitos negativos na fermentação ruminal quando foram incluídos 12% de glicerina bruta na alimentação (Almeida & Paschoaloto, 2019).

Glicerol e metabolismo hepático

O glicerol é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células (Menten et al., 2009). O álcool é usado como aditivo energético na nutrição de ruminantes por suas propriedades glicogênicas e anti-cetogênicas. O glicerol faz parte da fração lipídica da dieta de ruminantes (Khattab, 2015).

Uma vez no rúmen, tem fermentação rápida, e, portanto sua concentração se mantém baixa no líquido ruminal (Khattab, 2015), pode ainda ser absorvido diretamente pelo epitélio ruminal, metabolizado no fígado e através da enzima quinase, convertido em glicose na gliconeogênese. A porção não absorvida é fermentada em propionato e transformada o oxaloacetato, que, também no metabolismo hepático, através do ciclo de Krebs, servirá como precursor para gliconeogênese (Krehbiel, 2008).

O transporte hepático de glicerol ocorre através de uma proteína denominada AQP9, uma aquagliceroporina localizada na membrana plasmática sinusoidal voltada para a veia porta que atua como um canal de captação de glicerol no fígado (Elkjaer et al., 2000). Segundo Calamita et al (2012) nos hepatócitos, a AQP9 é o principal sistema de transporte do glicerol para servir de precursor para gliconeogênese em situações de inanição. Os níveis hepáticos de RNAm da AQP9 aumentam em jejum, consequentemente aumentando os níveis de glicerol que servirá como precursor da gliconeogênese, já numa situação de alimentação os níveis de RNAm da AQP9 diminuem, reduzindo portanto os níveis de gliconeogênese à base de glicerol no fígado (Hibuse et al., 2006).

Quando em jejum, os adipócitos liberam triacilgliceróis, que são em parte convertidos em glicerol (Lebeck, 2014; Patsouris et al., 2004; Rodríguez et al., 2011b). Segundo Hagstrom-Toft et al., (1997) a concentração destes metabólitos é proporcional à quantidade de gordura corporal, homens obesos atingem concentrações mais altas.

Glicerol e metabolismo renal

O glicerol é metabolizado principalmente no fígado e rins, mas outros tecidos, como cérebro, pulmões, mucosa intestinal, tecido adiposo, esquelético e cardíaco músculos, leucócitos, fibroblastos e espermatozóides também usam glicerol, mas em pequenas

quantidades (Stryer *et al.*, 2008). Segundo Cryer & Hartley (1973) o excesso de glicerol na dieta pode induzir alterações anatômicas, adaptação fisiológica e bioquímica, principalmente do fígado e também dos rins.

De acordo com Robinson e Newsholme (1969), a capacidade enzimática de transformação de glicerol no corpo é limitada e quando seu consumo excede esta capacidade, pode não ser completamente metabolizada, aumentando assim seus níveis sanguíneos. Segundo Al Asmari *et al.*, (2017) as lesões induzidas pelo glicerol tem sua patogênese no estresse oxidativo uma vez que os níveis de Malondialdeído (MDA) foram maiores no tecido com lesão renal. A presença de lesões renal provocada pelo glicerol, tem como uma das explicações a presença de estresse oxidativo (Korrapati *et al.*, 2012).

Glicerol e espermatogênese

Foram identificadas a presença da enzima glicerol cinase 2 nos testículos indicando o envolvimento do glicerol no metabolismo energético das células da linhagem reprodutiva (Sargent *et al.*, 1994), por estar envolvido na manutenção da homeostase metabólica devido à sua especificidade ao tecido testicular, o glicerol possui papel regulador na fertilidade do indivíduo (Crisóstomo *et al.*, 2017).

Altas concentrações de glicerol nos testículos afetam as células de Sertoli, pois interferindo nas proteínas conhecidas como ocludinas, componentes das junções oclusivas, afetam a integridade da barreira hemato-testicular. O próprio citoesqueleto das células de Sertoli também sofrem danos, especificamente os microtúbulos e filamentos de actina (Wiebe *et al.*, 2000). De acordo com Wiebe e Barr (1984a) altas concentrações de glicerol provocam destacamento das células germinativas dos domínios da célula de Sertoli, fazendo com que sofram apoptose. A combinação de ambos os fatores, desintegração da barreira hemato-testicular com os danos sofridos pelo citoesqueleto das células de Sertoli podem levar a oligospermia ou mesmo azoospermia temporária ou permanente (Crisóstomo *et al.*, 2017).

Papel da alimentação na reprodução de ovinos

Um dos fatores que mais influencia o ciclo-reprodutivo de ovinos é a nutrição, perdendo apenas para o fotoperíodo (Maia *et al.*, 2011). Os efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento testicular envolvem resposta a curto ou longo prazo (Blache *et al.*, 2000). O

processo de reprodução é um conjunto de funções coordenadas em vários tecidos, tipos celulares e sistemas regulatórios que são possíveis apenas quando os animais tem acesso a uma quantidade adequada de nutrientes (Kaur & Arora, 1995). Em machos, a alta ingestão de energia aumenta a espermatogênese e fornece energia para melhorar comportamentos sexuais (Martin & WalkdenBrown, 1995). Segundo Santos et al., (2016) o desenvolvimento testicular está relacionado com o peso corporal, sendo, o nível nutricional fundamental na formação testicular de cordeiros jovens.

Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo, temporal e ordenado, que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as células espermatogoniais sofrem uma série de divisões e transformam-se em espermatozoides após sucessivas modificações (Hess & França, 2008; Hermo et al., 2010; O'donnell et al., 2017). O processo espermatogênico é dividido em três fases chamadas de proliferação, meiose e metamorfose, na proliferação a espermatogônia sofre várias mitoses para formar espermatócitos primários, a segunda fase é a cohecida como meiótica na qual os espermatócitos primários dão origem aos espermatócitos secundários e estes originam as espermatídes e na terceira e última fase, a espermatogênica, as espermatídes sofrem algumas diferenciações para originar o espermatozoide (Russell et al., 1993).

Função das células de Sertoli

Os túbulos seminíferos são túbulos são revestidos por um epitélio composto de células germinativas e de sustentação, as células de Sertoli, estas, não mais realizam mitose na fase adulta (Fawcett, 1975). As células de Sertoli fornecem suporte estrutural e organizacional à espermatogênese através do seu citoesqueleto bem elaborado, proporcionando apoio para a evolução das células, contribuindo no processo de espermiacão e maturação dos espermatozoides (Cheng & Mruk, 2012).

Cada célula de Sertoli faz contato com cinco outras células de Sertoli e, aproximadamente, 40-50 células germinativas em vários estágios de desenvolvimento e diferenciação (Sharma & Agarwal, 2011). Na parte basal das células de Sertoli há formações de junções de oclusão entre si, originando a barreira hemato-testicular, a qual divide o epitélio seminífero em uma compartimento basal e uma compartimento adluminal (Kierszenbaum, 2004). As junções oclusivas da barreira hemato-testicular separam as espermatogônias e os espermatócitos iniciais (pré-leptóteno) dentro do compartimento basal com acesso livre às

substâncias provenientes do interstício e vasos sanguíneos, enquanto que todas as células meióticas e pós-meióticas subsequentes se localizam no compartimento adluminal (Sharma et al., 2013; O'Donnell et al., 2017). (Figura 2).

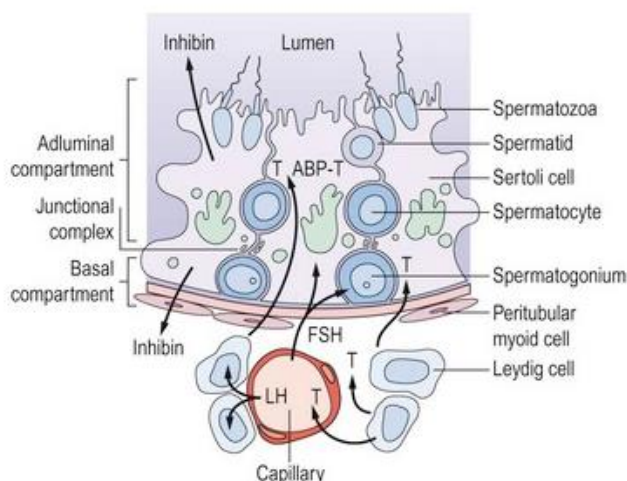


Figura 2. Representação de um corte transversal de um túbulo seminífero mostrando a distribuição de células germinativas ao longo do epitélio e a presença das junções de oclusão entre as células de Sertoli, formando a barreira hemato-testicular. Fonte: <https://obgynkey.com/disorders-of-male-reproduction/>

Ciclo do epitélio seminífero em carneiros

No interior dos túbulos seminíferos, em secções transversais, há uma associação altamente organizada entre células de Sertoli e células germinativas, ambas distribuídas de forma concêntrica no túbulo, as células germinativas imaturas, as espermatogônias, se localizam na base do epitélio adjacente à membrana basal, enquanto as células germinativas em estágio mais avançado de desenvolvimento ocupam camadas mais superiores próximas ao lúmen de modo que quanto mais madura esteja a célula, mais próxima do lúmen tubular estará (Sharma et al., 2013).

O epitélio seminífero apresenta perfis tubulares transversais com associações variadas de células germinativas de acordo com seus diferentes estágios de desenvolvimento, de modo que cada estágio apresenta tipos celulares específicos em associação (Hermo et al., 2010).

Em carneiros o ciclo da espermatogênese se dá em 8 estágios do ciclo do epitélio seminífero, descritos como se segue:

Estágio 1: Há duas gerações de espermatócitos primários. Pré-leptótenos estão parcialmente dentro do túbulo, mais especificamente entre o compartimento adluminal e o basal, no compartimento tubular intermediário. Paquítenos maiores estão situados mais perto do lúmen tubular. Uma geração de espermatídes na fase de capuz da espermiogênese localizada lateralmente nas células de Sertoli.

Estágio 2: Os leptótenos já atravessaram a barreira hematotesticular e a primeira geração de espermatócitos primários já atingiu o paquíteno tardio. Espermatídes entram na fase de acromossoma da espermiogênese e estão situados no ápice das células de Sertoli.

Estágio 3: os leptótenos do estágio 2 agora estão em zigóteno, os paquítenos do estágio anterior atingiram o diplóteno e as espermatídes continuam sua condensação e alongamento.

Estágio 4: Esta fase se estende da metáfase da primeira até a última divisão meiótica. podem-se ser encontrados espermatócitos secundários e espermatídes recém-formadas. Além de zigótenos jovens ou tardios, paquítenos e espermatídes alongados na fase acrossômica tardia.

Estágio 5 a 7: esta fase tem como característica apenas uma geração de espermatócitos primários mas duas gerações de espermatídes, as recém-formadas são maiores e estão na fase Golgi da espermiogênese enquanto as espermatídes mais maduras estão na fase de maturação da espermiogênese e são impelidas para o lúmen do túbulo.

Estágio 8: neste estágio ocorre a espermição, marcando o final do ciclo do epitélio seminífero, corpos residuais são observados próximos ao lúmen tubular. A geração anterior de espermatídes passa da fase Golgi para a fase de capuz da espermiogênese. Há a presença de espermatócitos primários que estão em paquíteno. Diferentes tipos e números de espermatogênias mantêm contato com a membrana basal durante todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero. (Fig. 1)

De acordo com a literatura, há conflito quanto ao estágio em que ocorre a espermição, em carneiros. Segundo Bilaspuri & Guraya (1986), ocorre no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, já consoante Wrobel et al. (1995), ocorre no estágio 8. Devido à recência do artigo, consideramos nesta revisão que a espermição ocorre no estágio 8 do ciclo do epitélio seminífero (Wrobel et al., 1995).

Em ovinos os oito estágios acima descritos tem duração média de 10,57 dias e, o tempo compreendido entre a mitose de uma espermatogônia até a liberação do espermatozoide no lúmen do túbulo seminífero corresponde a 42,28 dias. (Cardoso & Queiroz, 1988).

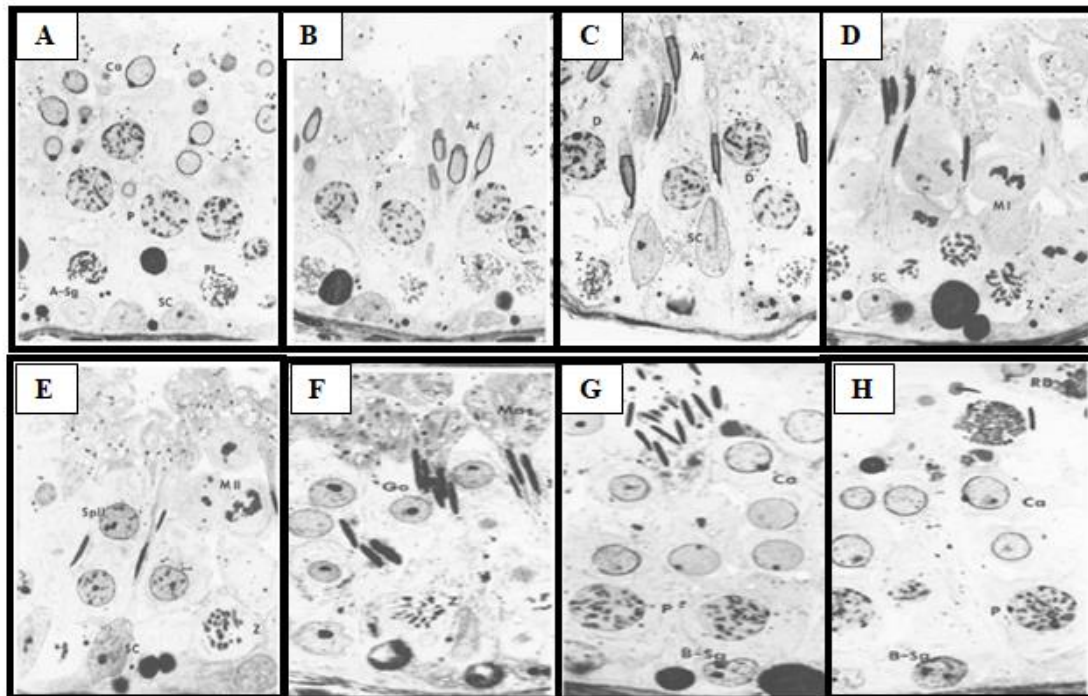


Figura 3. Os estágios do ciclo do epitélio seminífero em carneiros. Fig. 1 A: estágio1; Fig. 1 B: estágio 2; Fig. 1 C: estágio 3; Fig. 1 D e 1 E: estágio 4; Fig. 1 F: estágio 5 a 7; Fig. 1 G e 1 H: início do estágio 8 mostrando o início da espermiacção ; Fig. 1 G e 1 H: final do estágio 8 mostrando os corpos residuais próximo ao lúmen. Fonte: Wrobel et al. (1995).

Função das células de Leydig

Os testículos dos mamíferos são órgãos emparelhados que essencialmente executam duas funções, produção de espermatozoides conhecida como espermatogênese e síntese de esteróides (Hermo et al., 2010).

As células de Leydig estão presentes no espaço intersticial dos túbulos seminíferos sendo responsáveis pela produção de testosterona (Griswold et al., 2012) que ocorre sob o estímulo do LH e de maneira a atuar como um feedback negativo na hipófise (Sharma &

Agarwal, 2011). A testosterona tem diversas funções: a diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa, características inerentes ao comportamento sexual, desenvolvimento dos caracteres secundários, o início e a manutenção da espermatogênese e a manutenção do comportamento sexual normal e da atividade das glândulas acessórias (Sharma; Agarwal, 2011; Sharpe, 1994; Pelliniemi et.al., 1996).

Com arquitetura típica de uma célula secretora de esteróides, as células de Leydig conduzem a função espermatogênica, pois, a diferenciação das células germinativas tem como pré-requisito a estimulação de andrógenos. Nas células de Leydig ocorre a síntese de testosterona a partir do colesterol, e a regulação deste processo se dá através do hormônio luteinizante (LH). O processo espermatogênico é fatalmente interrompido caso haja inibição da síntese de testosterona. No testículo, os níveis deste hormônio são significativamente mais elevados quando comparados àqueles encontrados no sangue (Ge *et al.*, 2009).

Histofisiologia Hepática

O fígado é o maior órgão do corpo humano constituindo aproximadamente 2% do peso corporal total, suas funções estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, e proteínas, armazenamento de vitaminas e sais minerais, produção de componentes da cascata de coagulação, modificação, remoção ou excreção de fármacos, hormônios e outras substâncias (Guyton & Hall, 2011; Ito & Adachi-Akahane, 2013). Localiza-se na parte superior direita da cavidade abdominal, abaixo do diafragma, protegido pelas últimas costelas (Juza & Pauli, 2014).

O fígado está envolto pela cápsula conjuntiva, chamada cápsula de Glisson e pelo peritônio na região em contato com o diafragma, o tecido que compõe a cápsula penetra o parênquima formando septos que divide o tecido hepático em lóbulos, o lóbulo hepático é a unidade funcional básica do fígado, construído em torno de uma veia central que drena para as veias hepáticas e daí para a veia cava. O lóbulo é composto por placas de hepatócitos de espessura de duas células que se irradiam e distribuem-se como raios de uma roda, entre os cordões de hepatócitos estão os canalículos biliares que drenam para os ductos biliares. Nos septos que delimitam os lóbulos hepáticos há vênulas portais que irrigam os sinusóides hepáticos e estes, por sua vez, alimentam a veia central, localizada na porção central do lóbulo hepático, sendo assim as células hepáticas estão continuamente expostas ao fluxo venoso porta. As arteríolas hepáticas também localizadas no septo interlobular transportam sangue

arterial para os tecidos septais entre lóbulos adjacentes e para os sinusóides hepáticos (Guyton & Hall, 2011).

Cada lóbulo hepático tem forma poligonal e em seus vértices há a tríade portal formada pelas ramificações da veia porta, artéria hepática e canal biliar. O ácino hepático compõe o lóbulo hepático e é didaticamente dividido em zonas 1, 2 e 3. A zona 1, também chamada de periportal é a primeira a receber sangue com alto conteúdo de oxigênio, insulina e glucagon, tem alta taxa metabólica, e é a que apresenta maior poder de regeneração, a zona 2, mediolobular recebe conteúdo intermediário de oxigênio e outros nutrientes, já a zona 3, centrilobular, recebe sangue por último e está mais propensa a sofrer necrose em situações de hipóxia (Kierszenbaum, 2004).

Além de hepatócitos, os sinusóides venosos são revestidos por células endoteliais típicas e as células de Kupffer, estas, são macrófagos residentes capazes de fagocitar bactérias ou qualquer corpo estranho no sangue dos capilares sinusóides (Guyton & Hall, 2011).

Histofisiologia Renal

Os dois rins se situam na parede posterior do abdomen, fora da cavidade peritonal, tem formato de feijão apresentando uma forma convexa e outra côncava onde fica o hilo, nele entram e saem vasos sanguíneos, entram nervos e saem ureteres. O rim é constituído pela cápsula de tecido conjuntivo denso, a zona cortical e a medular. A zona medular é composta de 10 a 12 pirâmides medulares cujos vértices causam saliência nos cálices renais. Da base da pirâmide partem os raios medulares que penetram à cortical. O lobo renal é formado pela pirâmide e o tecido cortical que fica ao seu redor, o túbulo urinífero é composto pelo néfron e o túbulo coletor. O néfron é formado por uma parte dilatada, o corpúsculo renal ou de Malpighi, túbulo contorcido proximal, parte delgada e espessa da alça de Henle e pelo túbulo contorcido distal (Guyton & Hall, 2011; Junqueira & Carneiro, 2013)

O corpúsculo renal tem aproximadamente 200 μm de diâmetro e é formado por um emaranhado de capilares, o glomérulo, que por sua vez, é envolvido pela cápsula de Bowman, esta cápsula contém dois folhetos entre os quais está o espaço capsular este, tem a função de receber o líquido filtrado no glomérulo através da parede dos capilares e do folheto visceral, que está em contato direto com o glomérulo, da cápsula. (Junqueira & Carneiro, 2013).

Os rins desempenham importantes funções no organismo como excreção de produtos indesejáveis do metabolismo, regulação do balanço hídrico, da osmolalidade dos líquidos corporais, da pressão arterial, do balanço ácido básico, secreção metabolismo e excreção de hormônios e gliconeogênese. O fluxo sanguíneo para os dois rins corresponde a 22% do débito cardíaco, e, cerca de 170 L de filtrado glomerular são produzidos por dia pelos rins, pois cada um tem cerca de 800.000 a 1 milhão de néfrons, cada um capaz de formar urina. Em cada corpúsculo renal penetra uma arteríola aferente e sai e uma arteríola eferente, e o filtrado glomerular se forma devido a pressão hidrostática nos capilares que é maior que a pressão osmótica dos colóides do plasma e a pressão do líquido contido na cápsula de Bowman (Guyton & Hall, 2011; Junqueira & Carneiro, 2013; Rayner *et al.*, 2015).

Estresse oxidativo

Segundo Sies (1985) o estresse oxidativo é definido como desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelos sistemas de proteção antioxidante (Persson *et al.*, 2014). Radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (Halliwell, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas com alto grau de instabilidade, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella, 1997).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (Anderson, 1996). Em contrapartida à contínua geração de radicais livres durante processos relacionados ao metabolismo, o organismo possui diversos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Sies, 1993). Por meio da ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), o organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos, o que forma o mecanismo antioxidante enzimático (Ribeiro *et al.*, 2005). A SOD converte enzimaticamente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Droge, 2002) enquanto a CAT é responsável pela decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Aebi, 1984). A GST é responsável pela desintoxicação celular contra substratos exógenos como medicamentos. (Habig *et al.*, 1974; Hermes-Lima, 2004). O Malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica e pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo (Janero, 1990). O MDA

possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (Antunes et al., 2008). O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, com alta afinidade pelas hemoproteínas ferrosas, que está envolvido em importantes eventos fisiológicos, tem função neurotransmissão, anti-inflamação e e tem função reguladora sobre o relaxamento do músculo liso e inibição da adesão plaquetária (Ricart-Jané et al., 2002; Droge, 2002). Além de estar relacionado ao controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira testicular (Gilio et al., 2008).

Apesar da presença de todo um conjunto enzimático antixidante, a alimentação é indispensável para o sucesso dessas defesas, uma vez que, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo (Ribeiro et al., 2005). Entre os nutrientes da dieta com ação antioxidante destacam-se as vitaminas E, A e C e os minerais zinco, manganês, cobre e selênio (Panziera et al., 2011; Zimmermann & Kirsten, 2008).

As EROs podem ter efeito positivo ou negativo na viabilidade do espermatozoide, dependendo da concentração e do tempo de exposição a esses radicais, no entanto, ultrapassando um limiar, resulta em prejuízos (Fallahi et al., 2015). Segundo Wagner et al. (2018) as EROs desempenham importante papel na infertilidade masculina., pois, diversos estudos relatam que o estresse oxidativo leva a defeitos na função e motilidade espermática, dentre outros. Estima-se que de 30 - 80% dos casos de infertilidade masculina podem estar relacionados ao estresse oxidativo.

Segundo Ratliff *et al.*, 2016, todas as formas de lesões renais durante a progressão da doença, estão associadas a ação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) que podem causar dano ao tecido como um todo. De acordo com Segundo Cichoż-Lach & Michalak (2014) estudos da EROs podem explicar a patogênese de vários distúrbios hepáticos assim como realizar o diagnóstico do grau de lesão da doença.

3. Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar o efeito de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos sobre morfofuncionalidade testicular, renal e hepática.

Objetivos específicos

- Avaliar o peso e mensuração testicular e epididimária relacionando com os diferentes níveis de glicerina bruta recebidos por cada grupo experimental;
- Calcular o índice gonadosomático (IGS) dos animais;
- Determinar a influência da inclusão de glicerina bruta sobre o diâmetro tubular, altura de epitélio seminífero, comprimento total dos túbulos seminíferos e a população de células de Leydig;
- Determinar a influência da inclusão de glicerina bruta sobre os níveis plasmáticos de testosterona;
- Determinar os indicadores do estresse oxidativo em homogeneizado de testículo;
- Determinar o nível de peroxidação lipídica em plasma sanguíneo;
- Determinar a influência da inclusão de glicerina bruta sobre a histomorfometria e histopatologia do parênquima hepático;
- Determinar a influência da inclusão de glicerina bruta sobre a histomorfometria e histopatologia do parênquima renal;
- Realizar análise histoquímica do parênquima hepático e renal através dos corantes H. E, PAS e tricrômico de Masson;

4. Material e métodos

Local do Experimento

O experimento foi executado no setor de caprinovinocultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado no município de Recife (PE) e situado sob as coordenadas geográficas de 8°04'03''S e 34° 55' 00'' W. No laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), no laboratório de Central Analítica do Cenapesq. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal em pesquisa (CEUA-UFRPE), sob o número de licença 059/16.

Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 40 cordeiros da raça Santa Inês, machos, não castrados, com seis meses de idade e peso médio inicial de aproximadamente $21,0 \pm 0,8$ Kg. Foram mantidos em baias individuais com 1,0 x 1,8 m providos de bebedouros e comedouros, dispostas em aprisco coberto.

Antes do início do experimento todos os animais foram identificados e submetidos ao controle de ectoparasitos e endoparasitos com uso de piretróides e vacinados contra clostridioses. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com período experimental de 90 dias, sendo os 24 primeiros dias destinados à adaptação dos animais às instalações, às dietas e ao manejo, e os 66 dias restantes para avaliação e coleta de dados.

Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca que foi adicionada ao concentrado para homogeneizar os ingredientes e dietas. As dietas também foram formuladas para serem isonitrogenadas e atingirem os requisitos nutricionais de um cordeiro em crescimento até 250 g d⁻¹ de acordo com o NRC (2007) (Tabela 1). A glicerina bruta aplicada em nossa pesquisa foi obtida da produção de biodiesel através da semente óleo de algodão na indústria CETENE localizada em Caetés-PE.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes e composição química das dietas de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Ingredientes (%)	Níveis de glicerina bruta (%)			
	0	6	12	18
Feno de Tifton	40.00	40.00	40.00	40.00
Milho Grão	40.35	34.10	27.85	21.60
Farelo de soja	17.00	17.00	17.00	17.00
Glicerina Bruta	0.00	6.00	12.00	18.00
Ureia: SA	0.50	0.75	1.00	1.25
Suplemento Mineral ¹	1.50	1.50	1.50	1.50
Calcário Calcítico	0.30	0.30	0.30	0.30
Fosfato Bicálcico	0.35	0.35	0.35	0.35
Composição Química (g.Kg ⁻¹ MS)				
Matéria Seca (g.Kg ⁻¹ MN)	890.1	891.4	893.9	892.0
Matéria Orgânica	921.5	915.7	910.0	904.3
Cinzas	78.5	84.3	90.0	95.7
Proteína Bruta	161.6	163.3	164.9	166.6
Extrato Etéreo	33.3	32.0	30.4	29.2
Fibra Detergente Neutro ²	386.2	376.3	366.3	356.4
Carboidratos Não Fibrosos	348.5	356.2	364.5	372.2

¹ Níveis de garantia (nutrientes/kg): Cálcio-150g; Enxofre-12g; Fósforo-65g; Magnésio- 6.000mg; Sódio-107g; Cobre-100mg; Cobalto-175mg; Ferro-1000mg; Flúor máximo 650mg; Iodo-175mg; Manganês-1440mg; Selênio-27mg e Zinco-6000mg. ² Fibra em Detergente Neutro foi corrigida para cinzas e proteínas. ³ Estimado em ensaio de digestibilidade.

As dietas eram fornecidas como uma mistura completa duas vezes por dia às 08:00 da manhã (50%) e às 16:00 (50%). Para estimar a ingestão voluntária as sobras foram recolhidas e pesadas antes de cada hora de alimentação, então a ingestão por o animal foi estimada pela diferença entre a oferta e a recusa até 15%. Amostras das dietas e sobras foram coletadas semanalmente por animal e tratamento, bem como ingredientes utilizados na ração que foram submetidos à secagem em estufa a 55 °C por 72 h, triturados em um moinho peneira de 2 mm (©Wiley).

Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a uma dieta hídrica de 8 horas e jejum de sólidos por 16 horas a fim de realizar-se a eutanásia. O procedimento de eutanásia foi realizado de acordo com as normas do CFMV (2013).

Coleta e processamento de fragmentos de fígado e rim

Foram coletados fragmentos de tecido renal e hepático dos animais e acondicionados em formol tamponado a 10% com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M e pH 7,3 para posterior análise histopatológica com inclusão em parafina, obtenção de cortes de 4 µm de espessura e coloração pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) de acordo com protocolo de Tolosa et al., (2003). Logo após os tecidos foram submetidos à outras diferentes técnicas de coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar a expressão de glicosaminoglicanos e ao Tricrômico de Masson (TM) para evidenciar a deposição de colágeno. Tais protocolos foram realizados de acordo com Spicer (1987).

Os fragmentos foram analisados morfolologicamente e histopatologicamente em objetiva com aumento de 100X e 400x utilizando programa LAZ EZ versão 4.1.0. em microscópio (modelo LEICA DM 500E ®), na área de patologia animal, laboratório de histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Coleta de gônadas, peso e testicular, epididimário, mensuração testicular e índice gonadossomático

Foi coletado o complexo testículo-epidídimo (CTE). O testículo e o epidídimo foram pesados individualmente em balança digital (modelo Kern 410) com precisão de quatro casas decimais, e mensurados (altura e largura) com auxílio de paquímetro. O índice gonadossomático foi calculado através da soma do peso de ambos os testículos, dividida pelo peso corporal do animal, sendo referenciado em porcentagem (Barbosa et al., 2012).

Análise histomorfométrica do parênquima testicular

De cada animal, os testículos foram utilizados para as análises microscópicas. Após as mensurações, os testículos e epidídimos foram seccionados em fragmentos de até 2mm de espessura os quais foram submetidos à fixação em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de sódio, 0,01 M e pH 7,2 . O testículo contralateral foi separado do respectivo epidídimo, pesado e identificado sendo acondicionado em papel alumínio e saco plástico a -20 °C. Os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol-

metacrilato, clivados (4µm de espessura) e corados com azul de toluidina/borato de sódio a 1% para a avaliação em microscópio óptico (Tenorio *et al.*, 2011).

O diâmetro tubular e altura do epitélio médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de quinze secções transversais de túbulos seminíferos com perfil mais redondo possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas em um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio de marca Leica modelo DM500E. Ambas as medidas foram obtidas utilizando-se o programa Image J para Windows (Oliveira *et al.*, 2017).

A proporção volumétrica de cada componente do parênquima testicular foi estimada utilizando-se 15 fotos de campos escolhidos aleatoriamente, em aumento total de 400x, que foram obtidas utilizando-se o mesmo sistema de captura citado acima. Em cada foto, foram sobrepostos 441 pontos, utilizando o mesmo programa citado acima, perfazendo um total de a partir 6.615 pontos por animal (Tenorio *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015).

O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo 11% equivalente ao peso da túnica albugínea e do mediastino testicular (Wrobel *et al.*, 1995). Como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04; França & Russell, 1998), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) foi calculado de acordo com Silva *et al.*, (2006). O volume nuclear das células de Leydig foi obtido de acordo com Oliveira *et al.*, (2017) e Silva *et al.*, (2014). Os volumes citoplasmático e celular destas células, assim como seu número total por testículo e por grama de testículo foi calculada de acordo com Oliveira *et al.*, (2017).

Análise histopatológica do parênquima testicular

Para avaliar qualitativamente o epitélio germinativo foram escolhidos aleatoriamente 10 secções de túbulos seminíferos por animal e foram contabilizados os espermatócitos em processo de necrose e células gigantes. Posteriormente considerou-se a média desses valores por grupo. As secções de túbulos seminíferos foram avaliadas também quanto à presença de descamação de epitélio seminífero, vacuolização de célula de Sertoli e espessamento de membrana basal.

Processamento Histológico dos Parênquimas Hepático e Renal

Fragmentos de tecido renal e hepático dos animais foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M e pH 7,3. Estes fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina, cortados na espessura de 4 μ m e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (Tolosa *et al.*, 2003). Os cortes histológicos foram corados pelas técnicas do Ácido Periódico de Schiff (PAS) para detecção de glicogênio hepático e marcação de membrana basal em tecido renal e Tricrômico de Masson (TM) para detectar a deposição de colágeno (Spicer, 1987).

Os fragmentos foram analisados e fotomicrografados em microscópio óptico LEICA DM500E nos aumentos de 100X e 400X utilizando programa LAS EZ versão 4.11, na Área de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Análise histomorfométrica do parênquima hepático

A avaliação morfométrica do parênquima hepático foi realizada em um sistema digital de captura de imagem acoplado ao microscópio de marca Leica modelo DM500E. Por fragmento de tecido hepático, 10 campos aleatórios foram escolhidos aleatoriamente e analisados no programa Image J. Para estimar a proporção ocupada por cada componente do tecido hepático foi sobreposta uma grátula de 100 pontos nas fotos obtidas e considerados os pontos sobre as seguintes estruturas: núcleo, citoplasma, veia centrolobular, células de Kupffer, espaço porta e capilar sinusóide. Posteriormente considerou-se as médias por grupo de cada valor encontrado, conforme a metodologia adaptada de Monteriro *et al.* (2009). Os hepatócitos foram avaliados quanto à presença / ausência e ao número de núcleos, em seguida se determinou a porcentagem desse parâmetro por grupo experimental.

Análise histomorfométrica do parênquima renal

No córtex renal, os corpúsculos renais por grupo (n=240), foram escolhidos aleatoriamente em aumento de 400X. As imagens destinadas a morfometria foram capturadas em microscópio digital de marca Leica DM500E. Utilizando o software Image J, foram calculadas as áreas da cápsula de Bowman e do glomérulo, posteriormente a área do espaço

capsular foi determinada pela diferença entre os dois parâmetros anteriores. Os corpúsculos renais utilizados para análise quantitativa foram avaliados quanto a normalidade estrutural, atrofia, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite membranosa, presença de albumina nos túbulos renais e nefrite (Danilewicz & Wagrowska-Danilewicz, 1998).

Considerou-se sendo 100% a soma dos glomérulos normais, atrofiados e com glomerulonefrite proliferativa por grupo. Para os parâmetros glomerulonefrite membranosa, depósito de albumina e nefrite considerou-se 100% dos túbulos analisados para cada grupo.

Análise da testosterona plasmática

Amostras de sangue foram colhidas no dia anterior a eutanásia por venopunção jugular. O plasma foi separado por centrifugação e acondicionados em duplicata em tubos cônicos plásticos (2ml) e armazenadas à temperatura de -20 °C. A dosagem hormonal foi realizada pelo método de eletroquimioluminescência (Access2 - Beckman Coulter (Edital Pró-Equipamento CAPES/UFRPE aparelho de análise), utilizando-se kit comercial de referência 33560.

Marcadores de estresse oxidativo no tecido testicular

O parênquima testicular foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M combinado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1M e a suspensão centrifugada a 13,8 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (100 mg de tecido por mL) foi utilizado para a análise de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GST), bem como da concentração de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malondialdeído (MDA). As análises foram realizadas em duplicata.

A atividade de SOD foi estimada pelo método da xantina-oxidase baseada na produção de H₂O₂ (Dieterich et al., 2000); A atividade de CAT foi avaliada medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (Aebi, 1984) e a atividade da enzima GST foi estimada por espectrofotometria através da formação do conjugado glutathione 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974) e calculado a partir da taxa de oxidação de NADPH. A peroxidação lipídica foi avaliada analisando os níveis de malondialdeído (MDA). Para isso alíquotas de parênquima testicular (100mg) foram homogeneizadas em tampão

fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M e encubados em ácido tiobarbitúrico para ver os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-(TMPO) (Wallin et al., 1993). A concentração de proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. Os marcadores de estresse foram normalizados pelos níveis de proteínas totais (Lowry et al., 1951).

A produção de NO foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito/ nitrato pela reação de Griess padrão (Ricart-Jané et al., 2002) A produção de H₂O₂ foi mensurada no sobrenadante através da reação do dicloridrato de fenilenoamina (OPD) e peroxidase do tipo II (Oliveira et al., 2018). A conversão da absorbância em concentração de H₂O₂, calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H₂O₂. Os resultados foram expressos em μ M.

Avaliação da peroxidação lipídica através da concentração de malondialdeído (MDA) no plasma sanguíneo

A peroxidação lipídica foi avaliada analisando os níveis de malondialdeído (MDA). Para isso alíquotas de plasma sanguíneo foram encubadas em ácido tiobarbitúrico para ver os níveis de substâncias reativas ao mesmo. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Wallin *et al* (1993). As análises foram realizadas em duplicata.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

5. Referências bibliográficas

Aebi, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods Enzymol**; v.105, p.121–126. 1984.

Al Asmari, A. K., Al Sadoon, K. T., Obaid, A. A., Yesunayagam, D., Tariq, M. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. **BMC Nephrology**, 18, 1. 2017.

Almeida, M. T. C., Paschoaloto, J. R. Inclusion of Crude Glycerin in Diets for Sheep. **IntechOpen**. 2019.

Alves, K. S., Carvalho, F.F.R., Ferreira, M. A., Chaves Vêras, A. S., Medeiros, A. N., Nascimento, J. F., Nascimento, L. R. S., Anjos, A.V. A. Níveis de Energia em Dietas para Ovinos Santa Inês: Características de Carcaça e Constituintes Corporais. **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1927-1936. 2003.

Anderson, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

Andrade, G. P., Carvalho, F. F. R., Batista, A. M. V., Pessoa, R. A. S., Costa, C. A., Cardoso, D. B., Maciel, M. V. Evaluation of crude glycerin as a partial substitute of corn grain in growing diets for lambs. **Small Ruminant Research**, v.165, p. 41–47. 2018.

Antunes, M. V., Lazzaretti, C., Gamaro, G. D., Linden, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, 2008.

Appleby DB. Glycerol. In: Knothe G, van Gerpen J, Krahl J, editors. **The biodiesel handbook**. AOCS Publishing; 2005.

Barbosa, L.P.; Oliveira R.L.; Silva T.M.; Jesusi.B.; Garcez Neto, A.F.; Bagaldo, A.R. Morfometria testicular de cabritos alimentados com óleo de licuri (Syagrus coronata) **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.4, 2012.

Beatriz, A., Araújo, Y. J. K., Lima, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quím. Nova**, v. 34 n.2, 2011.

Bilaspuri, G. S., Guraya, S. S. The seminiferous epithelial cyclb and spermatogenesis in rams (Ovis aries) **Theriogenology**. v. 25, p. 6, 1986.

Blache, D.; Chagas, L. M.; Blackberry, M. A.; Vercoe, P. E.; Martin, G. B. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p.1-11, 2000.

Blieck, J., Affouard, F., Bordat, P., Lerbret, A., Descamps, M. Molecular dynamics simulations of glycerol glass-forming liquid. **Chemical Physics**, v. 317, p. 253–7. 2005.

Calamita G., Gena P., Ferri D, Rosito A, Rojek A, Nielsen S, Marinelli RA, Frühbeck G, Svelto M. Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol. *Biol Cell*. v. 104, p. 342-51. 2012.

Cardoso, F. M.; Queiroz, G. F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v.17, p.77-88, 1988.

Cichoż-Lach, H.; Michalak, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, 20, 8082, 2014.

Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (2013) Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais, Brasília - DF.

Cheng, C. Y.; Mruk, D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. **Pharmacological Reviews**, v.64, n.1, p.16–64, 2012.

Choi WJ. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 3, p.173–80, 2008.

Crisóstomo, L., Alves, M. G., Calamita, G., Sousa, M., Oliveira, P. F. Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. **Molecular Human Reproduction**, v. 23, n.11 p. 725–737, 2017.

Cryer, A.; Hartley, W. Studies on the adaptation of rats to a diet high in glycerol. **International Journal of Biochemistry**, 4, 293- 308. 1973.

Danilewicz, M.; Wagrowska-Danilewicz, M. Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. *Clin. Investigation*, 4, 955-959. 1998.

Dasari, M. A., Kiatsimkul, P.P., Sutterlin, W. R., Suppes, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n.1, p. 225-231, 2005.

Dieterich, S., Bielick, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v.101, p. 33–39, 2000.

Droge, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. v. 82, p. 47-95, 2002.

Elkjaer, M; Vajda, Z.; Nejsum, L. N.; Kwon, T.; Jensen, U.B.; Amiry-Moghaddam, M.; Frokiaer, J.; Nielsen S. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1118–1128, 2000.

Embrapa. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Andrade, C. M. S., Valentim, J. F., Cavalcante, F. A., Valle, L. A. R. Padrões de Desempenho e Produtividade Animal para a Recria-Engorda de Bovinos de Corte no Acre. 2005.

Fallahi, S., Rajaei, M., Malekzadeh, K., Kalantar, S. M. Would Phoenix Dactylifera Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males' infertility? A systematic review. **Electron Physician**, v. 7, 8, p. 1590-1596, 2015.

Fawcett, D. W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton DW, Greep R, editors. **Handbook of physiology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. P. 21–55, 1975.

Foglia, T. A., Nelson, L. A., Marmer, W. N. Production of biodiesel lubricants and fuel and lubricant additives, Patent US5713965; 1998.

França, L.R. e Russell, L.D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia, F. (Ed.). **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, p. 197-219, 1998.

Ge, R., Chen, G., Hardy, M. P. The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, p. 255–269, 2009.

Gilio, J. M., Borella, M. I., Camargo, A. C. M., Silva, C. A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. **ConScientiae Saúde**. v. 7, n. 1, p. 69-76, 2008.

Gomes, M. A. B., Moraes, G. V., Mataveli, M., Macedo, F.A.F., Carneiro, T.C., Rossi, R. M. Performance and carcass characteristics of lambs fed on diets supplemented with glycerin from biodiesel production. **R. Bras. Zootec.** v.40, n. 10, 2011.

Gunn, P. J., Near, M. K., Lemenager, R. P., Lake, S. L. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **J. Anim. Sci.**, v. 88, p. 1771-1776, 2010.

Guyton, A.C., Hall, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica* (*), 12^a ed., Ed. Elsevier, 2011.

Griswold M.D.; Hogarth, C. A.; Bowles, J.; Koopman P. Initiating meiosis: the case for retinoic acid. **Biology of Reproduction**, v.2, n.35, p.1–7, 2012.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem** v. 249, p. 7130–7140. 1974.

Hagstrom-Toft, E., Enoksson, S., Moberg, E., Bolinder, J., Arner, P. Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. **Am J Physiol.** v. 3, p. E584–E592. 1997.

Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

Hermes-Lima, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B., Ed., **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 319-368, 2004.

Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**. v. 73, n.4, p. 279-319 , 2010.

Hess, R. A., França, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng, C. Y. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Series: Adv. Exp. Med. Biol., v. 636, p.1-15, 2008.

Hibuse, T., Maeda, N., Nagasawa, A., Funahashi, T. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 1004–1011. 2006.

Ito, M.; Adachi-Akahane, S. Inter-organ communication in the regulation of lipid metabolism: focusing on the network between the liver, intestine, and heart. **J Pharmacol Sci**, v. 123, n. 4, p. 312-7, 2013.

Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 9, p. 515-540, 1990.

Junqueira, L. C. U.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**.2013

Juza, R. M.; Paull, E. M. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians. **Clin Anat**, v. 27, p. 764-9, 2014.

Kaur, H., Arora, S. P. Dietary Effects on Ruminant Livestock Reproduction with Particular References to Protein. **Nutrition Research Reviews**. v. 8, p. 121-136, 1995.

Kierszenbaum, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução a Patologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.

Korrapati, M. C.; Shaner, B. E.; Schnellmann, R. G. Recovery from Glycerol-Induced Acute Kidney Injury Is Accelerated by Suramin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 341, 126–136. 2012.

Khattab, M. S. A. Glycerol as Feedstuff for Ruminant. **Science International**. v. 3, n. 3, p. 90-94, 2015.

Krehbiel, C. R. Ruminant and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 86, p.392, (Supplement). 2008.

Ladeira. M. M.; Carvalho, J. R. R.; Chizzotti, M. L.; Teixeira, P.D.; Dias, J. C. O.; Gionbelli, T. R. S.; Rodrigues, A. C.; Oliveira, D. M. Effect of increasing levels of glycerin on growth rate, carcass traits and liver gluconeogenesis in young bulls. **Animal Feed Science and Technology**, 219, 241–248. 2016.

Lammers, P. J., Kerr, B. J., Honeyman, M. S., Stalder, Dozier, K. W. A. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Poult. Sci**. v.87, p. 104-107. 2008.

Lardy, G. **Feeding Corn to Beef Cattle**. North Dakota State University Fargo, North Dakota, 2018.

Lebeck, J. Metabolic impact of the glycerol channels AQP7 and AQP9 in adipose tissue and liver. **J Mol Endocrinol.** v. 2, p. R165–R178. 2014

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Rabdall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Anal Biochem.** v. 193, p. 265–275. 1951.

Maia, M.S.; Medeiros, I.M.; Lima, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 35, n.2, p.175-179, 2011.

Mach, N., Bach, A., Devant, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high concentrate diets. **J. Anim. Sci.**, v. 87, p. 632-638. 2009.

Martin, G. B., Walkden-Brown S. W. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. In: **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 49. p. 437-449. 1995.

Menten, J. F. M., Miyad, A. V. S., Berenchtein, B. **Glicerol na Alimentação Animal.** 2009.

Monteiro, J. C.; Matta, S. L. P.; Predes, F. S.; Oliveira, T. T. Liver Morphology and Morphometry and Plasma Biochemical Parameters of Wistar Rats that Received Leaf Infusion of *Rudged viburnoides Benth.* (Rubiaceae) **Braz. Arch. Biol. Technol.** 52, 407-412. 2009.

National Research Council - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D.C. **National Academy Press**, p. 362, 2007.

O'donnell, L.; Stanton, P.; Kretser, D. M. **Endocrinology of the male reproductive** system and spermatogenesis. In: De Groot, L. J.; Chrousos, G.; Dungan, K.; Feingold, K. R.; Grossman, A.; Hershman, J. M.; Koch, C.; Korbonits, M.; Mclachlan, R.; New, M.; Purnell, J.; Rebar, R.; Singer, F.; Vinik, A. (Ed.). Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com. 2017.

Oliveira, J. S.; Silva, A. A. N.; Magalhães, C. P.; Souza, S. L.; Silva Junior, V. A.; Neves, E. M. Protein restriction during intrauterine and lactation periods: effects on testicular development in pre-puberty rats. **Acta Sci Biol Sci**, v. 37, n. 1, p. 107-112. 2015.

Oliveira, J. S.; Silva, A. A. N.; Souza, S. L.; Morais, R. N.; Neves, E. M.; Maia, F. C. L.; Silva Junior, V. A. Histomorphometric evaluation of the testicular parenchyma of rats submitted to protein restriction during intrauterine and postnatal life. **Turk J Biol**, v. 41, p. 428-438, 2017.

Oliveira, J. M., Losano N. F., Condessa, S. F., Freitas, R. M. P., Cardoso, A. S., Freitas, M. B., Oliveira, L. L. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safet.** v. 148, p. 684–692. 2018.

Panziera, F. B., Dorneles, M. M., Durgante, P. C., Silva, V. L. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Rev Bras Geriatr Gerontol.** v. 14, n. 1, p. 49-58. 2011.

Parsons, G. L., Shelor, M. K., Drouillard, J. S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v.87, p.653-657, 2009.

Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, P. J., Escher, P., Tan, N. S., Havekes, L. M., Koenig, W., März, W., Tafuri, S., Wahli, W. PPAR α governs glycerol metabolism. **J Clin Invest.** v. 1, p. 94–103, 2004.

Pelliniemi, L. J., Kupio, T., Frodjam, K. The cell biology and functional of fetal Leydig cell. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russel, L. D. **The Leydig cell**. Viena: Cache river press, p. 143-157, 1996.

Persson, T., Popescu, B. O., Cedazo-Minguez, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** p. 1-11, 2014.

Pompella, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.67, 5, 289-297, 1997.

Quispe, C. A. G., Coronado, C. J. R., Carvalho, J. A. Jr. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 27, p. 475–493, 2013.

Rahmat, N., Abdullah, A. Z., Mohamed, A. R. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: a critical review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews.** v. 14, p. 987–1000, 2010.

Ratliff, B. B.; Abdulmahdi, W.; Pawar, R., Wolin, M. S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, 25, 119–146. 2016 .

Rayner H, Thomas M, & Milford D (2015) **Kidney Anatomy and Physiology. Understanding Kidney Diseases**, 1–10.

Ribeiro, S.M.R., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. 21, 3, 133149, 2005.

Ricart-Jané, D., Llobera, M., López-Tejero, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v. 6, n. 2, p: 178-185, 2002.

Robinson, J.; Newsholme, A. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. **Journal of Biochemistry**, 112, 449-453. 1969.

Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., García-Navarro S., Rotellar, F., Valentí V, Silva, C., Gil, M. J., Salvador, J., Burrell, M. A. Insulin-and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 4, p. E586–E597. 2011b.

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., A.P., Clegg, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 83 , p.1-40, 1993.

Santos, R. A. Vargas Junior, F. M., Seno, L. O., Orrico, A. C. A., Botiini Filho, F. D. E., Senegalhe, F. B. D., Cansian, K., Longo, M. L. Biometria testicular de ovinos Pantaneiros alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**. v.17, n.2, p. 311-321. 2016.

Sargent, C. A., Young, C., Marsh, S., Ferguson-Smith, M. A., Affara, N. A. The glycerol kinase gene family: structure of the Xp gene, and related intronless retroposons. **Hum Mol Genet**. v. 8, p.1317–1324. 1994.

Sies, H. Oxidative stress. **Scientific Research**. p. 1 - 507, 1985.

Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

Silva Jr, V. A, Vieira, A. C. S., Pinto, C. F., De Paula, T. A. R., Palma, M. B., Amorin, M. J. A. A. L., Amorin Jr, A. A., Manhães-De-Castro, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev**. v. 46, n. 2, p. 157–166, 2006.

Silva, C.L.S. Glicerina proveniente da produção de biodiesel como ingrediente de ração para frangos de corte. 2010. 81f. **Dissertação de Mestrado**, 2010.

Silva, A. A. N., Oliveira, J. S.; Oliveira, R. R.; Moraes, S. R. A.; Silva Junior, V. A.; Neves, E. M. Evaluation of quantitative parameters of Leydig cell in diabetic adults rats. **Acta Sci Biol Sci**, v. 36, n. 4, p. 483-489, 2014.

Sharma, R.; Agarwal, A. Spermatogenesis: An Overview. In: Zini, A.; Agarwal, A. (Ed.). **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 2011.

Sharma, R., Dave, V., Sharma, S., Jain, P., Yadav, S. Experimental models on diabetes: a comprehensive review. **Int J Adv Pharm Sci**. v. 4, p. 1-8, 2013.

Sharpe, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Nelly, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2^a ed., 1994.

Spicer SS (1987) Histochemistry in pathologic diagnosis. New York: Dekker.

Stryer, L.; Tymoczko, J. L.; Berg, J. M. Bioquímica. 6^a ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2008.

Tenorio, B. M.; Jimenez, G. C.; Morais, R. N.; Torres, S. M.; Nogueira, R. A.; Silva Junior, V. A. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. **J Appl Toxicol**, v. 31, p. 223-230, 2011.

Tolosa, E. M. C.; Rodrigues, C. J.; Behmer, O. A.; Freitas-Neto, A. G. Manual de **Técnicas para Histologia Normal e Patológica** 2^a ed. Manole, São Paulo, 331. 2003.

Thompson, J. C., He, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**. v. 22, p. 261–5. 2006.

Viana, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, n. 12, 2008.

Wagner, H., Cheng, J. W., Ko, E.Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. **Arab Journal of Urology**. v. 16, p. 35–43, 2018.

Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H. G., Camejo, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Anal Biochem**. v. 208, p. 10–15. 1993.

Wiebe, J. P., Barr, K. J. The control of male fertility by 1,2,3-trihydroxypropane (THP;glycerol): rapid arrest of spermatogenesis without altering libido, accessory organs, gonadal steroidogenesis, and serum testosterone, LH and FSH. **Contraception**. v. 3, p. 291–302, 1984a.

Wiebe, J. P., Kowalik, A., Gallardi, R. L., Egeler, O., Clubb, B. H. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. **J Androl**. v. 5, p. 625–635, 2000.

Wrobel, K., Reichold, J., Schimmel, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Ann Anat**. v. 177, p. 19-32, 1995.

Yang, F., Hanna, M. A., Sun, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**. v. 5, p. 13, 2012.

Zimmermann, A. M., Kirsten, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disc Scientia**. v. 9, n. 1, p. 51-68. 2008.

Capítulo I

Efeito de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos sobre a função testicular: avaliação do histomorfométrica, níveis de testosterona e estresse oxidativo.

A.K.L.P. Venâncio¹, F.C. R. Dias², F. F. R. Carvalho³, S. M. Torres¹, V.A Silva Júnior^{*1}

¹*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife,* ²*Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Rua. Frei Paulino, 30 - Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, 38025-180* ³*Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Brazil*

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ingestão de diferentes níveis de glicerina bruta contendo 80,5% de glicerol sobre a histomorfometria, níveis de testosterona e estresse oxidativo no parênquima testicular de ovinos. Foram utilizados 40 cordeiros mestiços da raça Santa Inês, machos, não castrados com 21 kg $\pm$ 0,8 kg de peso corporal inicial. Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca. O peso, medidas biométricas do testículo, índice gonadossomático e peso líquido dos testículos foram maiores para os grupos tratados ($P < 0,05$). Dentre os parâmetros tubulares, o comprimento total dos túbulos seminíferos foi maior no G6 ($P < 0,05$). O volume tubular total e o volume do epitélio seminífero aumentaram para todos os grupos tratados ($P < 0,05$). O volume individual da célula de Leydig aumentou no G12 enquanto a população da mesma célula por grama de testículo diminuiu ($P < 0,05$), já no grupo G18 houve uma diminuição no diâmetro nuclear e volume individual da célula de Leydig, enquanto a população por grama de testículo aumentou ($P < 0,05$), porém os níveis plasmáticos de testosterona não foram afetados. Segundo a análise histopatológica do parênquima testicular, os grupos experimentais sofreram descamação de epitélio seminífero e vacuolização de célula de Sertoli. Foram observados espermátócitos em necrose e presença de células gigantes em todos os grupos porém com graus diferentes. Nos grupos G12 e G18 foi observada intensa vacuolização das células de Sertoli. O grupo G12 teve o maior número de espermátócitos em paquíteno sofrendo necrose ($P < 0,05$). A presença de células gigantes não diferiu entre os grupos experimentais. O consumo de glicerina influenciou os marcadores do estresse oxidativo nos grupos G12 e G18, sendo o último o mais prejudicado. A produção de SOD aumentou nos grupos G12 e G18 ($P < 0,05$). A produção de catalase aumentou nos grupos G12 e G18 ($P < 0,05$). A produção de GST foi maior no grupo G18 ($P < 0,05$). O nível de óxido nítrico diminuiu para todos os grupos tratados ($P < 0,05$). A produção de MDA aumentou no G18 comparado aos grupos controle e ao G6 ($P < 0,05$). Observou-se com os resultados expostos que o consumo de glicerina por ovinos no nível de 6% melhora diversos aspectos que são indicativos de um bom desempenho reprodutivo do animal sem provocar qualquer estímulo ao estresse oxidativo, podendo assim, ser incluso na dieta com o objetivo de reduzir gastos e melhorar a função reprodutiva dos animais.

Palavras-chave: Glicerina, reprodução, carneiro, estresse oxidativo.

Correspondência: Valdemiro Amaro da Silva Junior, Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of ingesting different levels of crude glycerin containing 80.5% glycerol on histomorphometry, testosterone levels and oxidative stress in sheep testicular parenchyma. We used 40 Santa Inês crossbred uncastrated male lambs, with $21 \text{ kg} \pm 0.8 \text{ kg}$ initial body weight. These were submitted of 0% (Control), 6% (G6), 12% (G12) and 18% (G18) of crude glycerin based on dry matter. Weight, biometric measurements, gonadosomatic index and net weight of the testicles were higher for the treated groups ($P < 0.05$). Among the tubular parameters, the total length of seminiferous tubules was greater in G6 ($P < 0.05$). The total tubular volume and the volume of the seminiferous epithelium increased for all treated groups ($P < 0.05$). The individual volume of the Leydig cell increased in G12 while the population of the same cell per gram of testis decreased ($P < 0.05$), in the G18 group there was a decrease in the nuclear diameter and individual volume of the Leydig cell, while the population per gram of testicle increased ($P < 0.05$), but, plasma testosterone levels were not affected. According to histopathological analysis of the testicular parenchyma, the experimental groups suffered desquamation of seminiferous epithelium and vacuolization of the Sertoli cell. Spermatocytes were observed in necrosis and presence of giant cells in all groups but with different degrees. In groups G12 and G18, intense vacuolization of Sertoli cells was observed. The G12 group had the highest number of spermatocytes in pachytene undergoing necrosis ($P < 0.05$). The presence of giant cells did not differ between the experimental groups. The consumption of glycerin influenced the markers of oxidative stress in groups G12 and G18, the latter being the most affected. SOD production increased in groups G12 and G18 ($P < 0.05$). Catalase production increased in groups G12 and G18 ($P < 0.05$). GST production was higher in the G18 group ($P < 0.05$). The level of nitric oxide decreased for all treated groups ($P < 0.05$). MDA production increased in G18 compared to control groups and G6 ($P < 0.05$). It was observed with the exposed results that the consumption of glycerin by sheep at the level of 6% improves several aspects that are indicative of a good reproductive performance of the animal without causing any stimulus to oxidative stress, thus being able to be included in the diet with the objective to reduce spending and improve the reproductive function of animals.

Keywords: Glycerin, reproduction, ram, oxidative stress.

1. Introdução

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações (Viana, 2008). A criação de ovinos nas últimas décadas, tem passado por transformações, visando a melhoria da eficiência produtiva dos animais suprimindo suas necessidades nutritivas básicas e sem comprometer sua saúde, pretendendo atender ao mercado que tem se tornado mais exigente (Barros *et al.*, 2015).

As dietas para ovinos são basicamente compostas de volumosos e concentrados, e, embora o fornecimento de dieta contendo altos teores de concentrado proporcione ao produtor a obtenção do peso adequado do animal em um período mais curto, as dietas para ovinos são balanceadas com maiores proporções de volumosos devido aos seus altos custos do concentrado (Pereira *et al.*, 2018) como o milho, que representa uma das principais fontes de energia na dieta (Alves *et al.*, 2003). Neste contexto, a busca por fontes alternativas de nutrientes para ruminantes tem ganhado espaço a fim de diminuir a despesas (Andrade *etal.*, 2018).

A glicerina bruta, principal coproduto gerado na produção de biodiesel, correspondendo a 10% da massa total resultante de seu processo de produção, (Chi *et al.*, 2007), tem alto valor energético preços atrativos e tem grande potencial para ser aplicada como ingrediente de reposição aos concentrados energéticos convencionais (Barros *et al.*, 2015). Além da comprovada função nutritiva, o reaproveitamento da glicerina bruta tem importância no sentido de responsabilidade ambiental, pois, diante da crescente produção de biodiesel, o mercado tem sido incapaz de absorver toda a glicerina gerada no processo (Silva, 2010).

A Lei 11.097/2005 introduziu biodiesel na matriz energética brasileira e estimou que entre os anos de 2008 e 2014, cerca de 464 milhões de litros-1 de glicerina bruta foram produzidos através do biodiesel. Desta forma, com a adição obrigatória atual de 7% de biodiesel em diesel comum (MP 647/14), a produção atingirá 857 milhões de litros ano⁻¹ da

indústria de biodiesel (ANP, 2014) enfatizando a necessidade da utilização da glicerina visando a preservação do meio ambiente. O uso de glicerina bruta como insumo para alimentação animal é permitido em todo o país, porém, para isso, a glicerina deve aderir a um padrão: no mínimo, 800 (g.kg⁻¹ de matéria seca (MS)) de glicerol, umidade máxima de 130 (g kg⁻¹ MS), no máximo 150 (mg kg⁻¹ de MS) de metanol (MAPA, 2012).

A maior parte da glicerina bruta provinda da fabricação de biodiesel é o glicerol (cerca de 70%) que pode ser usado para nutrição animal (Yang *et al.*, 2012; Parente, 2003). No rúmen este composto é convertido em propionato, que funciona como precursor de glicose no fígado (Parsons *et al.*, 2009) e justamente por esse motivo, o glicerol é conhecido por suas propriedades anticetogênicas (Khattab, 2015). Segundo Gunn *et al.*, (2010) a adição de até 15% glicerina bruta nas dietas de cordeiros em confinamento melhorou o desempenho sem qualquer efeito concomitante nas características da carcaça.

Por outro lado há relatos na literatura afirmando que o glicerol pode provocar prejuízos para a reprodução em machos. Segundo Crisóstomo *et al.*, (2017) o glicerol causa distúrbios metabólicos que interferem negativamente na reprodução masculina e que por isso possui atividade antiespermatogênica. De acordo com Mewes *et al.*, (2016) a inclusão de glicerina bruta em qualquer nível na dieta de peixes prejudica o processo de espermatogênese e causa danos às características espermáticas.

Após cuidadosa revisão de literatura, observou-se escassez de pesquisas que elucidem a relação da viabilidade reprodutiva de ovinos à alimentação através da adição de glicerol como concentrado. A nutrição é um dos fatores que mais influenciam no ciclo reprodutivo de ovinos (Maia *et al.*, 2011). Desta maneira, esclarecimentos sobre utilização de glicerina bruta na dieta de ovinos são fundamentais para determinar desempenho reprodutivo, diminuição de custos relacionados à alimentação e preservação ambiental. Objetivou-se avaliar os efeitos da ingestão de diferentes níveis de glicerina bruta contendo 80,5% de glicerol sobre a histomorfometria, níveis de testosterona e estresse oxidativo no parênquima testicular de ovinos.

2. Material e métodos

Local do Experimento

O experimento foi executado no setor de caprinovinocultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado no município de Recife (PE) e situado sob as coordenadas geográficas de 8°04'03''S e 34° 55' 00''W. No laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), no laboratório de Central Analítica do Cenapesq. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal em pesquisa (CEUA-UFRPE), sob o número de licença 059/16.

Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 40 cordeiros mestiços da raça Santa Inês, machos, não castrados, com seis meses de idade e peso médio inicial de aproximadamente $21,0 \pm 0,8$ Kg. Os animais foram mantidos em baias individuais com 1,0 x 1,8 m providos de bebedouros e comedouros, dispostas em aprisco coberto.

Antes do início do experimento todos os animais foram identificados e submetidos ao controle de ectoparasitos e endoparasitos com uso de piretróides e vacinados contra clostridioses. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com período experimental de 90 dias, sendo os 24 primeiros dias destinados à adaptação dos animais às instalações, às dietas e ao manejo, e os 66 dias restantes para avaliação e coleta de dados.

Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca que foi adicionada ao concentrado para homogeneizar os ingredientes e dietas. As dietas também foram formuladas para serem isonitrogenadas e atingirem os requisitos nutricionais de um cordeiro em crescimento até 250 g d⁻¹ de acordo com o NRC (2007) (Tabela 1). A glicerina bruta aplicada em nossa pesquisa foi obtida da produção de biodiesel através da semente óleo de algodão na indústria CETENE localizada em Caetés-PE.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes e composição química das dietas de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Ingredientes (%)	Níveis de glicerina bruta (%)			
	0	6	12	18

Feno de Tifton	40.00	40.00	40.00	40.00
Milho Grão	40.35	34.10	27.85	21.60
Farelo de soja	17.00	17.00	17.00	17.00
Glicerina Bruta	0.00	6.00	12.00	18.00
Ureia: SA	0.50	0.75	1.00	1.25
Suplemento Mineral ¹	1.50	1.50	1.50	1.50
Calcário Calcítico	0.30	0.30	0.30	0.30
Fosfato Bicálcico	0.35	0.35	0.35	0.35
Composição Química (g.Kg ⁻¹ MS)				
Matéria Seca (g.Kg ⁻¹ MN)	890.1	891.4	893.9	892.0
Matéria Orgânica	921.5	915.7	910.0	904.3
Cinzas	78.5	84.3	90.0	95.7
Proteína Bruta	161.6	163.3	164.9	166.6
Extrato Etéreo	33.3	32.0	30.4	29.2
Fibra Detergente Neutro ²	386.2	376.3	366.3	356.4
Carboidratos Não Fibrosos	348.5	356.2	364.5	372.2

¹ Níveis de garantia (nutrientes/kg): Cálcio-150g; Enxofre-12g; Fósforo-65g; Magnésio- 6.000mg; Sódio-107g; Cobre-100mg; Cobalto-175mg; Ferro-1000mg; Flúor máximo 650mg; Iodo-175mg; Manganês-1440mg; Selênio-27mg e Zinco-6000mg. ² Fibra em Detergente Neutro foi corrigida para cinzas e proteínas.

As dietas eram fornecidas como uma mistura completa duas vezes por dia às 08:00 da manhã (50%) e às 16:00 (50%). Para estimar a ingestão voluntária, as sobras foram recolhidas e pesadas antes de cada hora de alimentação, então a ingestão por o animal foi estimada pela diferença entre a oferta e a recusa até 15%. Amostras das dietas e sobras foram coletadas semanalmente por animal e tratamento, bem como ingredientes utilizados na ração que foram submetidos à secagem em estufa a 55 °C por 72 h, triturados em um moinho peneira (©Wiley) de 2 mm.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a uma dieta hídrica de 8 horas e jejum de sólidos por 16 horas a fim de realizar-se a eutanásia. O procedimento de eutanásia foi realizada de acordo com as normas do CFMV (2013). O complexo testículo-epidídimo (CTE) foi removido. O testículo e o epidídimo foram pesados individualmente em balança digital (modelo Kern 410) com precisão de quatro casas decimais e mensurados (comprimento e largura) com auxílio de paquímetro. Calculou-se o índice gonadosomático de acordo com (Barbosa *et al.*, 2012).

Análise histomorfométrica testicular

De cada animal, os testículos foram utilizados para as análises microscópicas. Após as mensurações, os testículos e epidídimos foram seccionados em fragmentos de até 2mm de

espessura os quais foram submetidos à fixação em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de sódio, 0,01 M e pH 7,2 . O testículo contralateral foi separado do respectivo epidídimo, pesado e identificado sendo acondicionado em papel alumínio e saco plástico a -20 °C.

Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos permaneceram imersos em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em série crescente de álcool (70 °, 2 vezes; 80 ° 2 vezes; 90° 2 vezes e 100 ° 2 vezes) com trocas a cada 15 minutos, após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (GMA, Leica). Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura, em micrótomo automático com navalhas de vidro para historresina (marca Reichert-Jung). Os cortes foram corados em Azul de toluidina, montados com Entelan (Merck) e analisados morfológicamente e morfometricamente em microscópio Leica modelo DM500E, na área de patologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulos seminíferos com perfil mais redondo possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas de captura de imagem no microscópio Leica modelo DM500E. O valor encontrado por túbulo foi o resultado da média de duas medidas diametralmente opostas. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até o lúmen tubular, ambas as medidas foram obtidas utilizando-se o programa Image J para Windows (Oliveira *et al.*, 2017). O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

A proporção volumétrica de cada componente do parênquima testicular foi estimada utilizando-se 15 fotos de campos escolhidos aleatoriamente, em aumento total de 400x, que foram obtidas utilizando-se o mesmo sistema de captura citado acima. Em cada foto, foram sobrepostos 441 pontos, utilizando o mesmo programa citado acima, perfazendo um total de a partir 6.615 pontos por animal (Tenorio *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015).

O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo 11% equivalente ao peso da túnica albugínea e do mediastino testicular (Wrobel *et*

al., 1995). Como a densidade do testículo é em torno de 1 (1,03 a 1,04; França & Russell, 1998), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) foi calculado de acordo com Silva *et al.* (2006). O volume nuclear das células de Leydig foi obtido de acordo com Oliveira *et al.*, (2017) e Silva *et al.* (2014). Os volumes citoplasmático e celular destas células, assim como seu número total por testículo e por grama de testículo foi calculada de acordo com Oliveira *et al.* (2017).

Análise histopatológica testicular

Para avaliar qualitativamente o epitélio germinativo foram escolhidos aleatoriamente 10 secções de túbulos seminíferos por animal e as seguintes lesões foram avaliadas: Descamação do epitélio seminífero, vacuolização da célula de Sertoli, espessamento da membrana basal, presença de células necróticas e células gigantes.

Para se determinar o grau de degeneração testicular apresentado pelos grupos experimentais as lesões de descamação do epitélio seminífero, vacuolização da célula de Sertoli e espessamento de membrana basal foram avaliadas quanto ao seu grau em: ausente, discreta, moderada e intensa. As células necróticas e gigantes foram contabilizadas em 10 secções de túbulo seminífero por animal, posteriormente considerou-se a média desses valores por grupo.

Análise da testosterona plasmática

Amostras de sangue foram colhidas no dia anterior a eutanásia por venopunção jugular. O plasma foi separado por centrifugação e acondicionados em duplicata em tubos cônicos plásticos (2ml) e armazenadas à temperatura de -20 °C. A dosagem hormonal foi realizada pelo método de eletroquimioluminescência (Access2 - Beckman Coulter (Edital Pró-Equipamento CAPES/UFRPE aparelho de análise) utilizando-se kit comercial de referência 33560.

Marcadores de estresse oxidativo

O parênquima testicular foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M combinado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1M e a suspensão centrifugada a 13,8 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (100 mg de tecido por mL) foi

utilizado para a análise de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GST), bem como da concentração de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malondialdeído (MDA). As análises foram realizadas em duplicata.

A atividade de SOD foi estimada de acordo com Dieterich *et al.* (2000), A atividade de CAT foi avaliada segundo Aebi (1984) e a atividade da enzima GST foi estimada de acordo com Habig *et al.* (1974) e calculado a partir da taxa de oxidação de NADPH. A peroxidação lipídica foi avaliada analisando os níveis de malondialdeído (MDA). Para isso alíquotas de parênquima testicular (100mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 0,2 M e encubados em ácido tiobarbitúrico para ver os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Wallin *et al.* (1993). A concentração de proteína total das amostras foi mensurada utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. Os marcadores de estresse foram normalizados pelos níveis de proteínas totais (Lowry *et al.*, 1951).

A produção de NO foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito/ nitrato pela reação de Griess padrão (Ricart-Jané *et al.*, 2002) A produção de H₂O₂ foi mensurada de acordo com Oliveira *et al.* (2018). A conversão da absorbância em concentração de H₂O₂, calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H₂O₂. Os resultados foram expressos em μM .

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3. Resultados

Segundo as análises morfométricas testiculares o consumo de glicerina pelos carneiros deste experimento influenciou os dados de peso e biometria testicular como: comprimento, largura e circunferência testicular, assim como índice gonadosomático, peso líquido do testículo e comprimento total dos túbulos seminíferos que foram maiores para os grupos

tratados ($P < 0,05$). O peso corporal, epididimário e comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) não foram diferentes entre grupos tratados e controle (Tab. 2).

Tabela 2. Peso corporal, biometria testicular e IGS de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	G6	G12	G18
Peso corporal (kg)	33,63 ± 4,25	36,30 ± 2,39	37,82 ± 2,57	36,92 ± 1,80
Peso testicular (g)	71,36 ± 8,91 ^a	120,46 ± 28,30 ^b	116,34 ± 14,37 ^b	114,46 ± 17,85 ^b
Comprimento testicular (cm)	5,95 ± 0,36 ^a	7,47 ± 0,76 ^b	7,42 ± 0,34 ^b	7,00 ± 0,45 ^b
Largura testicular (cm)	4,46 ± 0,19 ^a	5,48 ± 0,44 ^b	5,51 ± 0,37 ^b	5,52 ± 0,33 ^b
Circunferência testicular (cm)	13,51 ± 0,64 ^a	16,00 ± 1,27 ^b	15,58 ± 0,54 ^b	15,76 ± 0,87 ^b
Peso epididimário (g)	13,34 ± 1,31	17,06 ± 4,59	17,38 ± 1,56	17,24 ± 3,72
Índice gonadossomático (%)	4,27 ± 0,56 ^a	6,62 ± 1,41 ^b	6,18 ± 0,92 ^b	6,25 ± 1,26 ^b
Peso líquido do testículo	63,51 ± 7,93 ^a	107,21 ± 25,19 ^b	103,54 ± 12,79 ^b	99,54 ± 15,57 ^b
Comp. total túbulos seminíferos (m)	2.185 ± 652,48 ^a	3.172 ± 696,01 ^b	2.717 ± 323,95 ^a	2.680 ± 590,12 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

De acordo com a tabela 3, o volume tubular total e volume do epitélio seminífero foram maiores para os grupos tratados quando comparados ao controle ($P < 0,05$). O volume da túnica própria foi maior para os grupos G6 e G12 comparados ao controle ($P < 0,05$). O diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e volumes do lúmen tubular, espaço intersticial, total das células de Leydig e das células do tecido conjuntivo não tiveram diferença entre os grupos experimentais (Tab. 3).

Tabela 3. Parâmetros tubulares e volume (mL) dos componentes testiculares de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	G6	G12	G18
Diâmetro tubular (µm)	190,23 ± 55,99	195,5 ± 17,17	208,53 ± 19,98	207,21 ± 27,58
Altura do epitélio (µm)	51,01 ± 15,96	47,74 ± 3,42	52,83 ± 5,15	52,02 ± 8,06
Volume tubular total (mL)	55,67 ± 8,31 ^a	94,78 ± 20,86 ^b	92, 205 ± 11,97 ^b	87,69 ± 12,42 ^b
Volume túnica própria (mL)	3,32 ± 0,6 ^a	5,29 ± 1,66 ^b	5,15 ± 0,71 ^b	4,33 ± 0,98 ^a
Volume lúmen tubular (mL)	12,55 ± 2,71	21,66 ± 10,24	15,57 ± 4,20	16,76 ± 6,13
Volume do epitélio seminífero (mL)	39,78 ± 5,72 ^a	67,83 ± 13,75 ^b	71,46 ± 10,83 ^b	66,59 ± 12,98 ^b
Volume intersticial total (mL)	7,78 ± 1,42	12,88 ± 4,83	11,36 ± 3	11,99 ± 2,75
Volume total das células de Leydig (mL)	1,31 ± 0,27	2,01 ± 0,83	1,54 ± 0,58	1,64 ± 0,30
Volume das células do tecido Conjuntivo (mL)	1,17 ± 0,39	1,55 ± 0,59	1,1 ± 0,56	1,36 ± 0,63

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística (P<0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

De acordo com a tabela 4, a população de células de Leydig por grama de testículo aumentou no G18 em relação ao G12 (P<0,05). O volume individual da célula de Leydig no G18 foi menor em relação ao G12 (P<0,05). Já o diâmetro nuclear das células de Leydig foi menor no G18 comparado aos demais grupos (P<0,05). A população das células de Leydig por testículo e dosagem plasmática de testosterona não diferiram entre os grupos experimentais (Tab. 4).

Tabela 4. População, diâmetro e volume individual da célula de Leydig e níveis plasmáticos de testosterona de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C	G6	G12	G18
População de célula de Leydig /T (X10 ⁸)	45,62 ± 12,97	76,41 ± 36,75	43,72 ± 16,64	79,34 ± 30,52
População de célula de Leydig /g/t (x10 ⁶)	71,05 ± 14,43 ^a	68,93 ± 24,36 ^a	42,62 ± 15,64 ^{ab}	80,71 ± 31,81 ^{ac}
Volume individual da célula de Leydig (µm ³)	305,95 ± 102,58 ^a	274,28 ± 28,52 ^a	359,70 ± 59,50 ^{ab}	219,44 ± 37,27 ^{ac}
Diâmetro nuclear da célula de Leydig (µm)	5,54 ± 0,56 ^a	5,49 ± 0,1 ^a	5,73 ± 0,33 ^a	4,96 ± 0,28 ^b
Testosterona (ng/mL)	5,18 ± 2,14	2,53 ± 0,99	3,81 ± 2,37	3,73 ± 3,21

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística (P<0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Segundo a análise histopatológica do parênquima testicular, os grupos experimentais sofreram descamação de epitélio seminífero, vacuolização de célula de Sertoli, espessamento de membrana basal. Foram observadas presença de espermatócitos em paquíteno sofrendo necrose e células gigantes nos túbulos seminíferos de todos os grupos experimentais, variando a intensidade com que ocorreram (Tabela 5) (Figura 2).

Nos grupos G12 e G18 foi observada intensa vacuolização das células de Sertoli. O grupo G12 teve o maior número de espermatócitos em paquíteno sofrendo necrose (P<0,05). A presença de células gigantes não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 5) (Figura 2).

Tabela 5. Número de necrose e presença de células gigantes nos túbulos seminíferos de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C	G6	G12	G18
Necrose de paquíteno	30 ^a	43 ^a	59,7 ^b	47,2 ^a
Presença de células gigantes	0,8	1,3	1,5	1,3

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente

O consumo de glicerina influenciou os marcadores do estresse oxidativo nos grupos G12 e G18 sendo este o mais prejudicado. A produção de SOD aumentou no G12 e G18 comparado com o G6. A produção de catalase aumentou nos grupos G12 e G18, sendo este último em relação ao controle e ao G6, enquanto o G12 aumentou em relação ao G6. A produção de GST foi maior no G18 em relação aos demais grupos experimentais. O nível de óxido nítrico diminuiu para todos os grupos tratados. A produção de MDA aumentou no grupo G18 comparado aos grupos controle e ao G6 (Fig. 1).

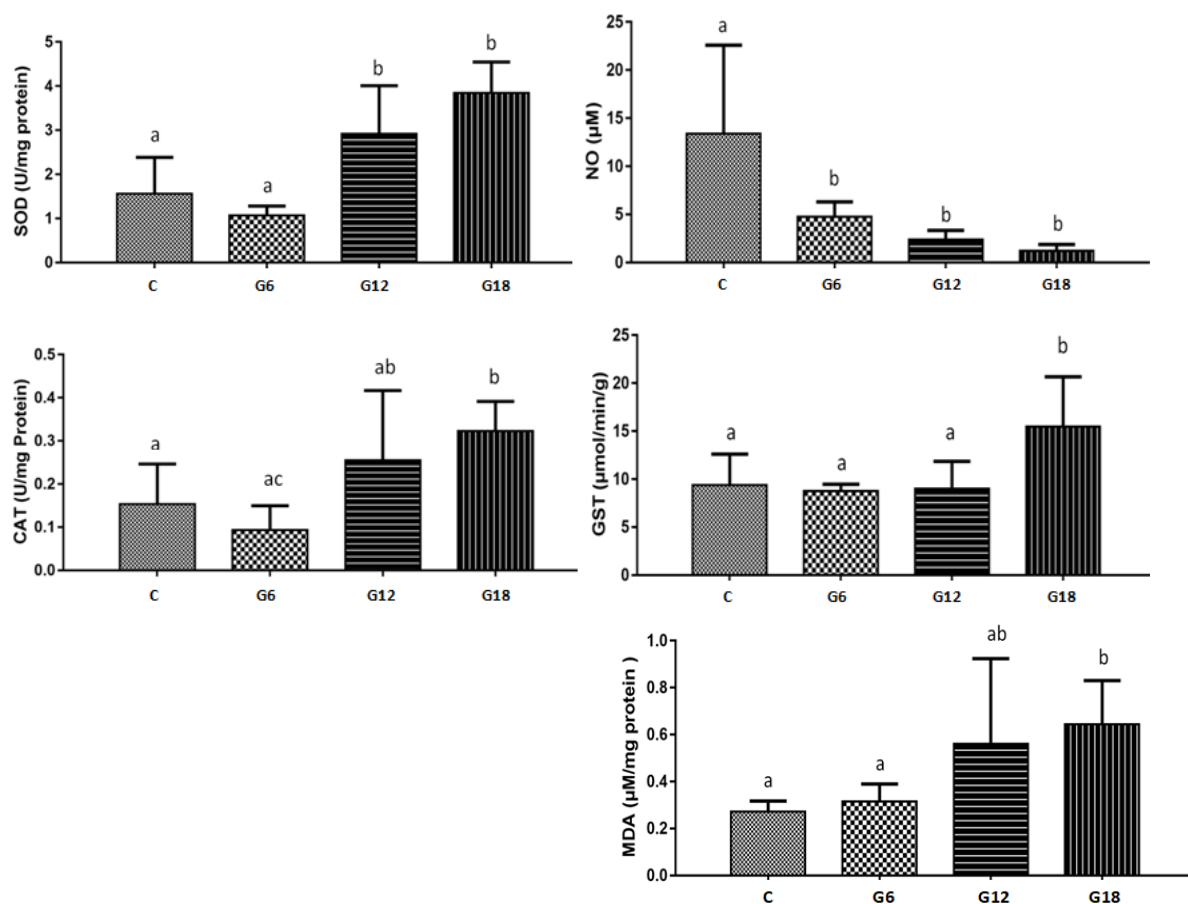


Figura 1. Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST), metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) e estresse nitroso (NO) em homogeneizado testicular de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.

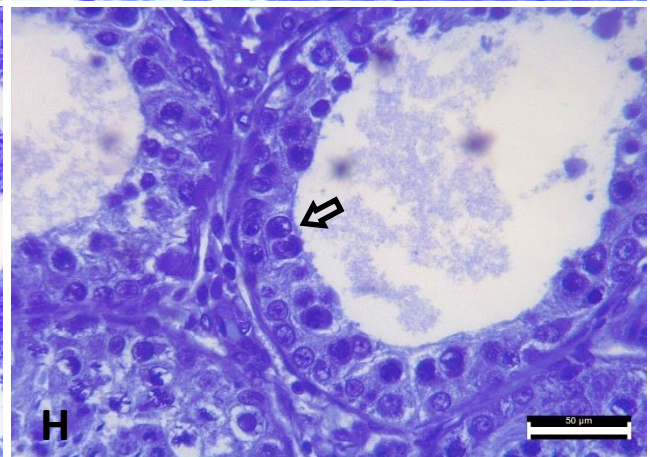
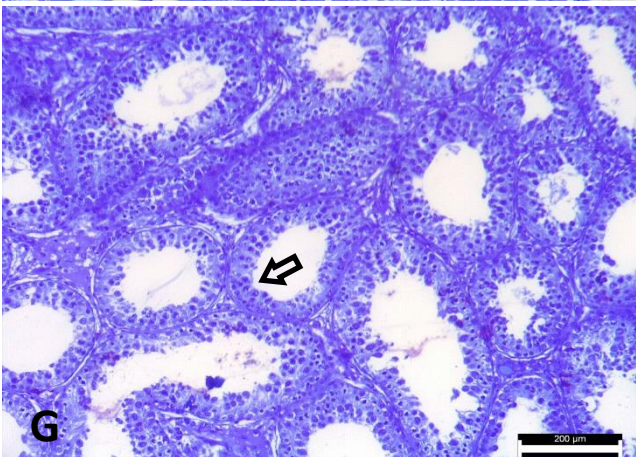
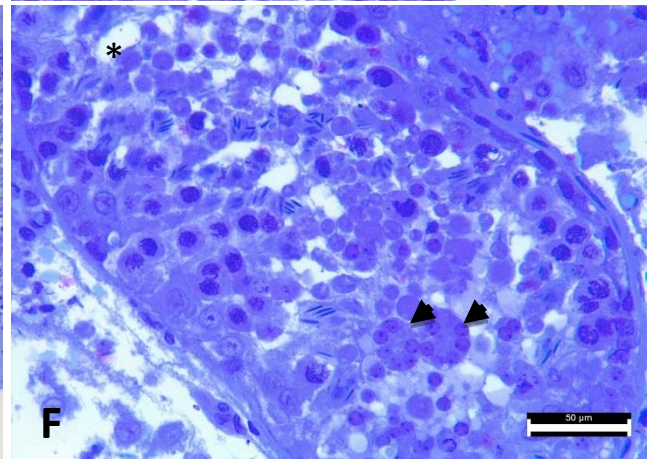
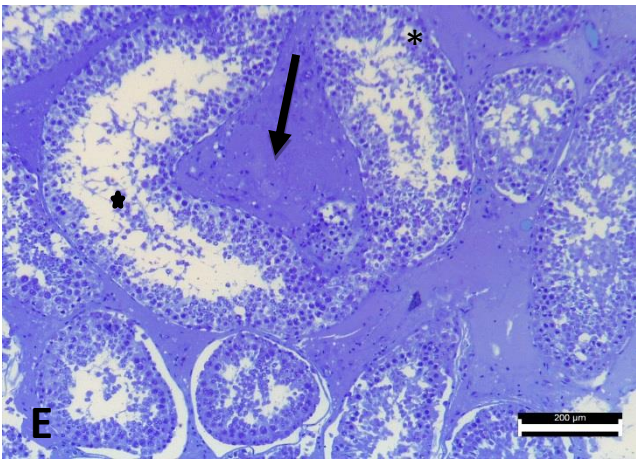
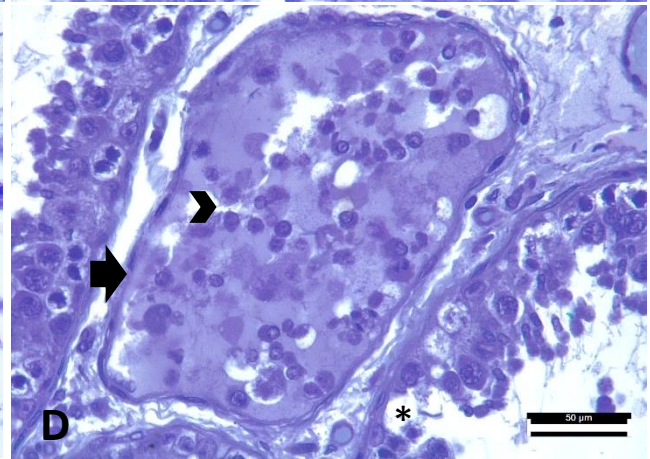
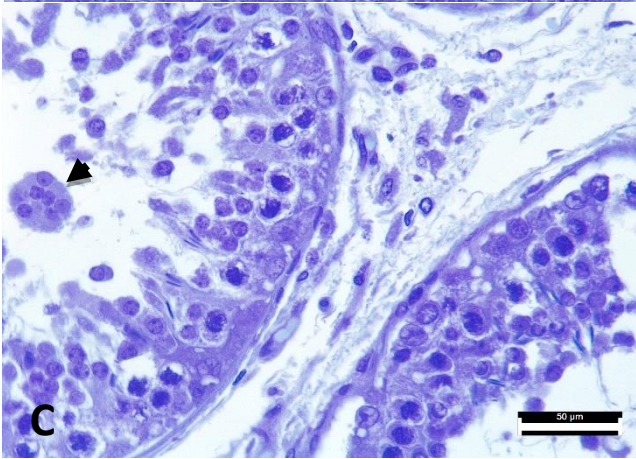
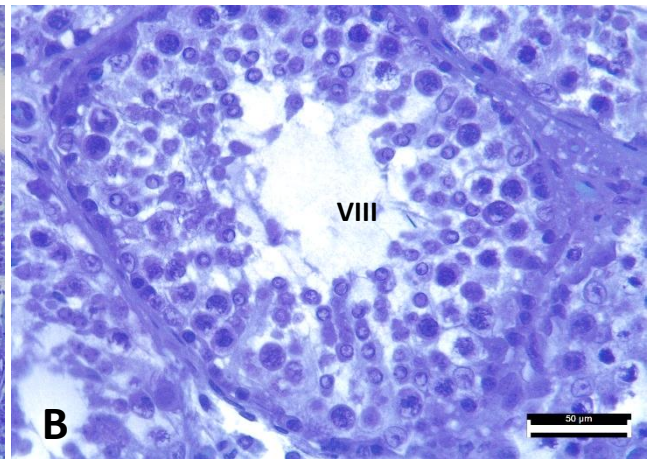
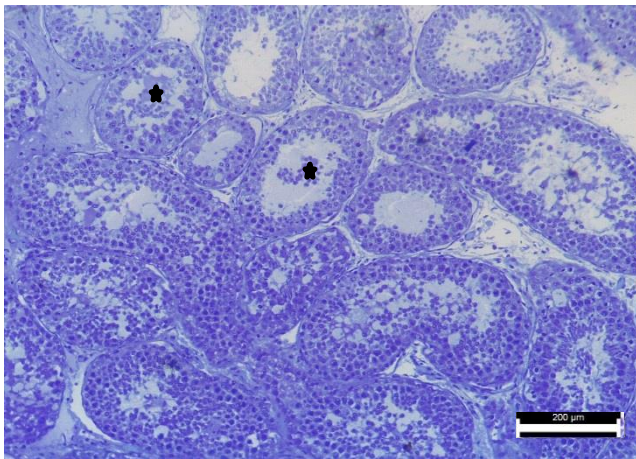


Figura 2. Fotomicrografia de parênquima testicular de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Figura A: Grupo controle com células descamadas no lúmen tubular (estrela). Figura B: Grupo controle, notar túbulo no processo de espermiogênese em estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero. Figura C: Grupo G6 com presença de células gigantes no lúmen tubular (seta fina curta) e células de sertoli vacuolizadas (asterisco). Figura D: grupo G12, notar túbulo degenerado (cabeça de seta) com espessamento de túnica própria (seta larga), vacuolização de células de Sertoli (asterisco) e perda da arquitetura do túbulo com descamação e necrose do epitélio seminífero. Figura E e F: grupo G12, notar aumento do espaço intertubular (seta fina longa), células descamadas no lúmen tubular (estrela), vacuolização de células de Sertoli (asterisco) e células gigantes no epitélio seminífero e lúmen tubular (seta fina curta). Figura G e H: grupo G18, visibilizar redução da altura de epitélio seminífero (seta vazada).

4. Discussão

A circunferência escrotal reflete o peso da gônada e é um ótimo indicador da produção de espermatozóides no carneiro (Allaoui *et al.*, 2014). Segundo Santos *et al.* (2016) o desenvolvimento testicular está intimamente relacionado ao nível nutricional que é fundamental na formação testicular de cordeiros jovens. Em nosso estudo o peso, comprimento, largura e circunferência testicular aumentaram nos grupos tratados em relação controle, como a glicerina desempenha papel energético na dieta (Zavarize *et al.*, 2014) é provável, que seu consumo tenha favorecido o aumento nestas medidas testiculares. Altos níveis de energia na dieta têm relação direta com o aumento do peso testicular e massa corporal (Ros-Santaella *et al.*, 2019). O peso testicular também está altamente relacionado com a produção de espermatozoides, pois uma maior ou menor produção espermática pode alterar o peso da gônada (França e Russell, 1998).

O índice gonadossomático representa o funcionamento específico da espermatogênese e tem relação direta com a massa corporal e porte do animal (Amann, 1970). Embora o peso corporal dos animais de nosso experimento não tenha diferido entre os grupos, o peso líquido dos testículos e índice gonadossomático aumentaram nos grupos de animais que consumiram glicerina.

O comprimento total dos túbulos seminíferos está relacionado com o tamanho dos testículos, diâmetro tubular e volume dos túbulos seminíferos, podendo assim, ser usado para definir a capacidade produtiva dos testículos (França & Russell, 1998). Em nosso estudo o grupo G12 teve maior comprimento total dos túbulos seminíferos em relação ao controle. Os volumes ocupados pelo epitélio seminífero e pelo túbulo seminífero em sua totalidade foram maiores para todos grupos que consumiram glicerina em comparação ao controle, neste sentido, a glicerina parece ter efeito positivo no desempenho da espermatogênese. De acordo com Courot *et al.*, (1970) a altura do epitélio revela o grau de funcionalidade do túbulo

seminífero, em nosso estudo não se constatou diferença estatística deste dado entre os grupos experimentais.

O grupo G18 teve diminuição do diâmetro nuclear da célula de Leydig, consequentemente o volume da célula como um todo diminuiu, entretanto, houve um aumento da população destas células por grama de testículo. No grupo G12 ocorreu justamente o inverso, enquanto o volume individual da célula de Leydig aumentou, a população destas células por grama de testículo diminuiu. Portanto pode-se concluir que esta mudança no volume e número das células de Leydig não repercutiu na produção da testosterona, pois os níveis hormonais foram preservados.

Segundo Costa *et al.* (2006) a produção hormonal não pode ser correlacionada com a população total das células de Leydig. O bom funcionamento destas células depende da presença de receptores de LH e uma complexa rede parácrina na qual as células de Sertoli, células germinativas, células peritubulares, macrófagos e células endoteliais vasculares estão envolvidas (De Miguel *et al.*, 2018).

Um dos fatores que mais determina a variação na produção de testosterona entre diferentes espécies é a quantidade de área ocupada pelo retículo endoplasmático liso no citoplasma das células de Leydig (Zirkin *et al.*, 1980). A produção de esteróides em cada espécie está mais relacionada à capacidade individual das células de Leydig em secretar hormônios específicos do que a critérios populacionais e volumétricos (Ewing *et al.* 1979), de forma semelhante, no presente estudo, não houve uma correlação entre a população, volume individual e diâmetro nuclear das células de Leydig com níveis plasmáticos de testosterona.

A descamação do epitélio seminífero foi observada em todos os grupos experimentais com variações de intensidade, portanto é provável que a glicerina não seja o elemento causador do processo degenerativo, deve-se levar em consideração a influência de possíveis fatores adversos ambientais. Contudo, é interessante observar os marcadores do estresse oxidativo nos grupos G12 e G18, este último inclusive com aumento nos níveis de MDA. Na figura 2 é possível observar a expressiva redução de altura do epitélio seminífero no grupo G18.

Foram observadas intensas vacuolizações nas células de Sertoli nos grupos G12 e G18. Nos ruminantes, o glicerol presente na glicerina bruta pode seguir duas rotas: ser rapidamente fermentado no rúmen e acarretar maior produção de propionato e butirato, ou, ser absorvido pela mucosa ruminal e convertido à glicose no fígado. Após chegar ao fígado, tanto

o glicerol como o propionato serão transformados em glicose por gliconeogênese (Costa *et al.*, 2019).

Com uma dieta de alto teor calórico, como a utilizada no presente estudo, o metabolismo do glicerol fica saturado, a molécula então é desviada da rota da gliconeogênese e acaba sofrendo alterações que o torna o livre com posterior liberação na corrente sanguínea. O aumento da concentração de glicerol juntamente com a liberação necessária da insulina, promove o aumento da expressão de AQPs no fígado, adipócitos e células de Sertoli, esta expressão é proporcional à quantidade de glicerol (Crisostomo *et al.*, 2017)

A grande disponibilidade dos ácidos graxos livres satura a fosforilação oxidativa e a via glicolítica devido ao alto ambiente energético. Favorecendo a lipogênese e gliceroneogênese, que por sua vez promovem a deposição de gordura levando a obesidade. Concomitantemente o excesso de glicerol se acumula aumentando a concentração nos tecidos inclusive o testicular causando prejuízo no citoesqueleto das células de Sertoli, que por sua vez são ineficientes em sua função de sustentação das células germinativas (Wiebe *et al.*, 2000) (Crisostomo *et al.*, 2017) ocasionando do destacamento das mesmas observadas no presente estudo.

Altos níveis de glicerol induzem a produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), altos níveis de EROs estão ligados a infertilidade masculina devido à peroxidação lipídica que pode causar disfunção erétil, prejuízos à espermatogênese e à função espermática (Shiraishi & Naito, 2008; Crisostomo *et al.*, 2017).

A glicerina bruta é usada como fonte alternativa de energia na dieta de animais e dependendo da pureza do produto, seu uso pode afetar o sistema antioxidante do organismo. A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios de oxi-radicais na célula pela catálise do radical $O^{\cdot -2}$ em H_2O_2 (Aitken & Roman, 2008). O aumento de SOD observado nos G12 e G18 sugerem que nessa dosagem a glicerina cause aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, que levaram a ativação das enzimas antioxidantes.

O óxido nítrico é um radical livre de curta duração e é bem conhecido por estar envolvido no estresse oxidativo. No presente estudo, os níveis de óxido nítrico dos grupos que consumiram glicerina em todos os níveis tiveram uma diminuição progressiva, estando portanto o G18 com o menor nível. Já os níveis da enzima SOD foram maiores no G12, e G18 ficou com o maior valor. De acordo com Katusic, (1996) os íons de superóxido esgotam

rapidamente o óxido nítrico porque a reação cinética da formação do peroxinitrito é mais favorável do que a degradação de superóxido pela enzima superóxido dismutase. Neste sentido, os resultados do presente estudo reforçam a presença de estresse oxidativo nos grupos G12 e G18 e a tentativa do tecido de neutralizar as espécies reativas de oxigênio.

A CAT e GST representam a segunda linha de defesa do organismo, sendo a CAT responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Barreiros *et al.*, 2006) e a GST responsável pela desintoxicação celular através de conjugados de glutathione com xenobióticos e de produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica, tornando-os mais solúveis em água (Habig *et al.*, 1974). Assim, a indução de GST é uma resposta das células ao estresse oxidativo (Dias, 2018). O aumento de CAT e GST no grupo G18 mostra que nessa dosagem a produção de ERO foi maior a ponto de ativar as duas vias de defesa. Araújo *et al.* (2018) incluíram 12% de glicerina bruta na dieta de frangos de corte e observaram um aumento na expressão do gene da glutathione peroxidase no tecido hepático, apontando um aumento de EROs.

Deste modo, o aumento de MDA no grupo G18 mostra que embora as enzimas antioxidantes estejam significativamente aumentadas, não foram suficientes para conter o dano causado pelas EROs, levando a peroxidação lipídica neste grupo. Diferente do que aconteceu no grupo G12, visto que, o aumento de SOD já foi suficiente em conter os danos causados, provavelmente, pela ingestão de glicerina.

Conclusão

A inclusão de glicerina na dieta de ovinos no nível de 6% melhora diversos aspectos indicativos de um bom desempenho reprodutivo do animal sem provocar qualquer estímulo ao estresse oxidativo, podendo assim, ser incluso na dieta com o objetivo de reduzir gastos e melhorar a função reprodutiva dos animais.

Referências

- Aebi H (1984) Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol*, **105**, 121– 26.
- Aitken RJ, Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*, **1**, 15–24.
- Allaoui A, Safsa BF, Laghrou RW, Tlidjan M (2014) Factors Affecting Scrotal Measurements and Weight of OuledDjellal Rams in Eastern and South-Eastern Algeria. *PCBEE Procedia*, **8**, 260 – 265.
- Alves K, Carvalho FR Ferreira, MA, Chaves Veras AS, Medeiros AN, Nascimento JF, Nascimento LRS, Anjos AVA (2003) Níveis de Energia em Dietas para Ovinos Santa Ines: Características de Carcaca e Constituintes Corporais. *R. Bras. Zootec*, **32**, 1927-1936.
- Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson, A.D.; Gomes W.R.; Vandemark, N.L. (Eds.) *The testis*. New York and London: Academic Press, **1**, 433-482.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo (2014) Gás Natural e Biocombustíveis. *Produção de Biodiesel 2013/2014*. Publicação Anual, Dezembro.
- Andrade GP, Carvalho FFR, Batista AMV, Pessoa RAS, Costa CA, Cardoso, DB, Maciel MV (2018) Evaluation of crude glycerin as a partial substitute of corn grain in growing diets for lambs. *Small Ruminant Research*, **165**, 41–47.
- Araujo R, Sousa KRS, Sousa FCB, Oliveira AC, Dourado LRB, Guimaraes SEF, Silva W, Biagiotit D, Bayao GFV, Araujo AC (2018) Effect of glycerin supplementation on the expression of antioxidant and mitochondrial genes in broilers. *Animal Production Science*, **59**, 408-415.
- Barbosa LP, Oliveira RL, Silva TM, Jesusi B, Garcez Neto AF, Bagaldo, AR (2012) Morfometria testicular de cabritos alimentados com óleo de licuri (*Syagrus coronata*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, **64**.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, **29**, 113–123.
- Barros MCC, Silva FF, Silva RR, Simmionato JI, Guimaraes GS, Silva LL, Facuri LMAM (2015) Glicerina bruta na dieta de ovinos confinados: composição centesimal e perfil de ácidos graxos do *longissimusdorsi*. *Seminário: Ciências Agrárias*, **36**, 431- 442.
- Courot M, Hochereau-deRiviers MT, Ortavan TR (1970) *Spermatogenesis*. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark N.L. (Eds.) *The testis*. **1**, 339-432.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (2013) Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais, Brasília - DF.

Costa DS, Paula TAR (2006) Níveis de testosterona, volume da glândula nasal e morfometria das células de Leydig em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online], **58**, 1086-1091.

Costa SF, Melo LQ, Resende Neto M, Carvalho JRR, Ladeira MM et al (2019) Aspectos morfológicos do rúmen, omaso e fígado de tourinhos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **71**, 340-344.

Chi Z, Pyle D, Wen Z, Frear C, Chen S (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 1537-1545.

Crisostomo L, Alves MG, Calamita G, Sousa M, Oliveira PF (2017) Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. *Molecular Human Reproduction*, **23**, 725–737.

De Miguel MP, Gonzalez-Peramato P, Nistal M (2018) Morphological Bases of Human Leydig Cell Dysfunction. *IntechOpen*.

Dieterich S, Bielgk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2002) Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, **101**, 33–39.

Dias FCR (2018) Extrato Hidroalcoólico da Raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen Interfere em Parâmetros Reprodutivos e Fertilidade de Camundongos Machos Adultos. *Tese de doutorado*.

Ewing LL, Zirkin BR, Cohran RC, Kromann N, Peters C et al. (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*. **105**, 1135-1142.

Franca LR e Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia, F. (Ed.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. *Madrid: Churchill Livingstone*, 197-219.

Gunn PJ, Near, MK, Lemenager RP, Lake SL (2010) Effects of crude glycerol on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. *J. Anim. Sci.*, **88**, 1771-1776.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**, 7130–7140.

Katusic ZS (1996) Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radical Biol Med*, **3**:443–448.

Khatab MSA (2015) Glycerol as Feedstuff for Ruminant. *Science International*, **3**, 90-94.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Rabdall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Anal Biochem* **193**, 265–275.

Maia MS, Medeiros IM, Lima CAC (2011) Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, **35**, 175-179.

Mewes JK, Meurer F, Tessaro L, Buzzi AH, Syperreck MA, Bombardelli RA(2016) Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. *Aquaculture*, **465** 164–17.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 2012. *Instrução normativa nº 42, de 16 de dezembro*. MAPA, Brasília.

National Research Council – NRC (2007) Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D.C. *National Academy Press*, 362.

Oliveira JS, Silva AAN, Magalhães CP, Souza SL, Silva Junior, VA, Neves EM (2015) Protein restriction during intrauterine and lactation periods: effects on testicular development in pre-puberty rats. *ActaSciBiolSci*, **37**, 107-112.

Oliveira JS, Silva AAN, Souza SL, Morais RN, Neves EM, Maia FCL, Silva Junior VA (2017) Histomorphometric evaluation of the testicular parenchyma of rats submitted to protein restriction during intrauterine and postnatal life. *Turk J Biol* 41, 428-438.

Oliveira JM, Losano NF, Condessa SF, Freitas RMP, Cardoso AS, Freitas MB, Oliveira LL (2018) Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safet*, **148**, 684–692.

Parente EJS (2003) Biodiesel: uma aventura tecnologica num pais engracado. *Tecbio*, 68.

Parsons GL, Shelor MK, Drouillard JS (2009) Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. *Journal of Animal Science*, **87**, 653-657.

Pereira LC, Itavo LCV, Mateus RG, Rosa MO, Macena I, Reis Neto JF, Barbosa- Ferreira M, Carvalho, CME (2018) Aspectos economicos do uso da parte aerea in natura de mandioca (*Manihotesculenta*Crantz) para nutricao de cordeiros confinados e semiconfinados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, **70**, 279-286.

Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero D(2002) Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **6**, 178-185.

Ros-Santaella JL, Kotrba R, Pintus E (2019) High-energy diet enhances spermatogenic function and increases sperm midpiece length in fallow deer (Damadama) yearlings. *R. Soc. open sci.* **6**, 181972.

Santos RA, Vargas Junior FM, Seno LO, Orrico ACA, Botiini Filho FDE et al. (2016) Biometria testicular de ovinos Pantaneiros alimentados com niveis crescentes de glicerina bruta na dieta. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, **17**, 311-321.

Silva CLS (2010) Glicerina proveniente da producao de biodiesel como ingrediente de ração para frangos de corte. Dissertação de Mestrado.

Silva Jr VA, Vieira ACS, Pinto CF, De Paula TAR, Palma MB et al. (2006) Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**, 157–166.

Silva AAN, Oliveira JS, Oliveira RR, Moraes SRA, Silva Junior VA et al. (2014) Evaluation of quantitative parameters of Leydig cell in diabetic adults rats. *ActaSciBiolSci*, **36**, 483-489.

Shiraishi K & Naito K (2007) Nitric oxide produced in the testis is involved in dilatation of the internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele. *BJU International*, **99**, 1086–1090.

Tenorio BM, Jimenez GC, Morais RN, Torres SM, Nogueira RA et al. (2011) Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. *J Appl Toxicol*, **31**, 223-230.

Viana JGA (2008) Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, **12**.

Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G (1993) Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*, **208**, 10–15.

Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH (2000) Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl*, **5**, 625–635.

Wrobel K, Reichold J, Schimmel M (1995) Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. *Ann Anat.*, **177**, 19-32.

Yang F, Hanna MA, Sun R (2012) Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, **5**, 13.

Zavarize KC, Menten JFM, Pereira R, Freitas LW, Romano GG et al. (2014) Metabolizable energy of different glycerine sources derived from national biodiesel production for broilers. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* **16**.

Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, **107**, 1867-1874.

Capítulo II

Adição de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos: avaliação morfofuncional renal e hepática

A.K.L.P. Venâncio¹, F. F. R. Carvalho², F.C. R. Dias³, S. M. Torres¹, V.A Silva Júnior^{*1}

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, ²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, ³Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Rua. Frei Paulino, 30 - Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, 38025-180

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ingestão de diferentes níveis de glicerina bruta contendo 80,5% de glicerol sobre a histomorfometria e histopatologia renal e hepática e níveis de malondialdeído no plasma sanguíneo de ovinos. Foram utilizados 40 cordeiros mestiços da raça Santa Inês, machos, não castrados com 21 kg $\pm$ 0,8 kg de peso corporal inicial. Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca. A histomorfometria do fígado revelou que os grupos G12 e G18 tiveram redução de núcleo e aumento de citoplasma de hepatócitos. Qualitativamente a esteatose foi a lesão predominante, os animais do grupo G18 foram os mais prejudicados. Os grupos G12 e G18 tiveram os maiores números de hepatócitos anucleados. Segundo a análise histomorfométrica renal o grupo G12 teve a maior dimensão de glomérulo e cápsula de Bowman, enquanto os grupos G6 e G12 tiveram os maiores valores de espaço capsular. Qualitativamente os grupos G12 e G18 tiveram maior grau de lesões, a glomerulonefrite proliferativa e membranosa foi predominante, porém a presença de glomérulos atrofiados também foi considerável. A análise de metabólitos de peroxidação lipídica no plasma sanguíneo revelou que os animais do G18 tiveram maiores níveis de MDA. Desta forma, a inclusão de até 6% de glicerina bruta na dieta de ovinos é segura, pois não altera a histomorfometria e histopatologia dos rins e fígado além de não provocar estímulo ao estresse oxidativo podendo, portanto, ser utilizada para reduzir custos na alimentação sem qualquer prejuízo à saúde dos animais.

Palavras-chave: Ovinos, fígado, rim, histomorfometria, MDA.

Correspondência: Valdemiro Amaro da Silva Junior, Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, Brazil CEP 52171-900. Tel: +55(81)3320.6430; E-mail: vajunior@dmv.ufpe.br

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of ingesting different levels of crude glycerin containing 80.5% glycerol on renal and hepatic histomorphometry and histopathology and levels of malondialdehyde in sheep blood plasma. Forty male Santa Inês crossbred lambs with $21 \text{ kg} \pm 0.8 \text{ kg}$ of initial body weight were used. The animals were randomly subjected to levels of 0% (Control), 6% (G6), 12% (G12) and 18% (G18) of crude glycerin based on dry matter. Liver histomorphometry revealed that groups G12 and G18 had a nucleus reduction and an increase in hepatocyte cytoplasm. Qualitatively steatosis was the predominant lesion, the animals in the G18 group were the most affected. Groups G12 and G18 had the highest numbers of anucleated hepatocytes. According to renal histomorphometric analysis, the G12 group had the largest dimension of the glomerulus and Bowman's capsule, while the groups G6 and G12 had the highest values of capsular space. Qualitatively, groups G12 and G18 had a higher degree of lesions, proliferative and membranous glomerulonephritis was predominant, but the presence of atrophied glomeruli was also considerable. The analysis of lipid peroxidation metabolites in blood plasma revealed that the animals in G18 had higher levels of MDA. Thus, the inclusion of up to 6% of crude glycerin in the sheep diet is safe, as it does not alter the histomorphometry and histopathology of the kidneys and liver, in addition to not provoking oxidative stress and can therefore be used to reduce feeding costs without any damage to the health of the animals.

Keywords: Sheep, liver, kidney, histomorphometry, MDA.

1. Introdução

A criação de ovinos nas últimas décadas, tem passado por transformações, visando a melhoria da eficiência produtiva dos animais suprimindo suas necessidades nutritivas básicas e sem comprometer sua saúde, pretendendo atender ao mercado que tem se tornado mais exigente (Barros *et al.*, 2015). A busca por fontes alternativas de nutrientes para ruminantes tem aumentado em muitas regiões do Brasil, visando a diminuição de gastos a fim de diminuir a despesas (Oliveira *et al.*, 2014).

A glicerina bruta representa o principal subproduto da produção de biodiesel, cerca de 10% do volume total de biodiesel corresponde à glicerina. Além da comprovada função nutritiva, o reaproveitamento da glicerina bruta tem importância no sentido de responsabilidade ambiental, pois, diante da crescente produção de biodiesel, o mercado tem sido incapaz de absorver toda a glicerina gerada no processo (Silva, 2010).

A inclusão de glicerol na nutrição animal tem sido estudada em várias espécies e relatos indicam que inclusões moderadas não comprometem o desempenho dos animais (Mach *et al.*, 2009; Lammers *et al.*, 2008). Segundo Gunn *et al.*, (2010) a adição de até 15% glicerina bruta na dieta de cordeiros em confinamento melhorou o desempenho sem qualquer efeito concomitante nas características da carcaça. Ladeira e colaboradores (2016) recomendam a inclusão de glicerina bruta na alimentação de touros jovens em um nível de até 180 g/kg, uma vez que os animais tiveram uma melhora na eficiência alimentar e marmoreio da carne além de não alterar o desempenho e maioria das características da carcaça.

Por outro lado, segundo Cryer & Hartley (1973), o excesso de glicerol na dieta pode induzir alterações anatômicas, adaptação fisiológica e bioquímica, no fígado e rins. Se o consumo de glicerol supera a capacidade de transformação do corpo, os níveis sanguíneos são aumentados (Robinson e Newsholme, 1969). A presença de lesões renais agudas ou crônicas e diversos distúrbios hepáticos podem ser explicados pelo estresse oxidativo (Ratliff *et al.*, 2016; Cichoż-Lach & Michalak, 2014; Al Asmari *et al.*, 2017).

Em vista do potencial uso da glicerina, foram realizados estudos anteriores sobre a utilização da glicerina bruta como fonte energética na dieta em variadas espécies de animais (Costa *et al.*, 2019; Parsons *et al.*, 2009; Lammers *et al.*, 2008). Porém são escassos os que avaliem os efeitos da administração de glicerina bruta via oral na histopatologia hepática e / ou renal e estresse oxidativo no plasma sanguíneo. Desta forma, o estudo em tela, pode ser fundamental para determinar melhor aproveitamento dos nutrientes inclusos na dieta, reduzir

custos e melhorar a saúde dos animais. Desta maneira, revestiu-se de importância avaliar os efeitos de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de ovinos sobre os aspectos qualitativos e quantitativos do parênquima renal e hepático assim como, os níveis de malondialdeído (MDA) no plasma sanguíneo.

2. Material e métodos

Local do Experimento

O experimento foi executado no setor de caprinovinocultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado no município de Recife (PE) e situado sob as coordenadas geográficas de 8°04'03''S e 34° 55' 00''W. No laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), no laboratório de Central Analítica do Cenapesq. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal em pesquisa (CEUA-UFRPE), sob o número de licença 059/16.

Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 40 cordeiros mestiços da raça Santa Inês, machos, não castrados, com seis meses de idade e peso médio inicial de aproximadamente $21,0 \pm 0,8$ Kg. Os animais foram mantidos em baias individuais com 1,0 x 1,8 m providos de bebedouros e comedouros, dispostas em aprisco coberto.

Antes do início do experimento todos os animais foram identificados e submetidos ao controle de ectoparasitos e endoparasitos com uso de piretróides e vacinados contra clostridioses. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com período experimental de 90 dias, sendo os 24 primeiros dias destinados à adaptação dos animais às instalações, às dietas e ao manejo, e os 66 dias restantes para avaliação e coleta de dados.

Os animais foram submetidos casualmente aos níveis de 0% (Controle), 6% (G6), 12% (G12) e 18% (G18) de glicerina bruta com base na matéria seca que foi adicionada ao concentrado para homogeneizar os ingredientes e dietas. As dietas também foram formuladas para serem isonitrogenadas e atingirem os requisitos nutricionais de um cordeiro em

crescimento até 250 g d⁻¹ de acordo com o NRC (2007) (Tabela 1). A glicerina bruta aplicada em nossa pesquisa foi obtida da produção de biodiesel através da semente óleo de algodão na indústria CETENE localizada em Caetés-PE.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes e composição química das dietas de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Ingredientes (%)	Níveis de glicerina bruta (%)			
	0	6	12	18
Feno de Tifton	40.00	40.00	40.00	40.00
Milho Grão	40.35	34.10	27.85	21.60
Farelo de soja	17.00	17.00	17.00	17.00
Glicerina Bruta	0.00	6.00	12.00	18.00
Ureia: SA	0.50	0.75	1.00	1.25
Suplemento Mineral ¹	1.50	1.50	1.50	1.50
Calcário Calcítico	0.30	0.30	0.30	0.30
Fosfato Bicálcico	0.35	0.35	0.35	0.35
Composição Química (g.Kg ⁻¹ MS)				
Matéria Seca (g.Kg ⁻¹ MN)	890.1	891.4	893.9	892.0
Matéria Orgânica	921.5	915.7	910.0	904.3
Cinzas	78.5	84.3	90.0	95.7
Proteína Bruta	161.6	163.3	164.9	166.6
Extrato Etéreo	33.3	32.0	30.4	29.2
Fibra Detergente Neutro ²	386.2	376.3	366.3	356.4
Carboidratos Não Fibrosos	348.5	356.2	364.5	372.2

¹ Níveis de garantia (nutrientes/kg): Cálcio-150g; Enxofre-12g; Fósforo-65g; Magnésio- 6.000mg; Sódio-107g; Cobre-100mg; Cobalto-175mg; Ferro-1000mg; Flúor máximo 650mg; Iodo-175mg; Manganês-1440mg; Selênio-27mg e Zinco-6000mg. ² Fibra em Detergente Neutro foi corrigida para cinzas e proteínas.

As dietas eram fornecidas como uma mistura completa duas vezes por dia às 08:00 da manhã (50%) e às 16:00 (50%). Para estimar a ingestão voluntária, as sobras foram recolhidas e pesadas antes de cada hora de alimentação, então a ingestão por o animal foi estimada pela diferença entre a oferta e a recusa até 15%. Amostras das dietas e sobras foram coletadas semanalmente por animal e tratamento, bem como ingredientes utilizados na ração que foram submetidos à secagem em estufa a 55 °C por 72 h, triturados em um moinho peneira (©Wiley) de 2 mm.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a uma dieta hídrica de 8 horas e jejum de sólidos por 16 horas a fim de realizar-se a eutanásia. O procedimento de eutanásia foi realizada de acordo com as normas do CFMV (2013). Foram removidos fragmentos da

porção cortical e medular do rim, assim como fragmento hepático, e, em seguida imersos em frascos contendo solução de formalina tamponada a 10% para posterior análise.

Processamento Histológico dos Parênquimas Hepático e Renal

Fragmentos de tecido renal e hepático dos animais foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M e pH 7,3. Estes fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina, cortados na espessura de 4 µm e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (Tolosa *et al.*, 2003). Os cortes histológicos foram corados pelas técnicas do Ácido Periódico de Schiff (PAS) para detecção de glicogênio hepático e marcação de membrana basal em tecido renal e Tricrômico de Masson (TM) para detectar a deposição de colágeno (Spicer, 1987).

Os fragmentos foram analisados e fotomicrografados em microscópio óptico LEICA DM500E nos aumentos de 100X e 400X utilizando programa LAS EZ versão 4.11, na Área de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Histomorfometria do Parênquima Hepático

A avaliação morfométrica do parênquima hepático foi realizada em um sistema digital de captura de imagem acoplado ao microscópio de marca Leica modelo DM500E. Por fragmento de tecido hepático, 10 campos aleatórios foram escolhidos aleatoriamente e analisados no programa Image J. Para estimar a proporção ocupada por cada componente do tecido hepático foi sobreposta uma grátula de 100 pontos nas fotos obtidas e considerados os pontos sobre as seguintes estruturas: núcleo, citoplasma, veia centrolobular, células de Kupffer, espaço porta e capilar sinusóide. Posteriormente considerou-se as médias por grupo de cada valor encontrado, conforme a metodologia adaptada de Monteriro *et al.* (2009). Os hepatócitos foram avaliados quanto à presença / ausência e ao número de núcleos, em seguida se determinou a porcentagem desse parâmetro por grupo experimental.

Histomorfometria do Parênquima Renal

No córtex renal, os corpúsculos renais por grupo (n=240), foram escolhidos aleatoriamente em aumento de 400X. As imagens destinadas a morfometria foram capturadas

em microscópio digital de marca Leica DM500E. Utilizando o software Image J, foram calculadas as áreas da cápsula de Bowman e do glomérulo, posteriormente a área do espaço capsular foi determinada pela diferença entre os dois parâmetros anteriores. Os corpúsculos renais utilizados para análise quantitativa foram avaliados quanto a normalidade estrutural, atrofia, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite membranosa, presença de albumina nos túbulos renais e nefrite (Danilewicz & Wagrowska-Danilewicz, 1998).

Considerou-se sendo 100% a soma dos glomérulos normais, atrofiados e com glomerulonefrite proliferativa por grupo. Para os parâmetros glomerulonefrite membranosa, depósito de albumina e nefrite considerou-se 100% dos túbulos analisados para cada grupo.

Análise da peroxidação lipídica em plasma sanguíneo

A peroxidação lipídica foi avaliada analisando os níveis de malondialdeído (MDA). Para isso alíquotas de plasma sanguíneo foram encubadas em ácido tiobarbitúrico para ver os níveis de substâncias reativas ao mesmo. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Wallin *et al* (1993). As análises foram realizadas em duplicata.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3. Resultados

A histomorfometria dos componentes do parênquima hepático revelou que os grupos que receberam maior proporção de glicerina tiveram redução na densidade volumétrica nuclear e aumento deste parâmetro em relação ao citoplasma dos hepatócitos. A proporção de capilares sinusoides foi maior no grupo controle. As proporções de células de Kupffer, veia centrolobular e espaço porta não foram diferentes entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Morfometria dos componentes hepáticos (%) de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C	G6	G12	G18
Núcleo de hepatócito	12,4 ± 1,6	10,6 ± 2,5	9,9 ± 1,2	7,8 ± 1,8
Citoplasma de hepatócito	74,8 ± 4	84,7 ± 2,6	84,9 ± 2,9	85,4 ± 2,5
Veia Centrolobular	0,6 ± 1,9	0,6 ± 1,3	0,2 ± 0,6	0,2 ± 0,6
Células de Kupffer	2,0 ± 1,1	1,4 ± 1	1,5 ± 0,8	1,6 ± 0,7

De acordo com a análise qualitativa do parênquima hepático dos grupos experimentais foi constatada esteatose como lesão predominante. Contudo, esta lesão foi mais evidente nos grupos que consumiram maior teor de glicerina bruta. Portanto, os animais do G18 tiveram intensa macroesteatose e comprometimento quase absoluto dos hepatócitos (Figuras 1 e 2). No grupo controle não houve alteração arquitetura do parênquima hepático, notando-se apenas discretas alterações em hepatócitos localizados na zona 3 do lóbulo hepático.

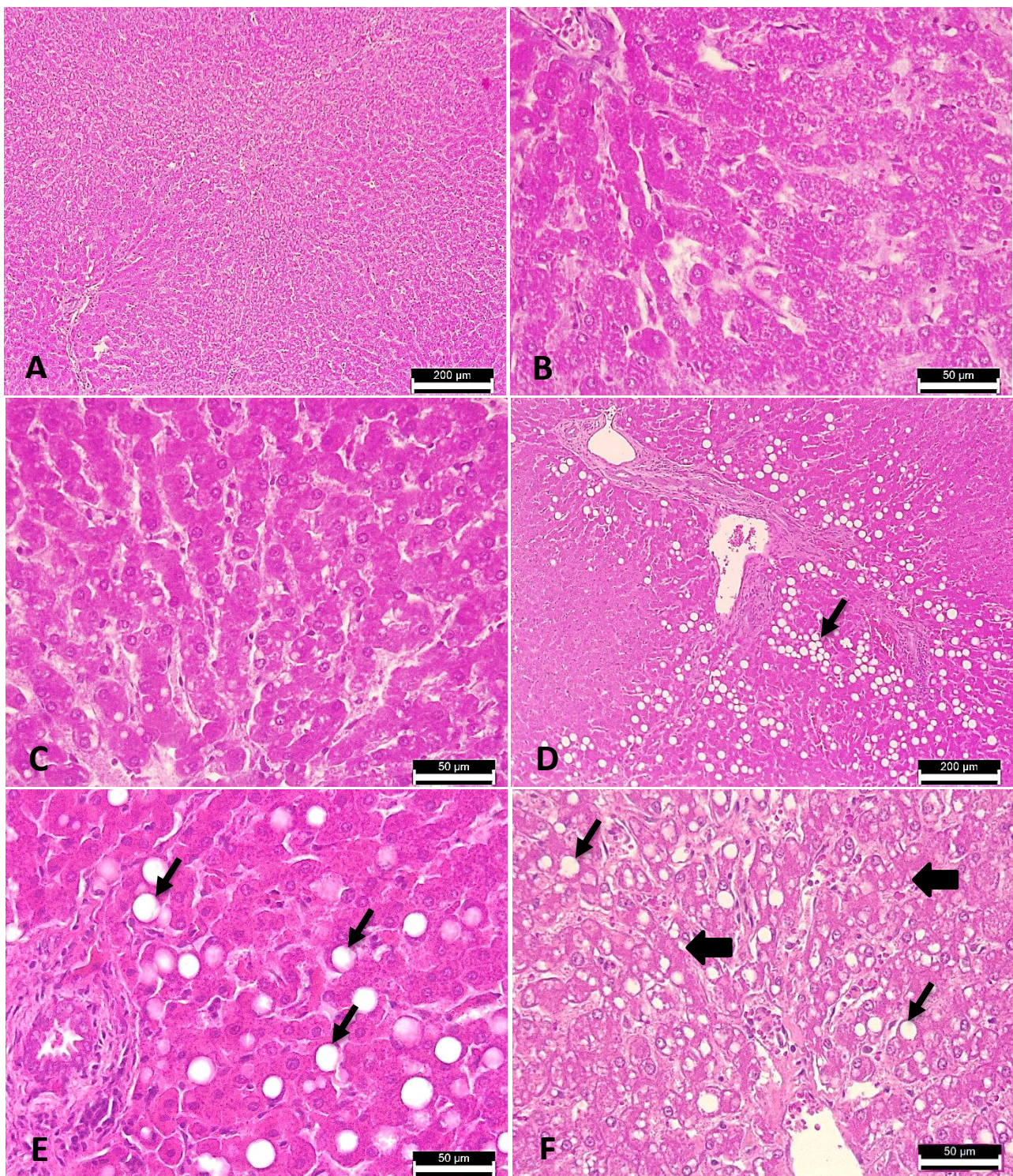


Figura 1: Fotomicrografia de parênquima hepático de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração H.E. Figura A e B: grupo controle com discreta congestão. Figura C: grupo G6, notar presença de vacúolos citoplasmáticos próximos a veia centrolobular caracterizando uma esteatose pericentrolobular. Figuras D e E: grupo G12, notar maior grau de esteatose localizada nas proximidades do espaço porta caracterizando uma macroesteatose periportal. Notar aumento de deposição de colágeno no espaço porta e proliferação de ductos biliares (seta curta). Figura F: grupo G18, notar macro esteatose difusa (seta fina), atrofia dos cordões de hepatócitos (seta grossa), hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, dilatação dos capilares sinusóides.

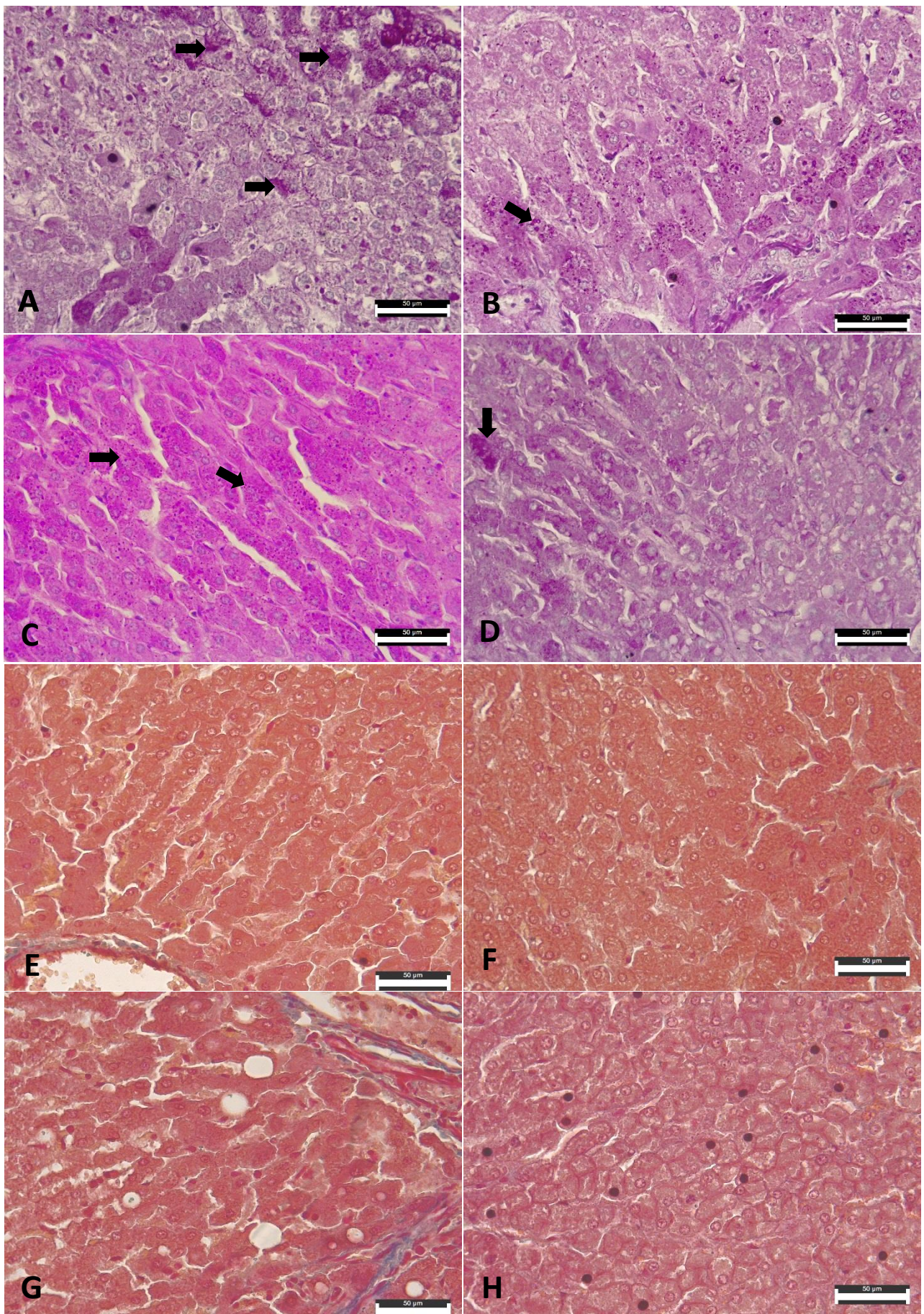


Figura 2: Fotomicrografia de parênquima hepático de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração PAS (Figuras A, B, C e D correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Coloração Tricrômico de Masson (Figuras E, F, G e H correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Notar presença de grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos (seta). Visibilizar ausência de fibras de colágeno entre os hepatócitos, porém presente no espaço porta.

Os grupos G12 e G18 tiveram inversão na relação núcleo/citoplasma dos hepatócitos com redução dos núcleos e aumento do citoplasma. Nestes grupos, observou-se hepatócitos de com citoplasma fracamente eosinofílicos, de aspecto granular e corpúsculos de Mallory compatíveis com degeneração alcoólica. Outros achados como degeneração hidrópica, congestão, hepatite focal discreta e degeneração glicogênica, também puderam ser descritas no parênquima hepático dos referidos grupos (Figuras 1 e 2).

Os hepatócitos também foram avaliados quanto ao número de núcleos. O grupo controle e G6 tiveram valores semelhantes de hepatócitos anucleados (35%) e nucleados (64%). Nos grupos G12 e G18 os valores de hepatócitos anucleados foram 48,9% e 39,2%, respectivamente, e as células nucleadas representaram 50,9% e 60,7% dos hepatócitos. A presença de hepatócitos com 2 núcleos não foi significativa entre os grupos.

Na tabela 3 podemos observar dados morfométricos referentes aos corpúsculos renais dos ovinos suplementados com níveis diferentes de glicerina bruta na dieta. De acordo com os resultados, os corpúsculos renais do grupo G12 tiveram a maior dimensão de glomérulo e cápsula de Bowman entre os demais grupos experimentais ($P < 0,05$). Os grupos G6 e G12 tiveram os maiores valores de espaço capsular comparados aos demais grupos do experimento ($P < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros morfométricos dos corpúsculos renais de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C	G6	G12	G18
Glomérulo Renal (μm^2)	151 $\pm$ 8,3 ^a	152,6 $\pm$ 12,3 ^a	165 $\pm$ 4,9 ^b	148,8 $\pm$ 3,3 ^a
Cápsula de Bowman (μm^2)	152,7 $\pm$ 8,48 ^a	157,7 $\pm$ 12,6 ^a	169,4 $\pm$ 5 ^b	151,5 $\pm$ 3,3 ^a
Espaço Capsular (μm^2)	1,7 $\pm$ 0,1 ^a	5 $\pm$ 1,9 ^b	4,4 $\pm$ 0,5 ^b	2,7 $\pm$ 0,8 ^a

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

De acordo com a análise qualitativa do parênquima renal dos grupos experimentais pode-se observar glomerulonefrite proliferativa e membranosa como lesão predominante, os grupos G12 e G18, foram os mais prejudicados, também foram notados outros achados histopatológicos como atrofia glomerular, presença de material hialino (proteináceo) no espaço subcapsular, presença de debris celulares associados ou não a material hialino no espaço subcapsular, dilatação dos tubulos renais corticais com perda de polaridade celular, presença intraluminal de debris celulares e calcificação distrófica intratubular e intersticial na região cortical. Foi possível observar a ausência de deposição de colágeno no interstício renal em quantidades relevantes na coloração tricrômico de Masson (Tabela 4) (Figuras 3 e 4).

Tabela 4. Análise qualitativa e determinação do percentual (%) das lesões histopatológicas do parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C	G6	G12	G18
Normal	32,7	9,8	2,9	0
Atrofia	20,4	26,8	35,5	29
G. Proliferativa	46,9	63,4	61,6	71
G. Membranosa	6,1	36,6	39,9	59,3
Albumina tubular	2	31,2	24,6	30,4
Nefrite	2	2,4	5,8	7

G: Glomerulonefrite. Para fins de contabilidade os glomérulos normais, atrofiados e com glomerulonefrite proliferativa podem ser somados totalizando 100%. Para os parâmetros: glomerulonefrite membranosa, depósito de albumina e nefrite considere-se 100% dos túbulos analisados para cada grupo experimental.

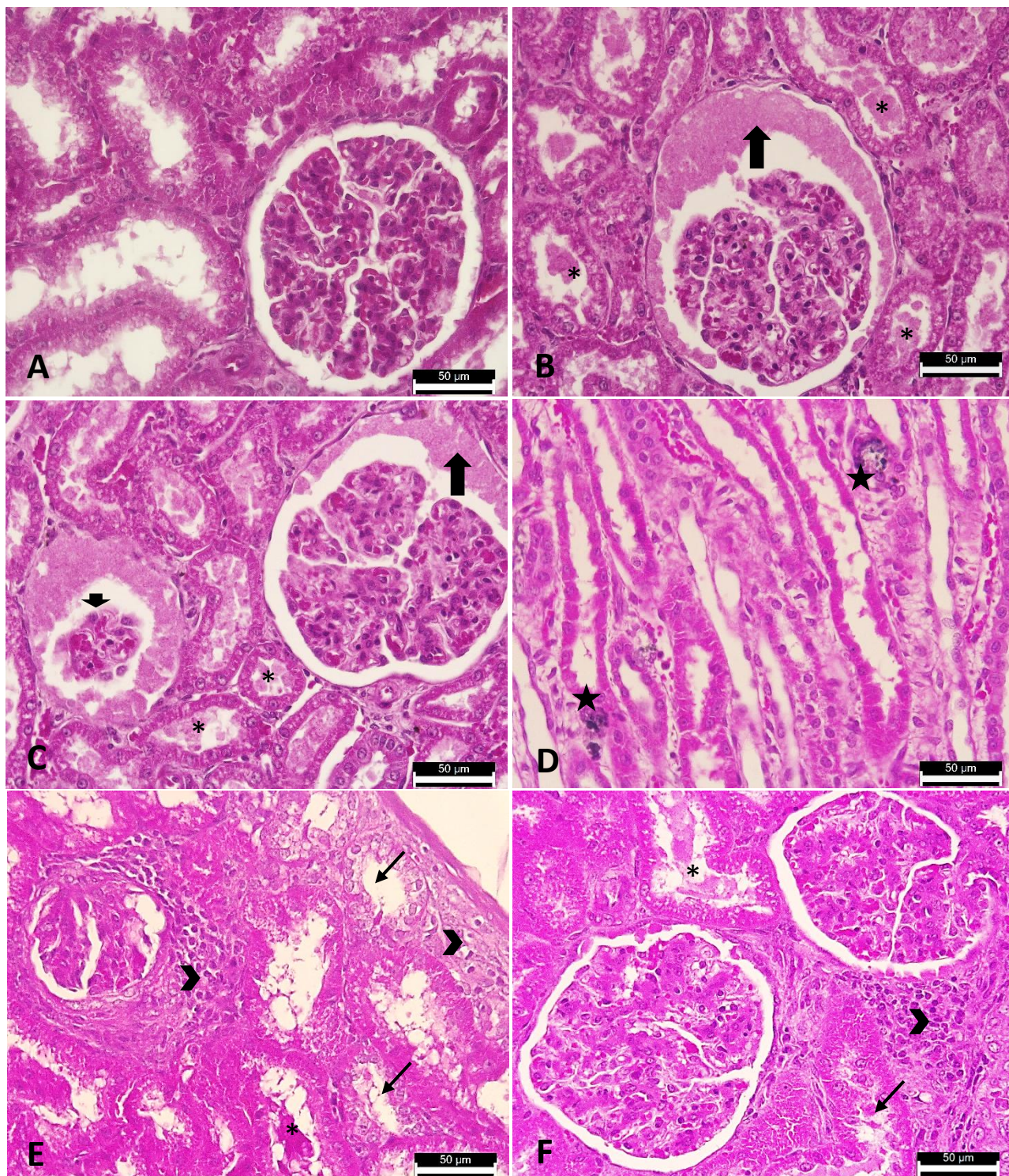


Figura 3: Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração H.E. Figura A: Grupo controle notar descamação dos túbulos contorcidos, glomérulo normal. Figura B e C: Grupo G6, visibilizar atrofia de glomérulo (seta grossa curta), presença de albumina no espaço de Bowman (seta grossa longa), precipitado proteico no lúmen tubular (asterisco). Figura D e E: Grupo G12, notar glomérulo com início de hialinização, túbulos contorcidos atróficos (cabeça de seta), túbulos contorcidos hipertróficos (seta fina), precipitado protéico no lúmen tubular (asterisco) e presença de precipitado de sais de cálcio nas alças de Henle (estrela). Figura F: G18, visibilizar glomérulos com glomerulonefrite membranoproliferativa, cilindros hialinos (asterisco), túbulos contorcidos hipertróficos (seta fina) e túbulos contorcidos atróficos (cabeça de seta).

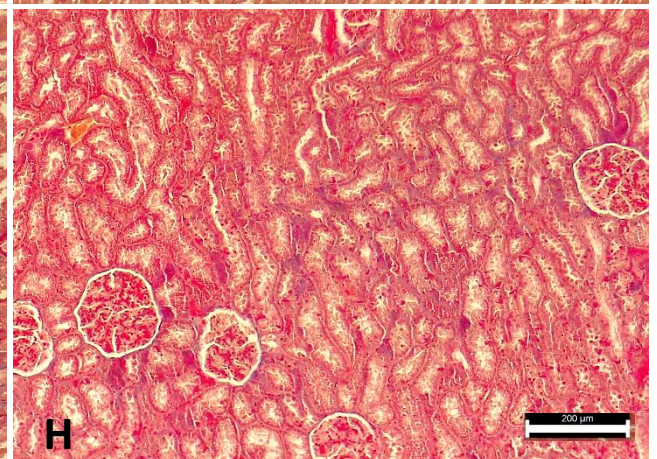
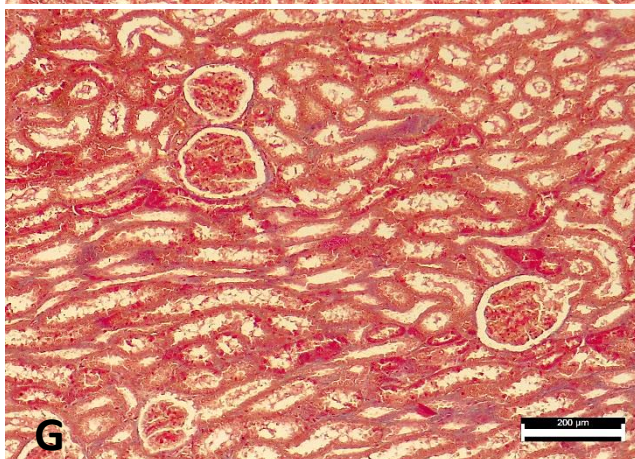
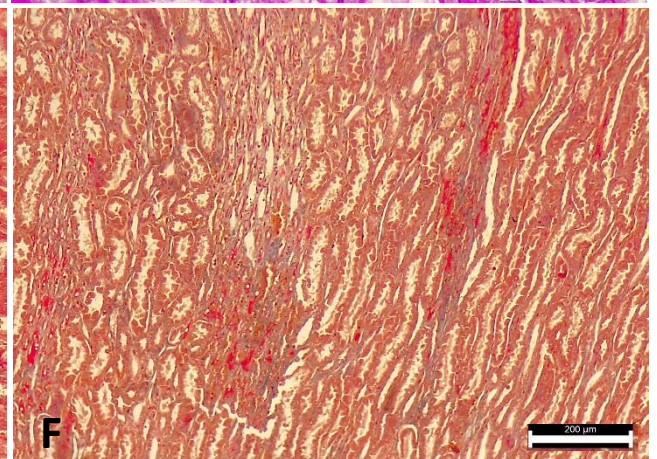
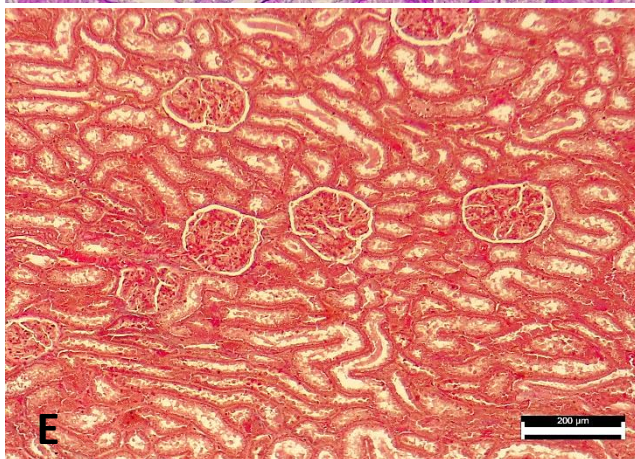
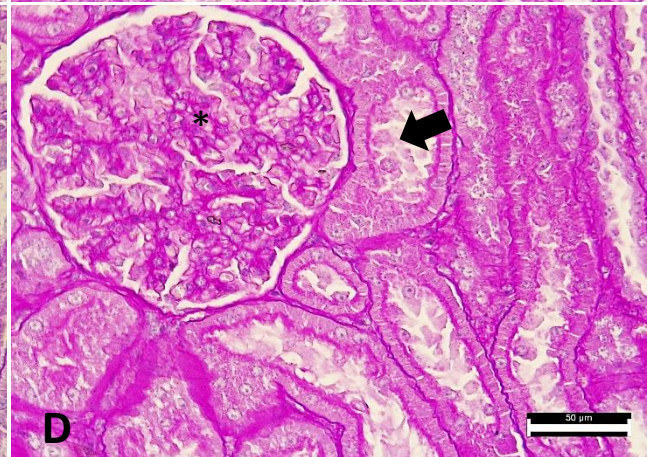
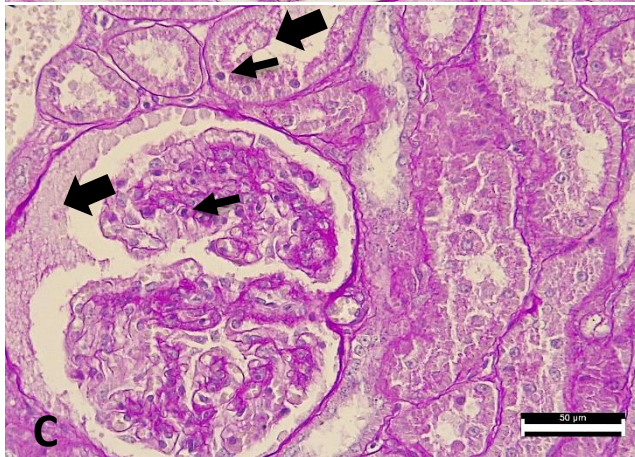
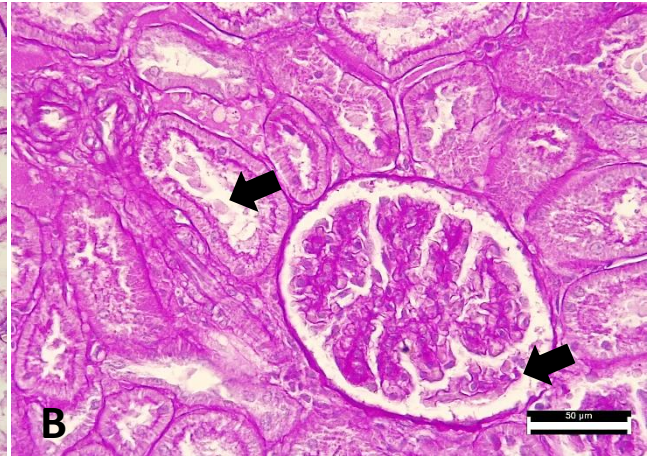


Figura 4: Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Coloração PAS (Figuras A, B, C e D correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). Coloração Tricrômico de Masson (Figuras E, F, G e H correspondem ao grupo controle, G6, G12 e G18, respectivamente). A: notar glomérulo normal e algumas células tubulares com lesão de membrana. B: notar presença de proteína no espaço capsular e no lúmen tubular (seta grossa). C: notar células tubulares em necrose (seta fina) e com extravasamento de conteúdo proteico no lúmen tubular e espaço capsular. D: visibilizar glomerulonefrite proliferativa (asterisco), túbulos contorcidos com conteúdo protéico no lúmen (seta grossa) e espessamento das membranas nos túbulos contorcidos e glomérulo. E: visibilizar marcação negativa. F, G e H: notar discreto depósito de colágeno entre os túbulos contorcidos e entre as alças de Henle (seta pequena).

A análise de metabólitos de peroxidação lipídica no plasma sanguíneo revelou que o nível de MDA no grupo G18 foi o maior entre os grupos experimentais ($P < 0,05$), revelando peroxidação lipídica (Figura 5).

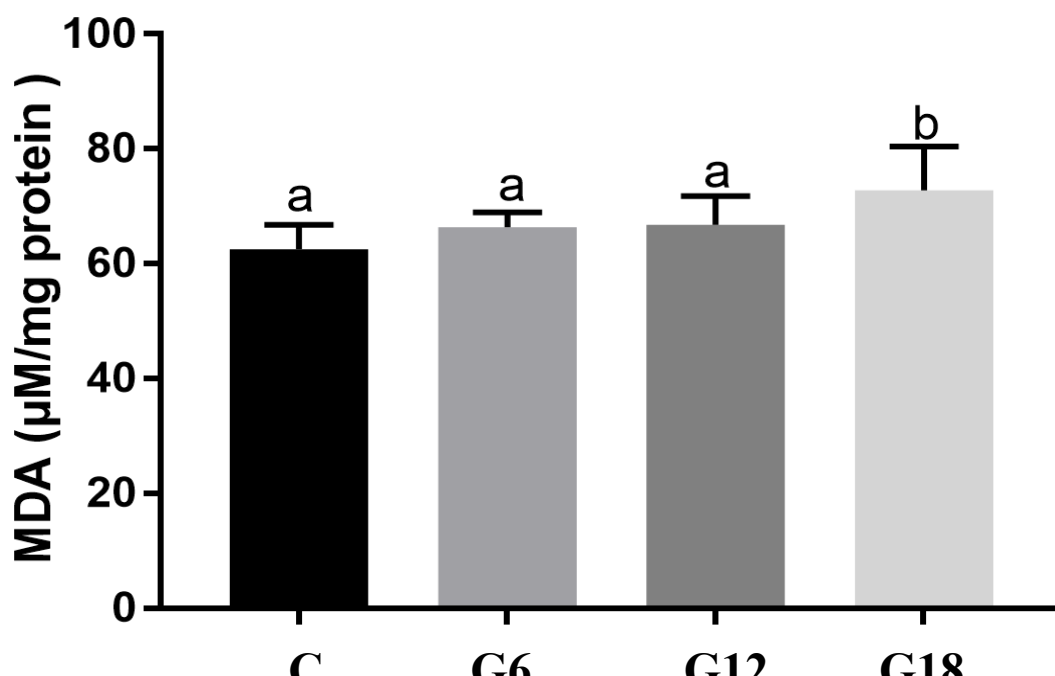


Figura 5. Metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) em plasma sanguíneo de ovinos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.

4. Discussão

O fígado é um órgão importante na digestão e absorção de nutrientes dos alimentos e, portanto, o monitoramento desse órgão é considerado essencial (Rašković *et al.*, 2011).

Alterações morfológicas no fígado podem ser desencadeadas por produtos químicos, drogas e até por nutrição desequilibrada, que pode resultar em adaptações, lesão ou mesmo a morte dos hepatócitos (Rôxo et al., 2018).

Costa et al., (2019) observaram que a adição de 18% de glicerina bruta na matéria seca da dieta de tourinhos causou lesões como inflamação, tumefação centrolobular, congestão difusa e necrose multifocal aleatória associada a infiltrado inflamatório mononuclear, ,entretanto, segundo o autor estas alterações não foram capazes de comprometer a integridade do parênquima hepático.

Parsons et al. (2009) testaram até 16% de inclusão de glicerina contendo 85,7% de glicerol e 0,09% de metanol na alimentação de novilhas e verificaram que 11,2% dos animais apresentaram abscessos hepáticos, mas não encontram significância entre o aumento dos níveis de glicerol e a presença dos abscessos, contudo, é válido ressaltar que o objetivo da pesquisa realizada pelo autor era observar parâmetros zootécnicos não havendo análise histopatológica tecidual. Lammers et al. (2008) alimentaram porcos com até 10% de glicerina bruta e não observaram diferença entre o percentuais de lesões hepáticas como pleomorfismo hepatocelular, hepatite portal, fibrose periportal, hepatite, lipidose hepática.

Na presente pesquisa, os ovinos que receberam maior percentual de glicerina na dieta (G12 e G18) tiveram mais esteatose hepática. De acordo com Lin et al., (1976), a adição de 20% de glicerina na dieta de ratos e frangos de corte, aumentaram o peso do fígado e promoveram o aumento das enzimas envolvidas na lipogênese hepática. Segundo Simon et al., (1997) a alimentação de frangos com 25% de glicerol induziu o aumento da concentração hepática do substrato. Codornas alimentadas com 10 e 15% de glicerina bruta tiveram esteatose hepática diretamente proporcional ao nível de glicerina bruta nas dietas (Shoukry et al., 2017). Esses autores concluíram que o nível seguro de inclusão de glicerina seria de até 5%. Apesar da diferença entre as espécies em questão, parece razoável relacionar níveis mais elevados de glicerina com alterações hepáticas importantes, principalmente a longo prazo. Desta forma, determinar os níveis seguros para utilização da glicerina pode aumentar o rendimento do rebanho e minimizar os efeitos tóxicos desta fonte energia.

Os hepatócitos dos ovinos dos grupos G12 e G18 tiveram seus núcleos diminuídos. Segundo Rašković *et al.*, 2011, a área nuclear dos hepatócitos é um bom indicador de atividade metabólica. A diminuição do núcleo de hepatócito é indicativa de morte celular

(Scaff & Scussel, 2008). Neste sentido, provavelmente a diminuição dos núcleos de hepatócitos nos grupos suplementados com maior teor de glicerina está associada a redução da atividade metabólica, ou mesmo morte celular dos hepatócitos, uma vez que a proporção de hepatócitos anucleados nestes grupos também aumentou.

No presente estudo o grupo G18 teve discreta de atrofia de hepatócitos. Segundo Fuller (2004) dentre os sinais de doenças hepáticas estão acúmulo de gordura, hepatite, neoplasia e atrofia. Não foram encontrados relatos na literatura que façam associação entre o consumo de glicerol e atrofia hepática. Porém em um estudo *in vitro* realizado por Sugiyama e colaboradores (2002) foi comprovada que a inclusão de níveis de 1, 2 e 4% glicerol em meio de cultura de hepatócito de ratos inibiu o crescimento destas células.

Os níveis plasmáticos de MDA foram elevados nos ovinos que receberam adição de 18% de glicerina na dieta. Atiba et al., (2016) correlacionaram altos níveis plasmáticos de MDA com lesões hepáticas. O MDA é um produto da peroxidação lipídica e pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo (Janero, 1990). Neste sentido, sugere-se a alterações hepáticas no G18 esteja associada ao estresse oxidativo sofrido pelo grupo. Diversos distúrbios hepáticos podem ser explicados pelo estudo das EROs, inclusive o monitoramento de marcadores do estresse oxidativo tem o potencial de diagnosticar o grau lesão hepática (Cichoż-Lach & Michalak 2014).

Na análise qualitativa do parênquima renal um achado bastante frequente no grupo G18 foi a glomerulonefrite proliferativa que afetou mais de 70% de todos os glomérulos avaliados. Embora não se tenha encontrado estudos que façam correlação específica entre a glomerulonefrite proliferativa e o glicerol, de acordo com Zager et al., (1995) as lesões renais induzidas pelo glicerol estão fortemente associadas à presença de MDA no tecido. Apesar de no presente estudo não terem sido dosados níveis de MDA no tecido renal, o aumento de MDA registrado no plasma sanguíneo do grupo G18 reforça a ligação entre a patogênese da doença renal e o estresse oxidativo, sendo possível que o expressivo número de glomerulonefrite proliferativa registrada neste grupo esteja associada ao alto percentual de glicerol ingerido pelos animais.

Rôxo et al, (2018) observou dilatação nos túbulos renais de peixes que consumiram glicerina bruta porém salientou que as alterações eram reversíveis e não comprometiam o funcionamento do órgão. Em parte, os resultados da presente pesquisa estão de acordo com os

do autor, porém as lesões aqui presentes foram mais abundantes e severas especialmente no grupo G18, sugerindo que a longo prazo possa haver um comprometimento funcional do órgão.

Leão et al. (2012) não observaram alterações anatomopatológicas observadas nas amostras de rim bovino que foram alimentados 24% de glicerina bruta. A discrepância entre os resultados do trabalho do autor com os da presente pesquisa pode estar no objetivo e tipos de análises realizadas nos experimentos. Enquanto o autor analisou a anatomopatologia do rim, o presente estudo buscou correlacionar a inclusão dos níveis de glicerina com o surgimento de possíveis lesões histopatológicas no rim dos animais, buscando estabelecer que nível de inclusão de glicerina é seguro para a alimentação de ovinos, sem causar quaisquer danos teciduais.

Segundo Cryer & Hartley (1973), o excesso de glicerol na dieta pode induzir alterações anatômicas, adaptação fisiológica e bioquímica, no fígado e rins. Se o consumo de glicerol supera a capacidade de transformação do corpo, os níveis sanguíneos desta molécula são aumentados (Robinson e Newsholme 1969). Romano et al., 2014, postularam que a ingestão de glicerina bruta na dieta de aves não deve exceder 7,5%, em função da dificuldade de metabolização caso seja adicionado um maior percentual do produto na dieta. Aves que consumiram 10% de glicerina bruta tiveram aumento de concentrações do composto na corrente sanguínea.

O glicerol atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (Lin, 1977; Lages & Lucas, 1997). É componente do metabolismo normal dos animais, encontrado na circulação e nas células. Tem papel em diversas vias metabólicas que se inter cruzam, podendo ter três destinos: gliconeogênese para posteriormente ser oxidado para gerar ATP (Adenosina Trifosfato), via das pentoses fosfato ou ser incorporado aos lipídios. A determinação da rota que a molécula seguirá depende de alguns fatores como: disponibilidade do substrato, disponibilidade enzimática, ativação ou inibição enzimática, dentre outros (Shoukry *et al.*, 2017; Crisostomo *et al.*, 2017).

Segundo Crisostomo et al., (2017) numa dieta de alto teor calórico as vias do metabolismo do glicerol ficam saturadas, o que estimula a expressão de proteínas que controlam a entrada e saída o glicerol da célula. O alto ambiente energético estimula a lipogênese e gliconeogênese, favorecendo o ganho de peso do animal, enquanto o excesso de

glicerol se acumula nos tecidos. Altas concentrações de glicerol no tecido renal provocam lesões através do aumento dos níveis de MDA no tecido (Korrapati *et al.*, 2012; Al Asmari *et al.*, 2017). Portanto, o maior teor de glicerol na dieta dos ovinos neste estudo tenha saturado as vias metabólicas e estimulado a deposição do excesso de glicerol nos tecidos inclusive o renal e hepático, pois neste grupo foram observadas lesões como glomerulonefrite proliferativa, degeneração e necrose dos túbulos renais, concomitantemente com o registro do aumento nos níveis de MDA no plasma sanguíneo.

Embora baixos níveis de EROs e ERNs sejam necessários para sobrevivência, proliferação, crescimento celular e regulação de vasorreatividade, ocorrendo um desequilíbrio entre a geração e a eliminação de EROs o tecido é submetido à inflamação e morte celular. Todas as formas de lesões renais sejam agudas ou crônicas são resultado da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) durante a progressão da doença (Ratliff *et al.*, 2016).

Deste modo, a análise dos achados histopatológicos hepáticos e renais observados no grupos G12 e G18 com o aumento nos níveis plasmáticos de MDA no grupo G18, sugere que a ingestão de 12 e 18% de glicerina bruta pode provocar degenerações em órgãos vitais dos ovinos e por este motivo não deve ser considerada para a alimentação deste animais em terminação.

Conclusão

A inclusão de até 6% de glicerina bruta na dieta de ovinos é segura e benéfica, pois não altera parâmetros histomorfométricos do fígado e rim além de não provocar estímulo ao estresse oxidativo no plasma sanguíneo dos animais, podendo ser utilizada para reduzir custos na alimentação sem qualquer prejuízo à saúde dos mesmos.

5. Referências

Al Asmari AK, Al Sadoon KT, Obaid AA, Yesunayagam D, Tariq M (2017) Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. *BMC Nephrology*, **18**, 1.

- Atiba AS, Abbiyesuku FM, Oparinde DP, Niran-Atiba TA, Akindele RA (2016) Plasma Malondialdehyde (MDA): An Indication of Liver Damage in Women with Pre-Eclampsia *Ethiop J Health Sci.* **26**, 479–486.
- Barros MCC, Silva FF, Silva RR, Simmionato JI, Guimaraes GS, Silva LL, Facuri LMAM (2015) Glicerina bruta na dieta de ovinos confinados: composicao centesimal e perfil de acidos graxos do *longissimusdorsi*. *Semina: Ciências Agrárias*, **36**, 431- 442.
- Cichoż-Lach H, Michalak, A (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, **20**, 8082.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (2013) Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais, Brasília - DF.
- Costa SF, Melo LQ, Resende Neto M, Carvalho JRR, Ladeira MM et al (2019) Aspectos morfológicos do rúmen, omaso e fígado de tourinhos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **71**, 340-344.
- Crisostomo L, Alves MG, Calamita G, Sousa M, Oliveira PF (2017) Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. *Molecular Human Reproduction*, **23**, 725–737.
- Cryer A, Hartley W (1973) Studies on the adaptation of rats to a diet high in glycerol. *International Journal of Biochemistry*, **4**, 293- 308.
- Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M (1998) Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. *Clin. Investigation*, **4**, 955-959.
- Fuller MF (2004) The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition. *CABI Publ.*, Wallingford, UK.
- Gunn PJ, Near, MK, Lemenager RP, Lake SL (2010) Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. *J. Anim. Sci.*, **88**, 1771-1776.
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*. **9**, 515-540.
- Korrapati MC, Shaner BE, Schnellmann RG (2012) Recovery from Glycerol-Induced Acute Kidney Injury Is Accelerated by Suramin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **341**, 126–136.
- Ladeira MM, Carvalho JRR, Chizzotti ML, Teixeira PD, Dias, JCO et al., (2016). Effect of increasing levels of glycerin on growth rate, carcass traits and liver gluconeogenesis in young bulls. *Animal Feed Science and Technology*, **219**, 241–248.
- Lages F, Lucas C (1997) Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **8** -18.

Lammers PJ, Kerr BJ, Weber TE, Bregendahl K, Lonergan SM et al. (2008) Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin-supplemented diets. *J. Anim. Sci.*, **86**, 2962-2970.

Leão JP, Ramos AT, Maruo VM, Souza DPM, Neiva JNM et al. (2012). Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol. *Ciência Rural*, **42**, 1253–1256.

Lin MH, Romsos DR, Leveille GA (1976) Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acids synthesis in the rat and chicken. *Journal of Nutrition*, **106**, 1668-167.

Lin ECC (1977) Glycerol utilization and its regulation in mammals *Annual Review Biochemistry*, **46**, 765-795.

Mach N, Bach A, Devant M (2009) Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, **87**, 632-638.

Monteiro JC, Matta SLP, Predes FS, Oliveira TT (2009) Liver Morphology and Morphometry and Plasma Biochemical Parameters of Wistar Rats that Received Leaf Infusion of *Rudgea viburnoides* Benth. (Rubiaceae) *Braz. Arch. Biol. Technol.* **52**, 407-412.

National Research Council – NRC (2007) Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D.C. *National Academy Press*, 362.

Oliveira DS, Rogério, MCP, Batista ASM, Alves AA, Albuquerque FHMAR et al (2014) Desempenho características de carcaça de cordeiros SPRD cruzados com as raças Santa Inês e Somalis Brasileira terminados em confinamento. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* **15**, 937–946.

Parsons GL, Shelor MK, Drouillard JS (2009) Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. *Journal of Animal Science*, **87**, 653-657.

Rašković BS, Stanković MB, Marković ZZ, Poleksić VD (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences*, **56**, 87-100.

Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin M S (2016) Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **25**, 119–146.

Robinson J, Newsholme A (1969) The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. *Journal of Biochemistry*, **112**, 449-453.

Romano G, Menten J, Freitas L, Lima M, Pereira R et al. (2014) Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed increasing glycerine levels. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, **16**, 97–105.

Rôxo VBS, Moron SE, Ferreira DA, Jorge MPB (2018) Crude glycerol in the diets of the juveniles of Amazon catfish (female *Pseudoplatystoma punctifer* x male *Leiarius marmoratus*). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, **3**, 5.

Silva CLS (2010) Glicerina proveniente da produção de biodiesel como ingrediente de ração para frangos de corte. Dissertação de Mestrado.

Spicer SS (1987) *Histochemistry in pathologic diagnosis*. New York: Dekker.

Simon A, Schwabe M, Bergner H (1997) Glycerol supplementation in broiler rations with low crude protein content. *Archives of Animal Nutrition*, **50**, 271-282.

Shoukry HMS, El-Shafei AA, Al-Gamal MA, Abo-Salem RA (2017) Impact of Dietary Crude Glycerin on Liver Metabolism of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Egypt. Poult. Sci.*, **37**, 667-683.

Scaff RMC, Scussel VM (2008) Ultra-structural and histochemical analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver treated with fumonisin B1. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**, 333–344.

Sugiyama N, Mizuguchi T, Aoki T, Hui T, Inderbitzin D et al. (2002) Glycerol Suppresses Proliferation of Rat Hepatocytes and Human HepG2 Cells. *Journal of Surgical Research*, **103**, 236–242.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA & Freitas-Neto AG (2003) *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica* 2ª ed. Manole, São Paulo, 331.

Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G (1993) Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*, **208**, 10–15.

Zager RA, Burkhart KM, Conrad DS, Gmur DJ (1995) Iron, heme oxygenase, and glutathione: Effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney International*, **48**, 1624-1634.

Conclusão

A inclusão de até 6% de glicerina bruta na dieta de ovinos é segura, pois, não altera parâmetros histomorfométricos hepáticos, renais, testiculares e testosterona plasmática, além de não provocar qualquer estímulo ao estresse oxidativo no plasma sanguíneo dos animais, podendo ser utilizada para reduzir custos na alimentação de ovinos destinados ou não à reprodução sem qualquer prejuízo à saúde dos mesmos.

6. Anexos.

Autorização do Comitê de Ética do Uso de Animais de Experimentação (CEUA-UFRPE)



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n.
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	059/2016
Número do processo	23082.006973/2016
Data de emissão da licença	06 de Junho de 2016
Título do Projeto	Glicerna bruta na dieta de pequenos ruminantes em confinamento.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Francisco Fernando Ramos de Carvalho
Colaboradores	Antonia Sherlânea Chaves Vêras; Marcelo de Andrade Ferreira; Wilson Moreira Dutra Júnior; Maria Luciana Menezes Wanderley Neves; Lígia Maria Gomes Barreto.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Caprino; 20 (machos) e 24 (fêmeas) Ovino; 40 (machos) total 104 animais.


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)

 Prof.ª Dr.ª Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA