

FERNANDO AUGUSTO PAES DE BARROS ARGUELLO

Suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros da raça Brangus:
efeitos sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen
fresco e criopreservado

Cuiabá – MT
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO AUGUSTO PAES DE BARROS ARGUELLO

Suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros da raça Brangus:
efeitos sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen
fresco e criopreservado

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis

Co-Orientador: Prof. Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis

Cuiabá – MT
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

A694s Arguello, Fernando Augusto Paes de Barros
Suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros da raça Brangus: efeitos sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e criopreservado / Fernando Augusto Paes de Barros Arguello. – 2009.
94p. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de concentração: Produção Animal, 2009.

“Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis”.

CDU – 636.2-087.7

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente Söhn – CRB-1/931

Índice para Catálogo Sistemático

1. Touros – Suplementação dietética
2. Touros – Sêmen – Qualidade
3. Gado bovino – Pecuária – Zootecnia
4. Bovino – Pecuária - Zootecnia

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Aluno: Fernando Augusto Paes de Barros Arguello

Título: Suplementação com vitamina e e selênio na dieta de touros da raça brangus: efeitos sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e criopreservado

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis
(FAMEV/UFMT) (Orientadora)

Prof. Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis
(FAMEV/UFMT) (Co-Orientador)

Dr.^a Carmen Neusa Martins Cortada
(Pesquisadora - TECPAR)

Prof. Dr. Marcelo Diniz Santos
(UNIC/MT)

Dedicatória

A Deus

Aos meus pais Fernando e Helena

A minha avó Almira

A minha namorada Thaís

Aos meus amigos

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me dar saúde, força, disposição e pelas pessoas que colocou ao meu redor.

Aos meus Pais, não precisaria nem falar, devo tudo a eles. São eles que estiveram e com toda a certeza sempre estarão ao meu lado. Minha mãe, a professora Helena, fazendo de tudo para me dar a melhor educação possível, sempre me incentivando e ensinando a dar prioridade aos estudos. Meu pai, Sr. Fernando, um grande guerreiro, exemplo de otimismo, perseverança, força e vontade de vencer, demonstrando a cada dia que não se deve desistir e muito menos reclamar da vida quando algo dá errado.

Ainda sobre minha família, não posso esquecer da vovó Almira, com sua tranquilidade, sempre passando segurança e sobretudo mostrando que devemos acreditar e ter muita fé em Deus.

As minhas irmãs, Ellen, Kelly e Bia o que tenho a dizer, é que as amo muito e agradeço pelo todo apoio e confiança.

Ao meu tio Antero, por acreditar no meu trabalho, logo vou poder retribuir tudo o que fez por mim.

A minha namorada, Thaís, por fazer parte da minha vida, por toda atenção, compreensão, e por ter suportado todas as coisas difíceis e ter ficado ao meu lado. Te amo muito.

Aos professores do programa de pós graduação, Joadil, Luciano Cabral, Anselmo, Eduardo Kling e João Caramori pelo cohecimento e informações transmitadas.

A minha orientadora e professora Luciana Keiko, pelos ensinamentos, dedicação, confiança, enfim por toda orientação concedida durante todo o mestrado e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador e professor Joanis, pela atenção, dicas, sugestões e ensinamentos.

Ao professor Marcelo, primeiramente por aceitar participar da minha banca, pelas sugestão, críticas e por todos ensinamentos desde a graduação.

A Dr^a Carmem Neusa Martins Cortada, pela disposição e contribuição na etapa final deste estudo.

Ao Douglas, secretário da pós-graduação, pela ajuda com a documentação de mestrado, matrículas em disciplinas, inscrições em cursos entre outros favores.

A toda equipe da Fazenda Sereno, Sérgio, Paulo, Baixinho, Moacir, Tonho, Aldo, Dona Fátima e em especial ao Santana, que abriu as portas da propriedade, disponibilizou os animais, alojamento, alimentação e sempre esteve disposto a colaborar, enfim foi uma pessoa fundamental para a concretização deste trabalho.

A toda equipe do LABRA, em especial aos estagiários Júlia, Alexandre (Nonho), Moacir, Eleonora e Pepe, pela ajuda nas coletas e análises, e ao Seo Hélio, pela ajuda na organização de todo material laboratorial. Obrigado equipe do manejo.

Ao Luca, Léo e Renata, pela ajuda nas análises do pasto e concentrado. E a todos os colegas de mestrado, Jonathan, Cassiano, Ronaldinho, Vivian, Rafaela, João Paulo, Gilson, Lorenzo, Isis, Carol, Alisson, Marcus, Patrícia, Giselde, Júnior (meu mestre) entre outros por todo apoio durante a pós-graduação.

Em especial ao Bruno e Waltinho, que participaram de todo desenvolvimento deste trabalho, obrigado equipe cachimbo.

Ao Homero, que se encarregou dos compromissos profissionais para que eu pudesse cursar o mestrado com mais tranquilidade.

A CAPES/PROCAD e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Alexandre e a Heloísa, da Progénie – ABS, pela confiança e empréstimo do botijão criogênico.

Ao Fernando e a Agrocria, por fornecerem o suplemento que foi utilizado no experimento.

Aos meus amigos e irmãos, Bola, Feijão, Bob, Max, Tony, Omar e Fábio, pela amizade, pelas festas, pelo pagode, pelo futebol de fim de semana além do mais importante que é a verdadeira amizade.

E por fim a todos que me ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

ARGUELLO, F.A.P.B. **Suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros da raça Brangus: efeitos sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e criopreservado.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

O presente trabalho foi conduzido na Fazenda Sereno – GAP, localizada no município de Jaciara-MT, com objetivo de avaliar o efeito da suplementação dietética com vitamina E e selênio sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros jovens da raça Brangus. Foram utilizados 17 touros da raça Brangus com idade média de 24 meses e peso vivo médio de 454 kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E e selênio (GS, 400 UI de vitamina E/dia + 0,1 mg de selênio/kg de MS ingerida) adicionados ao concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados por pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça e recebendo concentrado balanceado diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E e selênio foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental, foram realizadas 4 coletas de sêmen sendo: antes do início da suplementação (coleta 1); com 30 (coleta 2) e com 60 dias de suplementação (coleta 3), e 15 dias após o término da suplementação (coleta 4). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. A consistência testicular foi aferida a cada coleta. As coletas de sêmen foram realizadas pelo método da eletroejaculação, seguida da retirada de alíquotas para avaliações do sêmen fresco. Posteriormente, procedeu-se o congelamento do sêmen, que foi armazenado em botijão criogênico até o momento das análises. O descongelamento do sêmen foi realizado submergindo as palhetas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Os parâmetros volume seminal, motilidade espermática, vigor, concentração e morfologia espermática, total de espermatozoides por ejaculado, viabilidade espermática, integridade da membrana espermática, reação acrossômica e integridade acrossomal foram utilizados para avaliar o efeito do tratamento sobre a qualidade do sêmen fresco. E para verificar o efeito do tratamento sobre a qualidade do sêmen criopreservado utilizou-se os parâmetros motilidade espermática, vigor, viabilidade espermática, integridade da membrana espermática e reação acrossômica. Não foi observado efeito significativo da suplementação com vitamina E e selênio ($p>0,10$) sobre a consistência testicular e sobre os parâmetros qualitativos do sêmen fresco. Também não foi verificado efeito significativo do tratamento ($p>0,10$) sobre os parâmetros qualitativos do sêmen criopreservado. Por outro lado, maior porcentagem de espermatozoides ($p=0,0213$) com membrana plasmática íntegra foi observada tanto no sêmen fresco quanto no sêmen criopreservado dos animais do grupo suplementado com vitamina E e selênio. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que suplementação dietética com vitamina E e selênio, nos níveis utilizados e nas condições de manejo do presente experimento, não influenciou os parâmetros qualitativos do sêmen, no entanto promoveu efeito positivo sobre a integridade funcional da membrana espermática tanto no sêmen fresco quanto no sêmen criopreservado de touros jovens da raça Brangus.

Palavras chaves: antioxidantes, espermatozoíde, estresse oxidativo, fertilidade

ABSTRACT

ARGUELLO, F.A.P.B. **Integrity of sperm membrane and fresh and frozen-thawed semen quality of Brangus bulls supplemented with vitamin E and selenium.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

The present work was conducted at Sereno-GAP Farm, located in Jaciara-MT, with the objective to evaluate the effect of dietary supplementation with vitamin E and selenium on the sperm membrane integrity and on fresh and cryopreserved semen quality of young Brangus bulls. Seventeen Brangus bulls with 24 months of mean age and 454 kg of average live weight were used. The animals were divided randomly into two groups: control group (GC) and supplemented with vitamin E and selenium group (GS, 400 IU of vitamin E/day + 0.1 mg of selenium/kg of dry matter intake) added to concentrate. Each group was kept in separate areas formed by pasture of *Panicum maximum* cv. Mombasa and receiving balanced concentrate daily in amount of 4.5 kg/animal. The supplementation with vitamin E and selenium lasted 60 days. During the experimental period, 4 semen collections were realized: before the beginning of supplementation (collect 1); with 30 (collect 2) and 60 days of supplementation (collect 3) and finally, 15 days after the supplementation (collect 4). The experiment was installed in a completely randomized design with repeated measures over time. The testicular consistency was measured for each collection. Semen collections were performed the method of electroejaculation, followed by withdrawal of aliquots for evaluation of fresh semen. Subsequently, the semen samples were frozen and stored in cryogenic cylinders until the time of analysis. The thawing of the samples was made by immersion of the straws in a 37°C water-bath for 30 seconds. The semen parameters, volume, motility, vigor, concentration, morphology, number of total sperm per ejaculate sperm viability, sperm membrane integrity, acrosome reaction and acrosome integrity were used to evaluate the effect of treatment on fresh semen quality. And the semen parameters, motility, vigor, sperm viability, sperm membrane integrity and acrosome reaction were used to evaluate the effect of treatment on cryopreserved semen quality. There was no significant effect of supplementation with vitamin E and selenium ($p>0.10$) on the testicular consistency and on the parameters of fresh and cryopreserved seminal quality. Furthermore, higher percentage ($p=0.0213$) of intact sperm membrane was observed, both in fresh and cryopreserved semen, in group supplemented with vitamin E and selenium. Results obtained indicated that the dietary supplementation with vitamin E and selenium, at levels used and the management conditions of the present experiment did not influence the parameters of seminal quality, however promoted positive effect on the functional sperm membrane integrity both in fresh and cryopreserved semen of young Brangus bulls.

Key words: antioxidants, spermatozoa, oxidative stress, fertility

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA	Análise de variância
ATP	Adenosina tri fosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
CONST	Variável consistência testicular
Cu ⁺	Íon cobre monovalente
Cu ²⁺	Íon cobre bivalente
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EOS	Variável viabilidade espermática
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa ao oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferro bivalente
Fe ³⁺	Íon ferro trivalente
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malondialdeído
MOT	Variável motilidade espermática
MS	Matéria seca
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O ₂	Molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido

OH ⁻	Radical hidroxila
POPE	Variável integridade acrossomal
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRI 1	Variável espermatozóides vivos com acrossoma intacto
TRI 2	Variável espermatozóides vivos com reação acrossômica
TRI 3	Variável espermatozóides mortos com acrossoma intacto
TRI 4	Variável espermatozóides mortos com reação acrossômica degenerativa
VIG	Variável vigor
VOL	Variável volume

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
%	porcentagem
10^6	milhões
\pm	mais ou menos
<	menor
>	maior
=	igual
mL	mililitros
ng	nanograma
nm	nanômetro
kg	quilograma
p	nível de significância
r	coeficiente de correlação de Pearson
UI	unidades internacionais
*	asterisco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão bibliográfica

- Figura 1. Reação da dismutação do ânion superóxido pela ação da superóxido dismutase (SOD)..... 33
- Figura 2. Reação de conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio..... 34
- Figura 3. Mecanismo de ação da glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR)..... 36

Capítulo 1

- Gráfico 1. Dados meteorológicos (temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média) da região de Jaciara, MT – 02/06/2008 – 17/09/2008..... 62

Capítulo 2

- Gráfico 1. Dados meteorológicos (temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média) da região de Jaciara, MT – 02/06/2008 – 17/09/2008..... 81

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1. Composição percentual do suplemento fornecido aos animais experimentais..... 63
- Tabela 2. Análise bromatológica do suplemento concentrado e da gramínea forrageira..... 64
- Tabela 3. Média \pm erro padrão da média (EPM) e nível de probabilidade da consistência testicular (CONS), concentração espermática (CONC), número total de espermatozóides por ejaculado (TOTEJA), motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) das amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados com vitamina E e selênio (GS) 66
- Tabela 4. Média \pm erro padrão da média (EPM) e nível de probabilidade das variáveis viabilidade espermática (EOS), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO), espermatozóides com acrossoma íntegro (POPE), espermatozóides vivos com acrossoma intacto (TRI-1), espermatozóides vivos com reação acrossômica (TRI-2), espermatozóides mortos com acrossoma intacto (TRI 3) e espermatozóides mortos com reação acrossômica degenerativa (TRI 4) das amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados com vitamina E e selênio (GS)..... 70
- Tabela 5. Consumo estimado diário de vitamina E e selênio na gramínea forrageira, no concentrado, na gramínea forrageira + concentrado (situação do grupo controle, GC) e na gramínea forrageira + concentrado + suplementação (situação do grupo suplementado com vitamina E e selênio, GS) dos animais experimentais..... 73

Capítulo 2

Tabela 1. Composição percentual do suplemento fornecido aos animais experimentais.....	82
Tabela 2. Análise bromatológica do suplemento concentrado e da gramínea forrageira.....	83
Tabela 3. Média \pm erro padrão da média das variáveis motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), viabilidade espermática (EOS), espermatozoides com membrana plasmática íntegra (HIPO), espermatozoides vivos com acrossoma intacto (TR1-1), espermatozoides vivos com reação acrossômica (TRI-2), espermatozoides mortos com acrossoma intacto (TRI 3) do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros Brangus suplementados com vitamina E e selênio (Vit E + Sel.) e não suplementados (controle).....	86
Tabela 4. Consumo estimado diário de vitamina E e selênio na gramínea forrageira, no concentrado, na gramínea forrageira + concentrado (situação do grupo controle, GC) e na gramínea forrageira + concentrado + suplementação (situação do grupo suplementado com vitamina E e selênio, GS) dos animais experimentais.....	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. COLETA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN BOVINO.....	19
2.1.1. <i>Testes funcionais que avaliam a integridade da membrana espermática</i>	20
2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO.....	22
2.2.1. <i>Mecanismos de lesão celular durante o congelamento/descongelamento de espermatozoides</i>	23
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.3.1. <i>Radicais livres e espécies reativas ao oxigênio</i>	25
2.3.1.1. <i>Ânion superóxido (O_2^-)</i>	26
2.3.1.2. <i>Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)</i>	27
2.3.1.3. <i>Radical hidroxila (OH^-)</i>	27
2.3.2. <i>EROs e infertilidade</i>	28
2.3.3. <i>Mecanismos de defesas antioxidantes</i>	32
2.3.3.1. <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	33
2.3.3.2. <i>Catalase</i>	34
2.3.3.3. <i>Glutathione (GSH)</i>	35
2.3.3.4. <i>Glutathione redutase (GR)</i>	35
2.3.3.5. <i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	35
2.3.3. <i>Antioxidantes e infertilidade</i>	36
2.4. EFEITO DA NUTRIÇÃO NA FERTILIDADE DO MACHO.....	38
2.4.1. <i>Vitamina E</i>	39
2.4.1.1. <i>Relação da vitamina E com a fertilidade</i>	41
2.4.2. <i>Selênio</i>	44
2.4.2.1. <i>Relação do selênio com a fertilidade</i>	46
2.4.3. <i>Influência da interação entre vitamina E e selênio na fertilidade</i>	47
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Capítulo 1:	SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM VITAMINA E E SELÊNIO: INTEGRIDADE DA MEMBRANA ESPERMÁTICA E QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO DE TOUROS JOVENS DA RAÇA BRANGUS EM PASTEJO.....	59
1.	Introdução.....	61
2.	Material e Métodos.....	62
3.	Resultados e Discussão.....	66
4.	Referências.....	74
Capítulo 2:	INTEGRIDADE DA MEMBRANA ESPERMÁTICA E QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS JOVENS DA RAÇA BRANGUS SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E E SELÊNIO.....	78
1.	Introdução.....	80
2.	Material e Métodos.....	81
3.	Resultados e Discussão.....	85
4.	Referências.....	91
	CONCLUSÕES GERAIS.....	94

1. INTRODUÇÃO

O Brasil posiciona-se como detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, entretanto, os índices produtivos e reprodutivos ainda carecem de melhorias (GARCIA, 2004). Os agentes econômicos envolvidos no processo de produção e comercialização da carne bovina reconhecem os baixos índices de produtividade (CALEGARE, 2004), sendo que a baixa eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que pesam para esses baixos índices de produtividade, afetando assim a rentabilidade da pecuária (FRANCO, 2005).

Os parâmetros de eficiência reprodutiva são características de baixa herdabilidade, isso faz com que os componentes ambientais tenham maior impacto sobre o desempenho reprodutivo do que a seleção genética. Portanto, a eficiência reprodutiva de um rebanho é altamente influenciada pelo manejo e pelo ambiente. Dentre os fatores do ambiente que afetam a reprodução de bovinos, a nutrição é talvez o de maior impacto (SANTOS e SANTOS, 2003).

Uma nutrição inadequada, provocada por um desequilíbrio de nutrientes como vitaminas e minerais na dieta, pode afetar adversamente a função reprodutiva (DUNN e MOSS, 1992; SMITH e AKINBAMIJO, 2000), contudo os papéis específicos desses nutrientes em tecidos reprodutivos ainda não estão bem definidos. Alguns autores atribuem à importância de algumas vitaminas e minerais na reprodução por participarem de um sistema antioxidante, protegendo as células do estresse oxidativo, de danos de membrana e DNA (AITKEN et al., 1989; SIKKA, 1996; HATAMOTO, 2004).

O estresse oxidativo é definido como uma situação de desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gerando um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular (HALLIWELL, 1991; SIKKA, 1996).

Um dos fatores de maior importância no que diz respeito ao estresse oxidativo é a sua alta correlação negativa com a fertilidade, sendo assim um importante fator a ser controlado, uma vez que promove efeitos deletérios em espermatozoides, oócitos e embriões (NACHI, 2003; GONÇALVES, 2006).

Apesar das EROs serem produzidas durante o metabolismo normal do espermatozoide e exercerem papéis fundamentais na fertilidade do macho em processos como hiperativação

da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização, elas também podem causar severos danos ao espermatozóide, quando os seus mecanismos de defesa estão limitados (AITKEN, 1995).

As membranas dos espermatozóides possuem alta concentração de ácidos graxos insaturados e não contém antioxidantes em quantidades significativas devido à redução de seu citoplasma (SHARMA e AGARWAL, 1996). Logo, os espermatozóides são extremamente suscetíveis a elevadas concentrações de oxigênio, que induzem a peroxidação dos lipídios da membrana (JONES e MANN, 1977). Os efeitos das EROs no espermatozóide têm sido associados à perda de motilidade (AITKEN et al., 1989), modificação do citoesqueleto (HINDSHAW et al., 1986), diminuição na produção de ATP (SIKKA, 1996), inibição da interação oócito-espermatozóide (AITKEN et al., 1993) e perturbações da integridade genômica (AITKEN et al., 1998).

Vale ressaltar que o estresse oxidativo está relacionado com a diminuição da viabilidade espermática e da capacidade fecundante tanto do sêmen fresco quanto do sêmen criopreservado (BECONI et al., 1991).

A demanda por sêmen congelado vem aumentando no Brasil na última década devido ao uso cada vez mais intenso em programas de inseminação artificial e do maior emprego de biotécnicas como a transferência e a produção *in vitro* de embriões (OHASHI, 2001). Entretanto, durante o processo de criopreservação os espermatozóides estão sujeitos a inúmeras situações que comprometem sua viabilidade e fertilidade como a exposição a temperaturas não fisiológicas, danos osmóticos, desidratação e cristalização (HOLT, 2000). Além destas situações adversas, o estresse oxidativo é considerado como um dos principais responsáveis pelas injúrias causadas ao espermatozóide durante o processo de congelamento (WATSON, 2000).

Para prevenir ou reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante. Nesse contexto, a vitamina E e o Selênio desempenham papéis importantes, participando da estrutura ou como co-fatores de enzimas antioxidantes, como a glutathione redutase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (KOURY e DONANGELO, 2003).

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas plasmáticas (QUINN, 2004). Está disponível nos vegetais, pastos verdes e óleo de sementes, funcionando como antioxidante, na prevenção da propagação de radicais livres, sendo assim, tem seu efeito benéfico associado à redução do estresse oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999).

Assim como a vitamina E, o Selênio é um nutriente essencial para o organismo (MOREIRA et al., 2001). Suas funções metabólicas são a de captação de radicais livres e modulação do estresse oxidativo, funcionando como co-fator da enzima glutathiona peroxidase (FETTMAN, 2003; ALVAREZ e MORAES, 2006).

O efeito sinérgico da combinação da vitamina E com selênio na proteção de biomembranas frente aos ataques oxidativos tem sido motivo de discussão (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999). A inter-relação desse mineral com a vitamina E, reside no fato da vitamina E evitar a formação de peróxidos, porém, uma vez formados, somente o selênio, via glutathiona peroxidase, poderá inativá-los (LUCCI, 1997).

A suplementação oral com vitamina E e selênio tem sido utilizada como estratégia para o controle e prevenção do estresse oxidativo em humanos (KESSOPOULO et al., 1995; GEVA et al., 1996) e também em diferentes espécies animais como coelhos (CASTELLINE et al., 2002), aves (SURAI et al., 1998) e caprinos (XAVIER et al., 2008), entretanto os resultados obtidos são bastante controversos.

Na literatura não se tem encontrado informações sobre a influência desses nutrientes nos parâmetros reprodutivos de bovinos machos. Deste modo, objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros da raça Brangus, mantidos em pastejo no período seco do ano, sobre a integridade da membrana espermática, qualidade do sêmen fresco e criopreservado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coleta e avaliação de sêmen bovino

A coleta de sêmen é o procedimento que engloba o conjunto de operações realizadas para obtenção do ejaculado de um reprodutor (REICHENBACH et al., 2008). Uma coleta de sêmen realizada adequadamente e respeitando as características fisiológicas da espécie, é o primeiro passo para se obter o sucesso esperado no seu processamento tecnológico (OHASHI, 2001). Os três métodos mais comumente usados para coleta de sêmen em bovinos são: a massagem trans-retal, vagina artificial e eletroejaculação, visto que, cada método apresenta suas vantagens e desvantagens (DODE et al., 2004).

A massagem nas ampolas dos ductos deferentes, além de ser um dos métodos mais simples para obtenção de sêmen, não necessita de muitos equipamentos para sua execução (OHASHI, 2001; DODE et al., 2004). Entretanto, a amostra obtida é menos representativa da qualidade do sêmen do touro em relação aos outros dois métodos. O sêmen colhido dessa maneira usualmente apresenta menor concentração espermática do que as ejaculações obtidas com a vagina artificial (AX et al., 2004).

Amostras de sêmen coletadas com vagina artificial são provavelmente mais representativas da qualidade de sêmen de um touro, por ser o mais próximo do processo de monta natural. Além disso, este método permite ao veterinário avaliar com acurácia a libido, a capacidade de promover o coito e o volume do ejaculado do touro. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens incluindo a necessidade de um manequim, tempo para treinar um touro inexperiente, uma boa área disponível e risco para o operador, não sendo usada rotineiramente a campo (DODE et al., 2004).

Com o advento da técnica de eletroejaculação, tornou-se possível a avaliação de muitos reprodutores durante um único dia, sendo o método preferido, principalmente em condições de campo. Este método oferece maior segurança ao técnico durante a coleta de um animal inexperiente, além de não necessitar do uso de manequim. Porém, o volume do ejaculado não pode ser mensurado com segurança, o processo não é fisiológico como a coleta com a vagina artificial, e ainda é imprescindível o uso de um aparelho eletroejaculador (DODE et al., 2004).

A coleta através do método da eletroejaculação baseia-se na introdução via retal de uma probe com dois a três eletrodos, os quais emitirão pequenos estímulos elétricos na região nervosa responsável pela ereção e ejaculação (REICHENBACH et al., 2008). Geralmente, as

amostras de sêmen obtidas com eletroejaculador são de maior volume com menor concentração de espermatozóides (AX et al., 2004), em função do maior estímulo sobre as glândulas sexuais acessórias, levando-as a secretarem maior quantidade de plasma seminal, cujo estímulo pode atingir também a bexiga, podendo haver liberação de urina a qual será misturada ao sêmen, comprometendo a sua qualidade (OHASHI, 2001).

Além disso, o sêmen colhido por eletroejaculação apresenta maior grau de contaminação por bactérias e células de descamação do epitélio prepucial, em função da maioria dos animais ejacularem dentro da bainha prepucial. Adicionalmente, este método não permite avaliar uma das mais importantes características de um reprodutor, que é a libido sexual (OHASHI, 2001).

Apesar de todos esses fatores, a fertilidade e o número total de espermatozóides obtidos com a eletroejaculação, são equivalentes às amostras obtidas com a vagina artificial (AX et al., 2004).

Após a coleta deve-se proceder a avaliação do sêmen, pois é um dos importantes aspectos a ser observado no processamento tecnológico do sêmen, uma vez que através de uma criteriosa avaliação do sêmen obtêm-se dados quanto a qualidade do ejaculado, bem como, sobre a saúde reprodutiva do reprodutor (OHASHI, 2001). Na avaliação do sêmen observam-se vários parâmetros representativos de características físicas como o volume, cor, odor e aspecto do ejaculado, além das características microscópicas do sêmen como o turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (CBRA, 1998).

Dentre os aspectos físicos do sêmen, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são as características mais antigas para predizer a qualidade seminal em condições de campo. Estes parâmetros são de grande importância e podem revelar a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen associados ou não com alterações na espermiogênese (REICHENBACK et al., 2008). Apesar disso, os parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática têm se mostrado limitados quanto à capacidade de predizer o potencial de fertilidade de um touro, visto que, cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (SANTOS, 2003).

2.1.1 Testes funcionais que avaliam a integridade da membrana espermática

Além de parâmetros espermáticos convencionais utilizados na avaliação do sêmen, outros testes vêm sendo utilizados para identificar e avaliar os fatores que interferem na

manutenção de sua integridade física e funcional. Dentre estes testes funcionais estão: o teste de expansão hipo-osmótico; a coloração acrossomal simples; a coloração tripla e a coloração de eosina/nigrosina.

O teste de expansão hipo-osmótico é utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide e baseia-se no fato de que, quando o espermatozóide é exposto a condições hipo-osmóticas, ocorre ingresso de água através da membrana em esforço para restabelecer o equilíbrio osmótico. Este influxo de água aumenta o volume da célula espermática e com isso ocorre a dilatação da membrana plasmática. Como a cauda do espermatozóide é mais sensível a tais condições osmóticas, a apresentação de cauda enrolada é um sinal de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo, fato que demonstra uma integridade estrutural e atividade funcional normal (JEYENDRAN et al., 1984).

Já a coloração acrossomal simples é utilizada para avaliar a integridade estrutural da membrana acrossomal. Esta técnica consiste na mistura de uma alíquota de sêmen à igual quantidade do Corante Simples de Pope e preparo de esfregaço entre lâminas, que podem ser lidas em microscópio com interferência de fase ou convencional. A região acrossomal e pós-acrossomal do espermatozóide apresentam diferentes colorações de acordo com sua integridade (POPE et al., 1991).

A coloração de eosina/nigrosina permite avaliar a viabilidade espermática, uma vez que identifica os espermatozóides vivos e mortos. A eosina só é capaz de penetrar células com membrana plasmática lesada, caso dos espermatozóides mortos, corando-as em vermelho, sendo portanto um indicador da integridade da membrana (WHO, 1992).

A coloração tripla por sua vez, é utilizada para observar a reação acrossômica dos espermatozóides. Para realização desta técnica, três corantes são empregados: o Trypan Blue que diferencia vivos e mortos; o Rosa Bengala que cora apenas células com acrossoma intacto e o Bismarck Brown que cora a região pós-acrossomal de marrom servindo para aumentar o contraste e prevenindo colorações inespecíficas desta região pelo Rosa Bengala (HARAYAMA et al., 1993). Apesar do método trabalhoso e demorado, esta técnica apresenta correlações com métodos que utilizam corantes fluorescentes para detectar reação acrossômica e apresenta repetibilidade entre avaliadores (DODE et al., 2004).

Há também a possibilidade de se utilizar testes que possam avaliar a atividade mitocondrial (HRUDKA, 1987) e a integridade do DNA espermático (DONNELLY et al., 2000).

2.2 Criopreservação de sêmen bovino

O notável sucesso com o congelamento de sêmen bovino não tem sido alcançado por outros mamíferos como suínos, ovinos e outras espécies exóticas, sendo esses diferentes resultados explicados por duas fontes de variação: a fisiologia e bioquímica de seus espermatozoides, e variações na anatomia e fisiologia do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (HOLT, 2000).

O congelamento ou criopreservação é o método no qual se mantém o sêmen congelado em nitrogênio líquido a -196°C por tempo indeterminado, podendo ser transportado a qualquer distância para utilização com grande potencial de conservação, tornando este método a forma de armazenamento de eleição para a constituição de Banco de Recursos Genéticos (REICHENBACK et al., 2008).

A preservação espermática por congelamento compreende uma lacuna entre o período de suspensão da animação espermática e o processo que demarca a continuidade do desenvolvimento, que eventualmente conduz a fertilização (WATSON, 1995). Uma estocagem eficaz de sêmen no estado congelado implica em uma completa interrupção no processo de atividade das células espermáticas, que começam nos testículos e continuam através do epidídimo e após a ejaculação (DODE et al., 2004).

A criopreservação de sêmen ficou marcada por importantes avanços na década de 40, a partir da descoberta do glicerol como agente crioprotetor, e de lá para cá, as pesquisas obtiveram apenas melhoras relativas na técnica básica estabelecida (HOLT, 2000). Visto que mesmo as melhores técnicas atuais de preservação, alcançam em média, cerca de 10 a 50% de viabilidade da produção espermática, dependendo de vários fatores tais como, qualidade do ejaculado, método de congelamento e descongelamento, tipo de envasamento e o tipo de diluidor (OHASHI, 2001).

O tipo de diluidor usado compreende um aspecto fundamental para o sucesso da técnica. Entende-se por diluidores, soluções que têm por objetivo aumentar o volume do ejaculado, potencializando e preservando a capacidade fecundante do espermatozóide, protegendo-os durante o processo de congelamento (OHASHI, 2001). Os agentes que compreendem bons meios diluidores apresentam funções como, proporcionar nutrientes como fonte de energia, proteger contra o efeito deletério do resfriamento rápido, proporcionar um tampão para prevenir mudanças danosas de pH à medida que é formado ácido láctico, manter apropriada a pressão osmótica e o balanço eletrolítico, inibir crescimento bacteriano,

aumentar o volume de sêmen de modo que possa ser usado em múltiplas inseminações e proteger as células espermáticas durante o congelamento (AX et al., 2004).

O sêmen bovino é usualmente diluído com soluções de citrato-gema, leite integral homogeneizado, leite desnatado, leite de coco e solução de lactose. O sêmen tem sido diluído com bons resultados em diluentes baseados em tampão orgânico, Tris (hidroximetil aminometano) (HAFEZ, 2004).

Parâmetros como motilidade, vigor, aspecto e volume devem ser averiguados antes de se proceder a diluição do sêmen (OHASHI, 2001). De acordo com Reichenbach et al. (2008) as principais etapas da criopreservação de sêmen após a avaliação e diluição são: a refrigeração; adição do diluidor contendo o crioprotetor; identificação; envasamento; equilíbrio; congelamento e o armazenamento em nitrogênio líquido. O sêmen congelado deve ser conservado em botijão criogênico até o momento de sua utilização.

O processo de descongelamento de sêmen é dependente da forma (palhetas, ampolas) em que o sêmen foi envasado. Para garantir a qualidade é importante que o descongelamento ocorra em banho-maria à temperatura de 35 a 37°C por no mínimo 20 segundos para o sêmen envasado em palheta fina (0,25 mL) ou 30 segundos para palheta média (0,50 mL) (REICHENBACH et al., 2008). O tempo de descongelamento deve ser cuidadosamente controlado para evitar a morte das células por superaquecimento (HAFEZ, 2004).

2.2.1 Mecanismos de lesão celular durante o congelamento/descongelamento dos espermatozóides

A criopreservação de sêmen bovino aumenta a taxa de anormalidades espermáticas, reduzindo a longevidade dos gametas (EMERICK, 2007). Estima-se que durante o processo de criopreservação, a viabilidade espermática avaliada através da morfologia do acrossoma, motilidade, vigor e integridade de suas membranas sejam reduzidas em 50% (OHASHI, 2001).

Quando as células são congeladas, elas estão sujeitas a inúmeras situações de estresse que comprometem sua viabilidade como a exposição a temperaturas não fisiológicas, o estresse osmótico causado pelos elevados gradientes de concentração de solutos no meio diluidor, desidratação, alterações na membrana, formação e dissolução de cristais de gelo no meio intracelular e extracelular (HOLT, 2000).

Dentre as etapas do processo, é durante o período de resfriamento que os espermatozóides interagem com os componentes do meio diluente (gema de ovo, leite

desnatado, frutose) e adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (WATSON, 1995).

Quando os espermatozóides são submetidos ao choque térmico ocorre mudança irreversível que se caracteriza pela perda rápida da motilidade, movimento anormal, danos no acrossoma e na membrana plasmática. Estas alterações estão associadas à diminuição da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana, ruptura e perdas de seus arranjos celulares. Vale ressaltar que estas mudanças ocorrem durante a fase de transição, que se caracteriza pela passagem da membrana plasmática do estado líquido para o estado cristalino, devido à alteração na forma das moléculas de fosfolípidios induzidas pelo resfriamento (HOLT, 2000). Logo é imprescindível que o resfriamento seja feito de modo adequado.

Se os períodos de resfriamento e equilíbrio forem controlados, os espermatozóides, ao invés de sofrerem choque térmico sofrem modificações graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos, que conferem às células maior resistência durante o congelamento. Adicionalmente, os fosfolípidios do diluidor, interagem com os lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides conferindo-lhes maior resistência ao choque térmico e auxiliando na preservação da integridade celular durante a preservação do sêmen (WATSON, 1995).

Os eventos físicos que ocorrem nas células dependem da velocidade de congelamento. Quando as células são congeladas rapidamente, não há perda de água, promovendo com isso a formação de cristais de gelo intracelular, causando, conseqüentemente, lesões nas estruturas celulares, fato este que compromete a função celular. No entanto, quando o processo de congelamento é muito lento, ocorre congelamento da água extracelular com a conseqüente concentração de soluto, deixando as células momentaneamente em meio hipertônico, fazendo com que percam água rapidamente, o que induz o aumento na concentração de soluto intracelular, promovendo morte celular por desidratação. Logo, os principais danos celulares ocorridos durante a criopreservação são causados pela cristalização e desidratação (WATSON, 1995).

Além das lesões sofridas pela membrana plasmática durante o congelamento, também ocorrem danos durante o processo de reaquecimento da célula após o descongelamento, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas, e a passagem rápida para o interior da célula pode causar o rompimento das membranas (HOLT, 2000).

2.3 Estresse oxidativo

Outro importante fator a ser estudado, e que também está relacionado com a diminuição da viabilidade espermática e diminuição da capacidade fecundante tanto do sêmen fresco quanto do sêmen congelado é o estresse oxidativo. Espermatozóides de mamíferos são altamente susceptíveis aos danos induzidos pela alta concentração de oxigênio e adicionalmente a peroxidação lipídica (¹MAC LEOD, 1943 citado por BECONI et al., 1991).

O estresse oxidativo é causado por um desbalanço entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e sua eliminação por antioxidantes, ele danifica a estrutura das biomoléculas, lipídios, carboidratos, proteínas e DNA, além de outros componentes celulares (SIKKA, 1996; NICHI, 2003, GÓES, 2008). Em pesquisas com humanos e animais, o estresse oxidativo já foi identificado como causa de infertilidade (AITKEN et al., 1989; NICHI, 2003, SAID et al., 2004; HATAMOTO, 2004).

2.3.1 Radicais livres e espécies reativas ao oxigênio

Os primeiros estudos a respeito de radicais livres se deram por volta de 1924. No entanto, somente nos anos setenta, começaram surgir trabalhos relatando a importância dos radicais livres para os seres vivos, particularmente os aeróbicos (VANNUCHI et al., 1998).

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, podendo assim ser definido como qualquer espécie com elétron desemparelhado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). É justamente este não emparelhamento de elétrons da última camada, que confere alta reatividade e instabilidade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa como, luz, calor e radiação, ou energia resultada do próprio metabolismo, por reações catalisadas por metais ou enzimas. Essa energia ao atingir o átomo faz com que um elétron seja removido do seu orbital, formando assim um novo átomo contendo um elétron extra, denominado, radical livre, que para se tornar novamente estável, precisa liberar essa energia acumulada (BORGES, 2003).

¹MAC LEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *America Journal of Physiology*, v. 138, p. 512-518, 1943.

De acordo com Ferreira e Matsubara (1997) radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria eles são derivados do metabolismo do O_2 , o ideal é referir-se a eles como espécies reativas ao oxigênio (EROs).

O organismo produz naturalmente EROs e outras espécies oriundas do oxigênio pelo próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Baixas concentrações de EROs são importantes para processos bioquímicos normais como na sinalização e no controle do crescimento celular, no ataque de patógenos invasores, na síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclooxigenases, lipoxigenases pelo nucleotídeo (formação de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos), e na detoxificação de substâncias estranhas. Porém, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras (BORGES, 2003).

Portanto, pequenas quantidades de EROs são constantemente geradas e encontradas em todos os sistemas biológicos. Segundo Sikka (1996) as EROs que apresentam implicações na biologia reprodutiva são: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peroxil (LOO^-) e o radical hidroxila (OH^-).

2.3.1.1 Ânion superóxido (O_2^-)

O ânion superóxido é formado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, ou seja, após a primeira redução do O_2 . Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas, e é produzido durante a ativação máxima de células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos, quando estes se encontram com partículas estranhas ou imuno complexos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

O superóxido não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas lipídicas e rapidamente desaparece em soluções aquosas, gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio após a ação da enzima dismutase (GUTTERIDGE, 1995).

Outro papel importante do superóxido é a reação com íons metálicos (Cu^{2+} e Fe^{3+}), formando novos íons (Cu^+ e Fe^{2+}) participantes da formação de moléculas do radical hidroxila, que é uma importante espécie reativa do oxigênio (VANNUCCHI et al., 1998).

2.3.1.2 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo e não é considerado um radical livre, já que, não possui elétrons desemparelhados em sua última camada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

Ele é considerado um fraco agente oxidante e redutor, sendo relativamente estável na ausência de metais de transição. Porém, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois tem vida longa, podendo se difundir facilmente através das membranas celulares, além de participar da reação que produz o radical hidroxila. As propriedades redutoras do peróxido de hidrogênio e sua facilidade reativa na presença de metais de transição (Ferro, Cobre) levaram à evolução dos sistemas de defesa do organismo. Nesse caso, a remoção do H₂O₂ ocorre através da ação das enzimas catalase, glutathione peroxidase e certamente outras peroxidases (GUTTERIDGE, 1995).

2.3.1.3 Radical hidroxila (OH⁻)

O radical hidroxila é extremamente agressivo, sendo considerado a forma mais reativa em sistemas biológicos (GUTTERIDGE, 1995). Este radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe²⁺ ou Cu⁺). A simples mistura do peróxido de hidrogênio com um ferro leva a formação do radical hidroxila (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

O radical hidroxila reage de forma constante e rápida com quase todos os tipos de moléculas celulares como açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, base de DNA e ácidos orgânicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

A combinação extremamente rápida da hidroxila com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzida confirma sua alta reatividade. Assim, se este radical for produzido próximo ao DNA, e este DNA estiver fixado a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

É muito importante ressaltar que o radical hidroxila também pode iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, processo denominado de peroxidação lipídica (GUTTERIDGE, 1995). Isso ajuda explicar a associação das EROs com os danos causados aos espermatozóides e conseqüentemente com alguns problemas de fertilidade.

2.3.2 EROs e infertilidade

A membrana que rodeia as células e organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelas EROs em decorrência da peroxidação dos lipídios (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O processo de peroxidação lipídica é composto basicamente por três fases: 1) Iniciação: quando as EROs se ligam às duplas ligações de ácidos graxos insaturados presentes na membrana formando os radicais oxil (LO^{\cdot}) e peroxil (LOO^{\cdot}); 2) Propagação: os radicais oxil e peroxil formados reagem com os ácidos graxos poliinsaturados intactos presentes na membrana e, 3) Terminação: Lesão de toda membrana (BUETTNER, 1993).

A peroxidação lipídica acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, promovendo perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (GUTTERIDGE, 1995; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Extensos danos às proteínas, modificações no citoesqueleto, alterações mitocondriais, danos estruturais do DNA, perda da integridade de membrana, e inativação de enzimas têm sido correlacionadas com a formação de radicais livres de oxigênio ligados à lipídeos (JONES e MANN, 1977; BECONI et al., 1991; SHARMA e AGARWAL, 1996; AITKEN et al., 1998).

De acordo com Nichi (2003) um dos fatores de maior significância no que diz respeito ao estresse oxidativo é a sua alta correlação negativa com a fertilidade. Em sua revisão o referido autor ressalta que em humanos, vários estudos associam a produção ou presença de EROs com prejuízos na função espermática.

O efeito prejudicial das EROs sobre o espermatozóide foi sugerido por ²Macleod (1943) citado por Valença e Guerra (2007), o qual demonstrou que a exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica. A oxidação espermática é acompanhada por alterações estruturais, principalmente na região acrossômica, e alterações no metabolismo espermático com diminuição na motilidade e perda de constituintes intracelulares (JONES e MANN, 1977; AITKEN et al., 1989).

²MAC LEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *America Journal of Physiology*, v. 138, p. 512-518, 1943.

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado, porém, resultados convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica, sejam processos oxidativos ou regulados por redução (NICHI, 2003).

Segundo Sharma e Agarwall (1996) os espermatozóides são susceptíveis a danos peroxidativos, pois além da alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática, possuem baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma.

O citoplasma é um sítio que se caracteriza por possuir uma abundante atividade antioxidante, porém, durante a espermatogênese se perde uma grande proporção deste componente celular (VILLA-ARCILA e CEBALLOS-MARQUEZ, 2007).

De acordo com revisão realizada por Alvarez e Moraes (2006) a produção espermática de EROs no homem ocorre principalmente por células morfológicamente anormais, e dentre estas, especialmente células que possuem gota proximal e distal. Sendo assim, acredita-se que a presença desse citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerarem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que serviria como fonte de elétrons para produção de EROs.

Said et al. (2004) verificaram que a formação do ânion superóxido foi significativamente maior ($p < 0,05$) em pacientes inférteis quando comparados com pacientes saudáveis. Os autores observaram também que a formação deste mesmo radical livre foi negativamente correlacionada com concentração espermática ($r = -0,75$; $p < 0,05$), porcentagem de células morfológicamente normais ($r = -0,78$; $p < 0,05$) e motilidade espermática ($r = -0,69$, $p < 0,05$).

De acordo com De Lamirande e Gagnon (1995) fatores relacionados com a redução na fluidez da membrana plasmática como diminuição na fosforilação de proteínas do axonema e a imobilização do espermatozóide, são os principais danos causados pelas EROs que afetam a motilidade espermática.

Segundo Sikka (1996) a perda da motilidade pode ser decorrente da rápida perda de ATP intracelular, o aumento de alterações morfológicas de peça intermediária com efeitos deletérios sobre a capacitação espermática e reação do acrossoma também foram relatados.

Outro importante fator que também provocaria diminuição na motilidade espermática seria a difusão de H_2O_2 na célula, através das membranas mitocondrial e/ou plasmática, inibindo a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que controla o fluxo de glicose, a qual é responsável por controlar a disponibilidade de NADPH (NICHI, 2003).

Amostras de sêmen mais susceptíveis ao estresse oxidativo podem apresentar danos na mitocôndria, que ao disponibilizarem maior quantidade de EROs no meio extracelular potencializarão a cadeia oxidativa, que conseqüentemente, danificará o material genético. Além disso, o rompimento das mitocôndrias promove a liberação de fatores pró-apoptóticos (BARROS, 2007).

De acordo com Aitken e Krauz (2001) os danos na membrana plasmática do espermatozóide ocasionados pelo estresse oxidativo podem impedir a fertilização. No entanto, estes mesmos autores citam que se houver baixo nível de estresse oxidativo a fertilização poderá ocorrer, desde que haja a reparação nas fragmentações do DNA, mesmo no oócito, o qual possui mecanismos de reparos, antes do início da primeira clivagem.

Aitken et al. (1989) encontraram relação inversa entre a geração de EROs em amostras de espermatozóides humanos e a capacidade de fusão entre espermatozóide e oócito. Com base nos resultados, os autores sugeriram que a peroxidação lipídica é iniciada com a formação de ânion superóxido, pelo espermatozóide, que oprime o sistema da superóxido dismutase, criando então condições para a geração do radical hidroxila via reação Haber-Weiss.

Além da excessiva produção de EROs por espermatozóides normais, a presença de leucócitos no sêmen, que pode ser causada por uma possível infecção/inflamação geniturinária, tem sido identificada com uma das causas de infertilidade masculina (SIKKA, 1996).

Alterações patológicas severas no tecido testicular também estão associadas com alto nível de peroxidação lipídica. Koksall et al. (2003) sugerem que o excesso na produção de EROs, pode desenvolver importante papel nos mecanismos de degeneração testicular associados com a infertilidade. A diminuição da capacidade antioxidante do plasma seminal, aliada a essa produção excessiva de EROs, são fatores que estão associados com a varicocele, expressando distúrbios na função espermática e infertilidade (HENDIN et al., 1999).

Zalata et al. (2004) em estudo realizado com humanos, encontraram significativa correlação negativa ($r = -0,89$; $p < 0,001$) entre o estresse oxidativo e a atividade da acrosina, uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar a zona pelúcida do oócito e com função vital nos processos de fertilização e reação acrossômica. Estes mesmos autores relatam que, a presença do estresse oxidativo em um indivíduo com leucocitoespermia e/ou parâmetros seminais anormais estão associados com danos prejudiciais na função espermática, mensurados através da atividade da acrosina.

Espermatozoides de homens inférteis apresentam maior nível na produção do ânion superóxido na presença de NADPH exógeno, quando comparados com homens férteis sendo que, a habilidade do espermatozóide em gerar o O_2^- aumenta, à medida que, a qualidade do sêmen diminui (SAID et al., 2004).

Nallella et al. (2005) verificaram se pacientes com fator de infertilidade masculina (MFI) poderiam ser identificados com maior acurácia através de uma avaliação por escore de qualidade seminal. Os autores observaram que os níveis de EROs foram significativamente maiores ($p < 0,001$) em pacientes com fator de infertilidade masculina. O escore de qualidade seminal foi negativamente correlacionado com os níveis de EROs ($r = -0,45$, $p < 0,001$) e com o fator de infertilidade masculina ($r = -0,36$, $p < 0,001$).

Alguns autores trabalhando com animais também encontraram relação entre estresse oxidativo e qualidade espermática. Surai et al. (2000) em experimento realizado com sêmen de patos, encontraram alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos espermatozoides desta espécie. Além disso, segundo os autores, a composição desses ácidos graxos é fator determinante na fertilidade.

Hatamoto et al. (2006) submeteram cães da raça Rotweiller a uma condição de estresse através de consecutivas aplicações de dexametasona e observaram que nesses animais, houve um aumento do estresse oxidativo das células espermáticas, representado através da maior produção de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), que é um índice que mede o nível de peroxidação lipídica, indicando que o estresse sofrido pelos animais por meio de alterações fisiológicas, promove o aumento na produção de EROs, um dos causadores do estresse oxidativo (SIKKA, 1996).

Nichi (2003) comparando touros das raças (Nelore e Simental) em duas estações do ano (verão e inverno), não encontrou diferença nas variáveis motilidade, defeitos menores e totais. Porém, este autor observou efeito da estação do ano e da raça, uma vez que durante o verão ocorreu aumento na quantidade de defeitos maiores e malondialdeído (MDA – produto da peroxidação lipídica, utilizado como índice para avaliar estresse oxidativo) apenas no sêmen dos touros da raça Simental. Sugerindo que houve maior nível de estresse oxidativo nos animais de origem européia criados a campo em clima tropical em relação aos indianos, provavelmente relacionado a uma produção excessiva de EROs sem a devida compensação dos mecanismos antioxidantes. O autor também encontrou uma correlação positiva ($r = 0,39$; $p = 0,0035$) entre o estresse oxidativo e formas anormais da cabeça do espermatozóide.

O estresse oxidativo também está relacionado com a diminuição na qualidade de sêmen processado ou criopreservado. Técnicas rotineiramente utilizadas no processamento de

sêmen que promovem a remoção do plasma seminal, estão associadas à formação de EROs e ao aumento de danos causados ao DNA, indicando a importante função protetora exercida pelo plasma (POTTS et al., 2000).

Beconi et al. (1991) sugerem que a oxidação dos fosfolípidios de membrana pode ser responsável pela diminuição do tempo de vida do espermatozóide na fêmea, bem como pela diminuição da qualidade de sêmen fresco ou congelado utilizado para inseminação artificial.

Barros (2007) relata que o resfriamento de sêmen também pode submeter os gametas ao estresse oxidativo.

2.3.3 Mecanismos de defesas antioxidantes

De acordo com ³Halliwell e Gutteridge (1989) citados por Gonçalves (2006) antioxidante pode ser definido como qualquer substância que estando presente em baixas quantidades, quando comparada com substratos oxidáveis, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato.

São características desejáveis às moléculas antioxidantes: apresentarem menor energia de ativação que as moléculas oxidáveis, baixa capacidade de perder ou ganhar elétrons e de reagir com o oxigênio, possuir atividade antioxidante mesmo em pequenas quantidades e serem recicladas direta ou indiretamente por sistemas enzimáticos (BUETTNER, 1993).

Segundo Nordberg e Arnér (2001), o sistema antioxidante celular pode ser dividido em sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático de proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica é composto basicamente por três enzimas: a glutationa peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (AITKEN et al., 1996; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Já o sistema de proteção de membranas não enzimático é composto basicamente pelas vitaminas E (tocoferol) e C (ascorbato), que são capazes de recuperar os radicais oxidados e assim impedir a cascata oxidativa (BUETTNER, 1993), além de vitamina A, piruvato, glutationa, taurina e hipotaurina (AGARWALL e ALLAMENI, 2004).

De acordo com Ferreira e Matsubara (1997) os sistemas de proteção podem atuar de diferentes formas. Uma delas atuando como detoxificador do agente oxidante antes que ele ocasione lesão celular, constituída pela glutationa reduzida (GSH), catalase, SOD, GPx e a

³HALLIWEL, B.; GUTTERDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2th ed., Clarenton Press, Oxford, 1989.

vitamina E. A outra forma de defesa repara a lesão já ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathione redutase (GR), pela GPx, entre outros.

Vale ressaltar que com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular, no citoplasma das células somáticas. No entanto, o espermatozóide, durante o processo de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, perdendo assim parte dos seus mecanismos endógenos de reparo e suas defesas enzimáticas (DONNELLY et al., 1999). Contudo ele é protegido do ataque oxidativo pelo plasma seminal que contém enzimas e moléculas antioxidantes (LEWIS et al., 1997; HSU et al., 1998; DONNELLY et al., 1999).

As enzimas que participam desse mecanismo de proteção, também estão presentes no plasma seminal e nos espermatozoides dos animais, sendo que em bovinos as enzimas encontradas no plasma seminal foram a GPx, SOD e a catalase, esta última em baixo nível. Já nos espermatozoides foram encontradas a SOD e baixos níveis de GPx (⁴BILODEAU et al., 2000 citados por BORGES, 2003).

2.3.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

Foi descoberto em 1968 uma proteína do eritrócito capaz de remover cataliticamente os radicais superóxidos. Esta proteína recebeu o nome de enzima superóxido dismutase (VANNUCCHI et al., 1998). A SOD é uma metaloenzima que nos sistemas eucariontes está presente de duas formas. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que a SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

De acordo com Sikka (1996) a SOD exerce papel importantíssimo, já que espontaneamente catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido (O_2^-) formando assim O_2 e H_2O_2 (Figura 1).



Figura 1 – Reação da dismutação do ânion superóxido pela ação da superóxido dismutase.

⁴BILODEAU, J.F.; SUVRO-CHATTERJEE, SIRARD, M. A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

A decomposição do radical O_2^- ocorre naturalmente, porém por ser uma reação de segunda ordem necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O_2^- , de modo que há necessidade de uma maior concentração desse radical. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas e permitindo a eliminação do O_2^- mesmo em baixas concentrações. Desse modo, a SOD converte um radical altamente reativo (O_2^-) em outro menos reativo (H_2O_2) (BARREIROS e DAVID, 2006).

De acordo com Machlin (1984) a SOD é encontrada em altas concentrações nos testículos e no sêmen.

2.3.3.2. Catalase

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática presente nos principais órgãos e tem sua atividade dependente do NADPH. É uma das enzimas mais eficientes do sistema de defesa antioxidante (VANNUCCHI et al., 1998).

A catalase tem como sua principal função catalisar a reação que transforma duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de água em uma de oxigênio (SIKKA, 1996) (Figura 2). Apesar de ser considerado fraco, o H_2O_2 possui propriedades que o tornam altamente deletério, como sua facilidade em se difundir através das membranas celulares, além de participar da reação que forma o radical hidroxila (GUTTERIDGE, 1995).

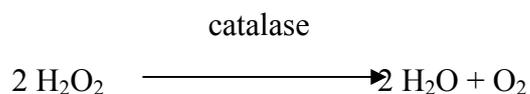


Figura 2 - Reação de conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Outro papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. E para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

2.3.3.3. Glutationa (GSH)

A glutaciona é um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existente no organismo em suas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos importantes processos biológicos (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Está presente em todas as células vivas aeróbicas, e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Serve para destoxificar compostos via conjugação em reações catalisadas pela glutaciona S-transferase ou diretamente, como é o caso com o peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela GPx (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Logo, a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, pois participa da destoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação.

2.3.3.4. Glutaciona redutase (GR)

A glutaciona redutase é uma flavoproteína dependente da NADPH e sua função pode ser prejudicada pela deficiência de glicose (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Após a exposição da GSH ao agente oxidante ocorre sua oxidação a GSSG (glutaciona oxidada ou glutaciona dissulfeto). A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, sendo esta uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

2.3.3.5. Glutaciona peroxidase (GPx)

A GPx é encontrada em muitos tecidos de origem animal. É uma metaloenzima que faz parte do sistema glutaciona e dentre os vários tipos que podem ser identificadas estão: celular, extracelular (plasmático) e glutaciona fosfolípide hidroperóxido peroxidase (CEBALLOS e WITTWER, 1996; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

A família das enzimas glutacionas peroxidases pode ser dividida em dois grupo: um grupo das selênio independentes e outra das selênio dependentes. A GPx selênio dependente catalisa a redução do H_2O_2 e outros peróxidos lipídicos pela GSH, a qual é usada como substrato, levando a formação de GSSG e água. Esse processo catalítico é diretamente dependente da redução da GSSG pela GR. Assim, a GPx mantém a continuidade do processo

de redução da GSH e sua subsequente regeneração via GR (SIKKA, 1996; VANNUCCHI et al., 1998; NORDBERG e ARNÉR, 2001) (Figura 3).

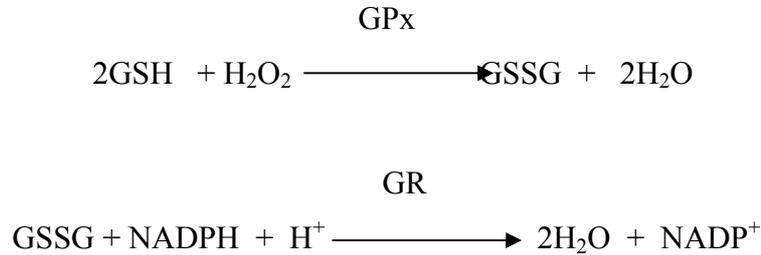


Figura 3 – Mecanismo de ação da glutatona peroxidase e glutatona redutase.

A GPx é vital para a proteção da membrana lipídica do espermatozóide, para que não sofra peroxidação pelos radicais livres, que causam a ruptura da membrana e morte do espermatozóide (CARVALHO et al., 2003).

A atividade da GPx em diferentes tecidos é um indicador do balanço nutricional de selênio, já que este mineral é um componente da estrutura protéica desta enzima (VILLA-ARCILLA e CEBALLOS-MÁRQUEZ, 2007).

2.3.4 Antioxidantes e fertilidade

Há ainda muitas controvérsias sobre a importância de cada uma das enzimas antioxidantes nos danos causados pelo estresse oxidativo no sêmen e neste contexto vários estudos foram realizados.

Lewis et al. (1997) compararam antioxidantes presentes no espermatozóide e no plasma seminal de homens férteis e inférteis e verificaram que no plasma seminal há maior concentração dos antioxidantes ascorbato, urato e antioxidantes do grupo tiol. Já no espermatozóide os antioxidantes do grupo tiol foram os mais encontrados.

Pasqualotto et al. (2006) observaram que a atividade da SOD e catalase mostrou-se menor nos pacientes inférteis comparando-se com pacientes férteis e encontraram correlação significativa entre a SOD e a catalase ($r=0,461$; $p=0,0001$), evidenciando que a diminuição na atividade destas duas enzimas está associada com infertilidade. Também foi encontrada correlação entre os níveis de SOD ($r=0,434$; $p=0,012$) e catalase ($r=0,395$; $p=0,001$) com a morfologia espermática, sugerindo que os espermatozóides alterados morfologicamente

possuem alta capacidade em produzir EROs, resultado de níveis reduzidos de enzimas antioxidantes.

Em trabalho realizado por Aitken et al. (1996) a atividade da SOD foi negativamente correlacionada com os parâmetros de movimento espermático ($r = -0,554$; $p < 0,001$) e com a capacidade de fusão do espermatozóide com o oócito ($r = -0,584$; $p < 0,001$), e positivamente correlacionada com a indução de danos peroxidativos ($r = 0,545$; $p < 0,05$). Estes autores verificaram que altos níveis da SOD estavam associados à função espermática alterada devido à alta susceptibilidade dos espermatozoides aos efeitos citotóxicos do H_2O_2 , e associados a erros na espermatogênese com esfoliação de células germinativas e retenção do excesso residual do citoplasma.

Dandekar et al. (2002) observaram que a catalase não apresentou mudanças significativas em diferentes amostras patológicas (oligospermia, azoospermia e astenozoospermia) de sêmen de humanos. Em contrapartida, as enzimas SOD ($p < 0,01$) e GPx ($p < 0,05$) se correlacionaram positivamente com amostras de sêmen de pacientes com astenozoospermia, indicando que o aumento na atividade dessas enzimas nos casos patológicos pode ser uma tentativa de inativar as EROs.

Já Miesel et al. (1997) não detectaram diferenças nos níveis da SOD no plasma seminal de homens inférteis ($p < 0,05$), porém em relação à catalase, relataram que sua deficiência pareceu estar associada com casos de patologia espermática combinada, como oligoastenoteratozoospermia.

Em experimento realizado com bovinos, Beorlegui et al. (1997) encontraram uma alta correlação entre a motilidade e os níveis de SOD ($r = 0,92$; $p < 0,05$), indicando que os touros com maior motilidade também foram os que apresentaram os maiores níveis da enzima SOD. Foi encontrada também, correlação negativa entre os níveis de TBARS e os níveis de SOD ($r = -0,74$; $p < 0,05$), sugerindo que quanto maiores os níveis da SOD, menores são os índices de peroxidação lipídica.

Nichi (2003) encontrou uma correlação negativa entre os níveis de SOD e a porcentagem de defeitos primários no sêmen de touros ($r = 0,3071$, $p = 0,0115$), indicando assim que as amostras com maiores níveis de SOD apresentavam menores porcentagens de defeitos ligados à espermatogênese.

Efeitos benéficos da administração de antioxidantes foram encontrados por Suzuki e Sofikitis (1999). Estes autores analisaram o efeito da administração intra-abdominal de taurina, catalase e SOD em ratos com varicocele induzida, e seus resultados indicaram que

todos esses antioxidantes foram favoráveis à preservação das funções testiculares e ao processo de maturação dos espermatozoides do epidídimo.

2.4 Efeito da nutrição na fertilidade do macho

Problemas na espermatogênese podem ser resultantes das mais variadas causas como as doenças sistêmicas, defeitos genéticos, infecções, substâncias tóxicas e principalmente a nutrição (GASVANI et al., 2000). A nutrição e sua relação com a reprodução demandam uma atenção especial. A reprodução não é um processo necessário para a sobrevivência, portanto, a atividade reprodutiva cessa a partir da deficiência de nutrientes para o organismo animal (DUNN e MOSS, 1992).

De uma maneira geral, animais mal nutridos apresentam desempenho reprodutivo insatisfatório. No Brasil, uma das principais razões do baixo desempenho produtivo e reprodutivo é a baixa disponibilidade de alimento e o inadequado manejo nutricional. (SANTOS e SANTOS, 2003) As forrageiras tropicais raramente contêm, em quantidades adequadas todos os nutrientes essenciais ao bom desempenho reprodutivo dos bovinos, sendo necessária uma correta suplementação (SANTOS e SANTOS 2003; CARVALHO et al., 2003).

Há evidências que sugerem que a influência da nutrição no processo reprodutivo é mediada por efeitos dos constituintes da dieta no eixo hipotalâmico-hipofisário. Apesar de haver algumas indicações que alterações na dieta podem afetar diretamente os testículos (BROWN, 1994). De acordo com Dode et al. (2004) o crescimento testicular é o mais prejudicado pela nutrição desequilibrada, provocando redução no desenvolvimento dos túbulos seminíferos e diferenciação das células primordiais, retardando a funcionalidade testicular e produção espermática. ⁵Nolan et al. (1990) citados por Dunn e Moss (1992) verificaram queda na motilidade espermática, retardo no crescimento testicular, redução no tamanho das células de Leydig, túbulos seminíferos menores, redução na concentração sérica de testosterona e nos tecidos testiculares em touros subnutridos quando comparados aos animais alimentados adequadamente.

⁵NOLAN, C. J.; NEUENDORFF, D. A.; GODFREY, R. W.; HARMS, P. G.; WELSH JÚNIOR, T. H.; MCARTHUR, N. H.; RANDEL, R. D. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 4, p. 1087-1096, 1990.

Alguns regimes alimentares podem afetar o volume do ejaculado e a atividade dos andrógenos sem necessariamente afetar a espermatogênese, sugerindo que certos constituintes da dieta podem influenciar a produção e/ou a secreção de LH e FSH (BROWN, 1994).

Segundo Pires e Ribeiro (2006) o baixo consumo de energia está associado ao atraso na idade à puberdade, redução na libido e queda na produção de espermatozóides. Quando o animal não consome energia suficiente para atender sua necessidade nutricional, o resultado é o quadro conhecido como balanço energético negativo (Pires e Ribeiro, 2006). Uma diminuição dos pulsos de LH ocorre como consequência direta da diminuição da secreção de GnRH durante o balanço energético negativo (MAGGIONI et al., 2008).

⁶Rekwot et al. (1988) citados por Dunn e Moss (1992) observaram que a restrição de proteína bruta em dieta isoenergética produziu efeitos similares aos da restrição energética.

Além de energia e proteína, outros nutrientes como vitaminas e minerais também podem afetar as funções reprodutivas (DUNN e MOSS, 1992). Os elementos minerais estão presentes em todas as células e tecidos corporais em uma grande variedade de funções, entre elas: estrutural, fisiológica, catalítica e reguladora, sendo que as concentrações destes elementos variam de acordo com o tecido animal e de maneira geral, são mantidos dentro de limites estreitos para a atividade funcional e integridade dos tecidos, a fim de manterem satisfatórios o crescimento, saúde e produtividade animal (CARVALHO et al., 2003).

Alguns minerais e vitaminas têm sido implicados nos processos reprodutivos em bovinos. Tem sido mostrado que nutrientes como vitamina E e selênio possuem propriedades antioxidativas, e podem reduzir a incidência de distúrbios reprodutivos, melhorando o desempenho animal (SANTOS e SANTOS, 2003).

De acordo com revisão realizada por Smith e Akinbamijo (2000) disfunções nos processos de síntese de esteróides, secreção de prostaglandinas, motilidade espermática, e desenvolvimento embrionário podem estar ligados à condições de deficiência de vitamina E e selênio.

2.4.1 Vitamina E

A vitamina E é conhecida como um nutriente essencial para a reprodução desde 1922, todavia, muitos pontos ainda precisam ser esclarecidos a respeito de seus mecanismos e funções fisiológicas (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999).

⁶REKWOT, P. I.; OYEDIPE, E. O.; AKEREJOLA, O. O.; KUMI-DIAKA, J. The effect of protein intake on body weight, scrotal circumference and semen production of Bunaji bulls and their Friesian crosses in Nigeria. *Animal Reproduction Science*, v. 16, p. 1-11, 1988.

A vitamina E natural engloba dois potentes grupos com componentes lipossolúveis, que são os tocoferóis e tocotrienóis, sendo que cada um deles possui os análogos α , β , γ e δ (RICCIARELLI et al., 2001). Logo, o termo vitamina E designa 8 isômeros, ou seja, compostos químicos diferentes, porém com a mesma função biológica. Todos esses isômeros possuem um anel cromonol e uma cadeia lateral em sua estrutura. E tanto os tocoferóis como os tocotrienóis podem se apresentar nas mais variadas formas, sendo diferenciados de acordo com o número e a posição do grupo metil no anel cromonol (MACHLIN, 1984).

Todos os análogos da vitamina E estão amplamente distribuídos na natureza, disponíveis nos vegetais e sementes de oleaginosas (RICCIARELLI et al., 2001). Entre esses análogos, o α tocoferol é a forma mais abundante na natureza, além de ser a que apresenta maior atividade metabólica e biológica no organismo (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999).

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel presente nas membranas celulares e lipoproteínas. Apesar de sua relativa baixa concentração, se comparada aos outros fosfolipídios de membrana, acredita-se que a vitamina E desempenhe um importantíssimo papel na manutenção da integridade das membranas. Entre suas principais funções está sua habilidade em proteger os lipídios poliinsaturados da membrana contra a oxidação e a formação de complexos entre a vitamina E e produtos da hidrólise lipídica da membrana como os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres, formando assim complexos que tendem a promover a estabilização das membranas (QUINN, 2004).

A vitamina E é provavelmente o mais importante inibidor da reação em cadeia da peroxidação lipídica (HALLIWEL, 1991). Ligado à porção hidrofóbica desta molécula existe um grupo hidroxila (OH) em que o átomo H é facilmente removível, quando os radicais livres estão presentes combinam-se preferencialmente a esta molécula, formando o radical tocoferol-O, que por possuir baixa reatividade, não inicia reações em cadeia e conseqüentemente a peroxidação lipídica (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Por esse motivo o α -tocoferol é conhecido como um antioxidante que interrompe as reações em cadeia de se propagarem nas membranas lipídicas.

Para entender o mecanismo antioxidante da vitamina E, é preciso que se conheça as etapas da reação em cadeia. O ânion superóxido (O_2^-) interage com íons hidrogênio e, através da SOD produz o H_2O_2 , que por sua vez pode se difundir facilmente pelas membranas celulares. Então a GPx, enzima selênio dependente, destrói o H_2O_2 na membrana, sendo este

radical substituído em sua grande parte. Porém, algum H_2O_2 remanescente, poderá reagir com o O_2^- e desencadear a formação do radical OH^- , o qual pode reagir com o tocoferol localizado na membrana da célula. Caso a concentração de tocoferol seja insuficiente para se ligar ao radical OH^- produzido, esse radical extremamente reativo irá então iniciar a peroxidação dos lipídios da membrana celular (MACHLIN, 1984).

O tocoferol após reagir com o radical oxidante passa por um mecanismo de regeneração sinérgico, intermediado ou pelo ácido ascórbico (vitamina C) ou pela glutathiona reduzida, com posterior formação de um ascorbato ou da glutathiona oxidada. (MACHLIN, 1984).

Além das funções de antioxidantes, ou seja, de estabilização de membranas, uma variedade de outras ações têm sido atribuída à vitamina E. ⁷Ricciarelli et al. (2002) citados por Quinn (2004) incluem processos de sinalização celular e expressão gênica como: a regulação da taxa de transcrição de genes que codificam o CD 36, o α -tocopherol proteína transferase (α -TTP), α -tropomiosina e colagenase; a inibição da proliferação celular, da agregação plaquetária e da adesão monocitária; a inibição da proteína quinase C e da 5-lipoxigenase; a ativação da fosfatase A2 e da diacilglicerol (DAG) quinase; entre outros. Estes efeitos não estão relacionados à atividade antioxidante da vitamina E, embora uma parte deles sejam resultados de interações específicas da vitamina E com componentes da célula, como proteínas, enzimas e membranas (QUINN, 2004).

É importante ressaltar que o requerimento de vitamina E para bovinos de corte em crescimento e terminação varia entre 50 a 100 UI de vitamina E/dia (NRC, 1996).

2.4.1.1 Relação da vitamina E com a fertilidade

Alguns trabalhos objetivaram avaliar a influência da vitamina E no *status* reprodutivo. Segundo Machlin (1984) esta vitamina atua protegendo as células do estresse oxidativo, dos danos de membrana e do DNA, e a sua deficiência provocaria inibição na espermatogênese.

Geva et al. (1996) estudaram a possível influência da suplementação oral com vitamina E (200 mg/dia) durante três meses no sêmen e na taxa de fertilização de humanos com espermogramas normais, porém que obtiveram baixas taxas em programas de Fecundação *in vitro* (FIV) anteriores. Após um mês de tratamento, os autores observaram que

⁷RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. The 80th anniversary of vitamin E: Beyond its antioxidant properties. **Journal of Biological Chemistry**, n. 383, p. 457-465, 2002.

os níveis de malondialdeído (MDA) reduziram significativamente ($p < 0,01$) e as taxas de fertilizações por ciclo aumentaram significativamente ($p < 0,05$) associando essa melhora à diminuição no potencial de peroxidação lipídica.

Kessopoulou et al. (1995) avaliaram os efeitos da suplementação oral com vitamina E (600mg/dia) em pacientes com disfunções espermáticas resultantes da produção de altos níveis de EROs no sêmen e observaram aumento no nível sérico da vitamina E após o tratamento ($p = 0,04$) acompanhado de melhoria significativa na função espermática avaliada pelo teste de penetração na zona pelúcida ($p = 0,04$). Apesar disso, não foram demonstradas diferenças significativas nos níveis de formação de EROs antes ou após o tratamento, sugerindo que a vitamina E não influencia na geração destas espécies reativas, e sim, atua na quebra da reação em cadeia da peroxidação lipídica, oferecendo proteção aos componentes da membrana.

Eskenazi et al. (2005) estudaram a associação entre o consumo de antioxidantes e a qualidade seminal em humanos e encontraram relação positiva entre o consumo de vitamina E com a motilidade progressiva ($p = 0,04$) e com o total de espermatozóides com motilidade progressiva ($p = 0,05$), o qual é definido como o produto entre o total de espermatozóides contados e a porcentagem com motilidade progressiva.

O nível de suplementação, ou seja, a quantidade de vitamina E fornecida na dieta é um fator que deve ser analisado com cautela. Surai et al. (1997) estudaram a resistência do sêmen de frangos suplementados com diferentes níveis (0, 20, 200 e 1000 mg/kg de dieta) de vitamina E frente aos danos provocados pela peroxidação lipídica. Neste experimento o sêmen foi coletado ao final de 2 semanas de tratamento, quando a concentração de vitamina E nos espermatozóides e no plasma foram determinadas. Nos animais tratados com 200 mg/kg de dieta, a concentração de vitamina E foi maior no sêmen como um todo ($p < 0,001$), resultando em redução significativa na susceptibilidade do sêmen à peroxidação lipídica. Já nos animais tratados com 1000 mg/kg de dieta não se obteve acréscimos na concentração desta vitamina. Com isso, estes autores sugerem que a concentração de vitamina E no sêmen possui um limite de resposta mediante a manipulação dietética.

Danikowski et al. (2002) forneceram diferentes níveis (0, 100, 1000, 10.000 e 20.000 UI/kg de dieta) de vitamina E na dieta de galos por um período de 12 meses e relataram que o volume, pH, coloração, consistência e motilidade não foram influenciados pelo tratamentos, entretanto foi observado que altos níveis deste nutriente na dieta elevou a concentração de α -tocoferol no ejaculado com conseqüente influência negativa sobre os parâmetros densidade espermática, total de espermatozóides e morfologia espermática.

A influência de diferentes níveis de vitamina E na dieta de caprinos em relação ao desenvolvimento dos órgãos reprodutivos foi avaliada por Hong et al. (2008). Estes autores suplementaram os animais com dietas contendo 0, 80, 320 ou 880 UI de vitamina E/animal/dia durante 5 meses. Nenhum efeito positivo foi encontrado para o grupo suplementado com o maior nível de vitamina E, entretanto, os animais que receberam dietas contendo 80 e 320 UI de vitamina E/animal/dia, apresentaram uma melhora significativa no desenvolvimento de seus órgãos reprodutivos.

Castelline et al. (2002) investigaram a influência de uma suplementação com 50mg (controle) em comparação com 200mg de vitamina E/kg de dieta no sêmen de coelhos. Como resultados, estes autores observaram maior concentração de vitamina E no plasma e no sêmen dos animais suplementados com maior nível de vitamina, porém, sem apresentar efeitos positivos nos parâmetros espermáticos e na capacidade de fertilização dos espermatozoides. Com os níveis maiores de ingestão de vitamina E, os valores de TBARS tanto no sêmen fresco como resfriado foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Alta correlação negativa entre a susceptibilidade do sêmen à oxidação e o nível de vitamina E no sêmen fresco ($r = -0,88$; $p < 0,01$) e resfriado ($r = -0,88$; $p < 0,01$) também foram encontradas neste trabalho.

Surai et al. (2000) em pesquisa com sêmen de patos, encontraram alta proporção de ácidos graxos e baixos níveis vitamina E nos espermatozoides desta espécie, ambos fatores predisponentes à peroxidação lipídica. Todavia, observaram alta atividade das enzimas SOD e GPx, e aumento na atividade antioxidante do plasma, talvez, como compensação aos baixos níveis de vitamina E para proteger as membranas.

Hsu et al. (1998) trabalharam com suplementação dietética de vitamina E e/ou C na capacidade de proteção do sêmen de ratos frente à formação de EROs induzida pela exposição ao chumbo. Neste experimento, os autores notaram que a exposição ao chumbo aumentou a produção de EROs e diminuiu a capacidade de proteção do sêmen, reduzindo então, a motilidade e a capacidade de penetração do espermatozoide no oócito. Os autores demonstraram também que a suplementação com vitamina E e/ou C inibiu as alterações relacionadas ao chumbo, protegendo os espermatozoides da queda na motilidade e capacidade de penetração.

Hatamoto et al. (2006) trabalharam com cães submetidos ou não ao estresse provocado pela aplicação de dexametasona, e suplementados ou não com vitamina E. Os autores relataram que a vitamina E demonstrou ser eficiente na prevenção e controle dos efeitos

deletério do estresse oxidativo em casos específicos, porém em alguns parâmetros ela atuou como pró-oxidante.

Em experimento com touros proposto por Velasquez-Pereira et al. (1998) foram avaliados os efeitos de uma alimentação por longo período contendo gossipol (através de caroço de algodão) e outra dieta gossipol + vitamina E. Como resultados, os autores observaram menores valores ($p < 0,05$) para motilidade, porcentagem de espermatozóides normais, porcentagem de espermatozóides vivos e produção espermática diária, e maiores valores ($p < 0,05$) para anormalidades primárias e os defeitos de peça intermediária no grupo suplementado somente com gossipol. Nos testes de comportamento sexual, os touros suplementados com gossipol + vitamina E demonstraram maior número de montas e menor tempo para execução do primeiro serviço, e na avaliação de puberdade estes animais também foram mais precoces. Tais achados sugerem que a suplementação dietética com vitamina E pode contornar os aspectos reprodutivos negativos ocasionados pelo gossipol.

Deishsel et al. (2008) investigaram os efeitos de uma suplementação dietética contendo alguns antioxidantes na qualidade de sêmen de pôneis. O sêmen foi coletado 2 vezes por semana durante 16 semanas, sendo que, da 5^o a 12^o os animais receberam 15 g/dia de um suplemento contendo 300mg de vitamina E, 300 mg de vitamina C, 4000 mg de L-carnitina e 12 mg de ácido fólico. Para análise, o sêmen foi mantido resfriado (5°C por 24 horas). Os resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa na qualidade seminal após o tratamento.

Investigando a quantidade de antioxidantes no plasma seminal de humanos que apresentavam diferentes espermogramas (normospermia, oligozoospermia e azoospermia), Bhardwaj et al. (2000) encontraram níveis de vitamina E e GSH no plasma seminal de pacientes com oligozoospermia e azoospermia, significativamente inferiores quando comparados à pacientes com normospermia. Indicando que, o decréscimo nos níveis endógenos destes antioxidantes em sujeitos com alterações na espermatogênese, pode causar mudanças na integridade da membrana do espermatozóide como consequência do aumento do estresse oxidativo. Em estudo semelhante, Omu et al. (1999) observaram maior nível de α -tocoferol tanto sérico como no sêmen de homens com espermogramas normais, quando comparados com casos de oligozoospermia e astenozoospermia.

2.4.2 Selênio

Em 1855 um cirurgião do exército americano descreveu no território de Nebraska uma doença que acometia cavalos que pastavam ao redor do Fort Randall. Entretanto, somente em

1929 a doença descrita foi relacionada à níveis elevados de selênio (MOXON e OLSON, 1974 citados por ZANETTI et al., 1998).

O selênio é um elemento do grupo VI localizado imediatamente abaixo do enxofre (S) e assim como este, exibe as valências -2, +4, +6. É menos volátil, mais metálico e potencialmente muito mais tóxico. Paradoxalmente, o selenito (+6) é mais oxidado e menos estável que o sulfato. O selênio pode substituir o enxofre na maioria das substâncias orgânicas, incluindo os aminoácidos que contêm enxofre (VAN SOEST, 1994).

Durante muitos anos o selênio foi mais considerado como sendo tóxico para os animais. Porém, na última década a compreensão de sua importância na nutrição de bovinos aumentou significativamente. Provavelmente, nenhum dos minerais envolvidos em nutrição animal sofreu tantas mudanças de conceitos, quanto à sua real importância na nutrição dos animais quanto o selênio (CARVALHO et al., 2003).

Apesar da sua grande importância e essencialidade, seu papel no metabolismo ainda não foi elucidado, sendo relacionado com a síntese de complexos Se-aminoácidos, Se-proteínas e funcionando como antioxidante eficiente (MOREIRA et al., 2001).

A função antioxidante do selênio foi descrita após a descoberta de que esse mineral agia por intermédio da enzima GPx, quando se verificou que esta possuía quatro átomos de selênio e era de fundamental importância para a destruição dos peróxidos formados no organismo animal (ZANETTI et al., 1998).

Ceballos et al. (1999) trabalhando com bovinos leiteiros mantidos em regime de pastagem, observaram que a atividade sanguínea da GPx, apresentou alta correlação com a concentração de selênio no sangue ($r=0,97$; $p<0,05$), plasma ($r=0,89$; $p<0,05$) e forragem ($r=0,93$; $p<0,05$), demonstrando que existe uma dependência, para a atividade enzimática, do aporte de selênio a partir da dieta.

O selênio é encontrado e utilizado na dieta animal na forma inorgânica como selenito de sódio (Na_2SeO_3) ou na forma orgânica como selenometionina (Se-Met) e selenocisteína (Se-Cys). Ainda não se chegou a um consenso sobre a eficiência da biodisponibilidade das diferentes fontes deste mineral. Neste sentido, é importante ressaltar que a atividade da enzima GPx depende da biodisponibilidade do selênio que por sua vez, é dependente da fonte utilizada (ALVAREZ e MORAES, 2006).

⁸MOXON, A. L.; OLSON, O. E. Selenium in Agriculture. In: **Selenium**, Van Nostrand Reinhold Company, New York, p. 675-707, 1974.

Para ruminantes o selênio é encontrado em diversos alimentos como cereais, leguminosas e forragens. No Brasil ele não se encontra facilmente disponível para os bovinos criados em regime de pastejo, pois como a grande maioria dos nossos solos é altamente lixiviado e com baixo teor de matéria orgânica, o selênio se perde facilmente (CARVALHO et al., 2003). Além disso, apesar dos poucos trabalhos no Brasil que buscaram estudar os níveis de selênio presentes nas principais forrageiras e alimentos fornecidos para animais, já foram identificadas regiões deficientes deste mineral. Stringhini et al. (1997) em um experimento conduzido em Brasília encontraram teores de selênio variando entre 0,025 e 0,075 ppm para as pastagens estudada. Estes resultados estão abaixo do mínimo requerido, que seria acima de 0,1 ppm (ZANETTI et al., 1998).

Gierus (2007) ressaltou que a concentração de selênio em volumosos e concentrados é baixa, e que sua ingestão através do conteúdo natural das plantas e componentes da dieta é insuficiente para atender a exigência nutricional deste elemento em qualquer fase. Uma suplementação com misturas minerais contendo selênio é, portanto, indispensável.

De acordo com o NRC (1996) a exigência de selênio para bovino de corte nas fases de crescimento e terminação é de 0,1 mg/kg de MS ingerida. Já teores acima de 2 mg/kg de MS ingerida, podem ser tóxicos (GIERUS, 2007).

2.4.2.1 Relação do Selênio com a fertilidade

Em todas espécies animais atribui-se alguma influência do selênio na performance reprodutiva tanto de machos como de fêmeas (SMITH e AKINBAMIJO, 2000). Segundo Carvalho et al. (2003) em touros o Selênio se concentra nos testículos e epidídimo, e neles exerce importantes funções metabólicas, como:

1) **Função antioxidante:** na formação (nos testículos) e na maturação espermática (nos epidídimos), pela ação da enzima GPx.

2) **Função estrutural:** através da selenoproteína glutathione peroxidase do hidroperóxido de fosfolípido (PHGPX), que, além da ação antioxidante, faz parte da estrutura fixa da peça intermediária dos espermatozóides na membrana e nas mitocôndrias.

Parâmetros como motilidade e capacidade de fertilização espermática, são afetados pela deficiência de selênio, visto que, a deficiência deste elemento está associada com danos na arquitetura da peça intermediária do espermatozóide (SURAI et al., 1998).

Quando há deficiência de Se, há menor síntese de PHGPx, conseqüentemente, comprometendo a gametogênese do macho e afetando os espermatozóides

(CARVALHO et al., 2003). Portanto, uma suplementação na dieta com selênio pode resultar em efeitos benéficos, exercendo papel de antioxidante no sêmen e em vários outros tecidos.

Behne et al. (1996) encontraram alterações como atrofia bilateral e redução nos diâmetros dos túbulos seminíferos de ratos alimentados com deficiência de selênio. Indicando assim, que a morfologia e função testicular são extremamente alteradas em casos de deficiência de selênio, principalmente a produção de testosterona e o desenvolvimento normal dos espermatozóides.

De acordo com Surai et al. (1998) a inclusão de selênio na dieta de galos aumentou a atividade da GPx no fígado, nos espermatozóides e no plasma seminal desses animais, resultando em uma diminuição na susceptibilidade à peroxidação lipídica dos espermatozóides e tecidos. Esses resultados foram ainda mais expressivos no sêmen resfriado (4°C por 24 horas) em comparação ao sêmen fresco. Já Castelline et al. (2002) incluíram selênio na dieta de coelhos, e constataram aumento na atividade da GPx nas hemácias e no sêmen destes animais, contudo, não observaram redução na susceptibilidade dos espermatozóides à oxidação.

Em experimento realizado com perdizes machos tratados ou não com selênio, Tavian (2005) verificou melhora significativa nos espermatozóides do grupo dos animais suplementados, nas variáveis motilidade e vigor espermáticos e concentração do ejaculado ($p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), no entanto, o volume não foi alterado pela suplementação ($p = 0,7087$).

Por outro lado, também trabalhando com perdizes suplementados ou não com selênio, Goés (2008) não encontrou diferença estatística significativa para as variáveis volume, motilidade, concentração, vigor, integridade acrossomal e integridade de membrana plasmática.

2.4.3 Influência da interação entre vitamina E e selênio na fertilidade

O selênio e a vitamina E apresentam forte relação de sinergismo. A vitamina E atua como protetor de membranas e evita a formação de peróxidos, contudo, uma vez formados, para inativá-los se faz necessária a ação da GPx, cuja biossíntese é induzida pelo selênio (VAN SOEST, 1994). O selênio diminui as exigências de vitamina E na membrana celular e aumenta sua retenção no plasma sanguíneo. E a vitamina E por sua vez, mantém o selênio corporal na forma ativa, diminuindo sua perda e prevenindo a oxidação dos fosfolipídios da membrana (GALYEN et al., 1999).

Poucos são os trabalhos encontrados que objetivaram avaliar a influência da interação entre vitamina E e selênio na fertilidade masculina. Em estudo realizado por Xavier et al. (2008), não foi observado efeito da suplementação alimentar com selênio e vitamina E (0,1 e 0,3 mg/kg de PV, respectivamente) nos parâmetros volume, motilidade, vigor, concentração, integridade de DNA e integridade acrossomal, de caprinos submetidos à insulação escrotal. Sugerindo que esses nutrientes, nestas concentrações, não minimizaram os efeitos deletérios da insulação escrotal induzida.

Castelline et al. (2002) observaram que a suplementação com vitamina E e selênio (200mg de vitamina E/kg de dieta + 0,5ppm de selênio) na dieta de coelhos, aumentou a concentração de vitamina E e a atividade da GPx no plasma seminal, no sêmen fresco e no sêmen armazenado a 5°C por 24 horas ($p < 0,05$). Também verificaram redução dos valores de TBARS no sêmen dos animais tratados ($p < 0,05$). No entanto, os autores não observaram efeito da suplementação nos parâmetros espermáticos, tão pouco na capacidade de fertilização dos espermatozoides.

Surai et al. (1998) verificaram maior concentração de vitamina E no sêmen ($p < 0,0001$) e aumento da atividade da GPx ($p < 0,01$) nos espermatozoides e no plasma seminal de galos suplementados com vitamina E e selênio na dieta (200 mg de vitamina E + 0,3 mg de selênio/kg) quando comparado aos animais não suplementados. Os autores associaram este aumento da atividade da GPx e da concentração de vitamina E à redução na susceptibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica tanto no sêmen fresco, como no sêmen armazenado à 4°C por 24 horas.

Kolodziej e Jacyno (2005) avaliaram a suplementação com 0,2 mg de selênio + 30 mg de vitamina E/kg de dieta e a suplementação com 0,5 mg de selênio + 60 mg de vitamina E/kg de dieta de cachorros jovens. Os autores verificaram que o ganho de peso, a eficiência alimentar, o volume testicular, a libido e o volume do ejaculado não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, maior concentração espermática ($p \leq 0,05$), maior número de espermatozoides totais ($p \leq 0,05$), maior resistência ao teste osmótico ($p \leq 0,01$) e uma menor porcentagem de defeitos morfológicos ($p \leq 0,05$) foram observados no sêmen dos animais do grupo suplementado com 0,5 mg de selênio + 60 mg de vitamina E/kg de dieta.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na literatura ainda não há consenso em relação aos efeitos promovidos pela suplementação dietética com vitamina E e selênio sobre o desempenho reprodutivo. Além

disso, não se tem encontrado referências bibliográficas sobre a influência destes nutrientes nos parâmetros reprodutivos de machos bovinos. Para a obtenção de maiores informações sobre estes aspectos, foram realizados os seguintes trabalhos: Suplementação oral com vitamina E e selênio: integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco de touros jovens da raça Brangus (Capítulo 1) e, Integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen criopreservado de touros jovens da raça Brangus suplementados com vitamina E e selênio (Capítulo 2). Os artigos a seguir foram formatados de acordo com as normas propostas pela Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. R. Oxidants and antioxidants in human fertility. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 9, n. 3. p. 187-197, 2004.
- AITKEN, R, J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W. CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Suproxido dismutase in human sperm suspensions: relative with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISCHER, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1037-1046, 1998.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, 98, p. 257-265, 1993.
- AITKEN, R. J.; KRAUZ, C. Oxidative stress, DNA damage and Y chromosome. **Reproduction**, 122, p. 497-506, 2001.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Revista de Saúde e Biologia*, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- AX, R. L.; BALLY, M. R. ; DIDION, P. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Avaliação de sêmen. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Editora Manole, p. 369-389, 2004.
- BARREIROS, A.L. B. S; DAVID J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gado-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SHREBER, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BHARDWAJ, A.; VERMA, A.; MAJUMDAR, S.; KHANDUJ, K. L. Status of vitamin E and reduced glutathione in sêmen of oligozoospermic and azoospermic patients. **Asian Journal of Andrology**, 2, p. 225-228, 2000.
- BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.2, p. 291-297, 1996.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; CORDOBA, M.; BECONI, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, 29, p. 37-42, 1997.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

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

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, 13, p. 1145-1155, 1999.

BROWN, B. W. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. **Reproduction Nutrition Development**, 34, p. 89-114, 1994.

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

CALEGARE, L.N.P. **Exigências e eficiência energética de vacas de corte Nelore e de cruzamentos Bos taurus x Nelore**. 2004. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CARVALHO, F.A.N., BARBOSA, F.A., McDOWELL, L.R. **Nutrição de bovinos a pasto**. Belo Horizonte: Papelform, 2003. 438p.

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

CEBALLOS, A.; WITWER, F. G.; CONTRERAS, P. A.; QUIROZ, E.; BOHNWALD, H. L. Actividad de glutatona peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 2331-2338, 1999.

CEBALLOS, A.; WITWER, F. G. Metabolismo del selenio en ruminantes. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 28, p. 5-18, 1996.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998, 49 p.

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

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

DEISCHSEL, K.; PALM, F.; KOBLISCHKE, P.; AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, 69, p. 940-945, 2008.

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

DODE, A. A. N.; SILVA, A. E. D. F.; MARTINS, C. F.; PIMENTEL, A. A.; ZUCARI, C. E. F. N.; MELO, S. S.; RUMPF, R.; SOUZA, R. V. **Curso de Andrologia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, 197 p.

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

DONNELLY, E. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v. 15, n. 1, p. 61-68, 2000.

DUNN, T.G.; MOSS, G.E. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1580-1593. 1992.

EIMERICK, L. L. **Testes funcionais de membrana e índice de prenhez utilizando sêmen criopreservado de tourinhos Tabapuã aos dois anos de idade, criados a pasto e previamente selecionados pela CAP**. 2007, 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ESKENAZI, B.; KIDD, S. A.; MARKS, A. R.; SLOTER, E.; BLOCK, G. WYROBEK, A. J. Antioxidant intake is associated with semen quality in health men. **Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 1006-1012, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.

FETTMAN, M. J. Vitaminas lipossolúveis. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica veterinária**, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 571-586.

FRANCO, G.L. Desafios da Interação entre Aspectos Nutricionais e Reprodutivos do Gado de Corte. In: **Simpósio Sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, 45, Brasília, 2005.

GALYEAN, M.L.; PERINO, L.J.; DUFF, G.C. Interaction of cattle health/immunity and nutrition. **Journal of Animal Science**, 77, p. 1120-1134, 1999.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos***

taurus taurus). 2004, 258 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GAZVANI, M. R.; WILSON, E. D. A.; RICHMOND, D. H.; HOWARD, P. J.; KINGSLAND, C. R.; LEWIS-JONES, D. I. Role of mitotic control in spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 2, 2000.

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

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

GÓES, P. A. A. **Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do Sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio**. 2008, 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONÇALVES, F. S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos**. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HAFEZ, E. S. E. Avaliação de sêmen. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed., Barueri: Editora Manole, 2004, p. 435-446.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 145-149, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, 219, p. 1-14, 1984.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.

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

HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**. 2004, 180 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HENDIN, B. N.; KOLETTIS, P. N.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. T.; AGARWAL, A. Varicocele is associated with elevated spermatozoa reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 6, p. 1931-1934, 1999.

HINDSHAW, D. B.; SKLAR, L. A.; BOHL, B. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. **American Journal of Pathology**, 123, p. 454-464, 1986.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.

HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z. Effect of vitamin E supplementation on development of reproductive organs in Boer goat. **Animal Reproduction Science**, v. 5, n. 76, p. 1-9, 2008.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 16, p. 809-828, 1987.

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

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

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

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

KOKSAL, I. T.; USTA, M.; ABBASOGLU, S.; KADIOGLU, A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. **Asian Journal of Andrology**, 5, p. 95-99, 2003.

KOŁODZIEG, A.; JACYNO, E. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Archiv Tierzucht**, v. 48, n. 1, p. 68-75, 2005.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

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

LUCCI, C. S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Editora Manole, 1997, 169 p.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 99-145.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H.; MARQUES, J. A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R. M.; PRADO, I. N. **Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão**. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br>>, Acessado em: 06 mar. 2009.

MIESEL, R.; JEDRZEJCZAC, P.; SANOCKA, D.; KURPISZ, M. K. Severe antioxidase deficiency in human semen samples with pathological spermiogram parameters. **Andrologia**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 1997.

MOREIRA, J.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; BERTECHINI, A. G.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, D. F.; CARDOSO, M. G. Efeito de fontes e níveis de selênio na atividade enzimática da glutathiona peroxidase e no desempenho de frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 3, p. 645-649, 2001.

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

NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; ALLAMENENI, S. S. R.; AGARWAL, A. Identificatiom of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels,. **Clinics**, v. 60, n. 4, p. 317-24, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington, D.C. National Academy of Sciences, 7 ed., 242 p., 1996.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, p. 97-110, 2001.

OMU, A. E.; FATINIKUN, N. MANNAZHATH, N.; ABRAHAM, S. Significance of simultaneous determination of serum and seminal palsma α -tocoferol and retinol in infertility men by high-performance liquid chromatography. **Andrologia**, 31, p. 347-354, 1999.

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

PIRES, A.V.; RIBEIRO, C.V.M. Aspectos da nutrição relacionados à reprodução In: BESCHULLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Editora Funep, 2006. p. 513-535.

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

POTTS, R. J.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research**, 447, p. 249-256, 2000.

QUINN, P. J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions?. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2004.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed., São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 57-82.

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule. **FASEB Journal**, 15, p. 2314-2325, 2001.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAID, T. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; MASCHA, E.; SIKKA, S. C.; THOMAS, A. J. Human sperm superóxido anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 4, p. 871-877, 2004.

SANTOS, F.A.P.; SANTOS, J.E.P. Efeitos da nutrição na reprodução de bovinos de corte em pastagens. In: REIS, R.A. BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. et al. **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Editora Funep, 2003. p. 122-127.

SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003, 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p. 549-560, 2000.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 78-86, 1996.

STRINGHINI, J. H.; MIRANDA, R. M.; LOPES, H. O. S. Níveis de selênio em pastagens do cerrado e efeitos da suplementação sobre o desempenho de cordeiros. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 57, n. 1, p. 85-91, 1997.

SURAI, P. F.; BRILLARD, J. P.; SPEAKE, B. K.; BLESBOIS, E.; SERGNEURIN, F.; SPARKS, N. H. C. Phospholipid fatty acid composition, vitamin e content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1025-1039, 2000.

SURAI, P. K., KUTZ, E., WISHART, G. J., NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The relationship between the dietary provision of alpha-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 1, p. 47-51, 1997.

SURAI, P., KOSTJUK, I., WISHART, G., MACPHERSON, A., SPEAKE, B., NOBLE, R., IONOV, I.; KUTZ, E. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Elements Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

SUZUKI, N.; SOFIKITIS, N. Protective effects of antioxidants on testicular function of varicocele rats. **Yonago Acta Medica**, 42, p. 87-94, 1999.

TAVIAN, F. A. **Descrição dos achados seminais de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) tratadas com vitamina e selênio**. 2005. 24 f. Relatório (Iniciação científica em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação de sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-JÚNIOR, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina, Ribeirão Preto**, 31, p. 31-44, 1998.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2. ed., Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; CHENOWETH, P. J.; MACDOWEL, L. R.; RISCO, C. A.; STAPLES, C. A.; PRICHARD, D.; MARTINS, F. G.; CALHOUN, M. C.; WILLIAMS, S. N.; WILKINSON, N. S. Reproductive Effects of Feeding Gossypol and Vitamin E to Bulls. **Journal of Animal Science**, 76, p. 2894-2904, 1998.

VILLA-ARCILA, N.A.; CEBALLOS-MÁRQUEZ, A. Radicales libres e infertilidad en el macho. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 1, n. 2, p. 82-97, 2007.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

XAVIER, G. C.; MAYMONE, A. C. M.; SOARES, P. C.; SILVA JÚNIOR, V. A.; GUERRA, M. M. P. Suplementação dietética com selênio e vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal. **Acta Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 103-111, 2008.

ZALATA, A. A.; AHMED, A. H.; ALLAMANENI, S. S. R.; COMHAIRE, F. H.; AGARWAL, A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. **Asian Journal of Andrology**, 6, p. 313-318, 2004.

ZANETTI, M. A.; NEUNHAUS, L. E. B.; SCHALCH, E.; MARTINS, J. H. Efeitos da Suplementação de Selênio e Vitamina E em Bovinos Leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 405-408, 1998.

Capítulo 1

Suplementação oral com vitamina E e selênio: integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco de touros jovens da raça Brangus em pastejo

Oral supplementation with vitamin E and selenium: spermatic membrane integrity and fresh semen quality of young Brangus bulls in grazing.

Resumo – O trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se a integridade da membrana espermática e a qualidade do sêmen fresco de touros jovens Brangus em pastejo são alteradas pela suplementação com vitamina E e selênio. Foram utilizados 17 touros da raça Brangus com média de 24 meses de idade e peso vivo médio de 454 kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC, sem suplementação de vitamina E e selênio) e grupo suplementado com vitamina E e selênio (GS, 400 UI de vitamina E/dia + 0,1 mg de selênio/kg de matéria seca ingerida) adicionados ao concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados por gramínea forrageira *Panicum maximum* cv. Mombaça e recebendo concentrado fornecido diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E e selênio foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental foram realizadas quatro coletas de sêmen. O sêmen foi coletado pelo método da eletroejaculação. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Não foi verificado efeito significativo da suplementação com vitamina E e selênio ($p > 0,10$) sobre a consistência testicular, volume do ejaculado, concentração, motilidade, vigor, morfologia, integridade acrossomal e viabilidade espermática. Por outro lado, houve efeito da suplementação sobre a integridade da membrana espermática ($p = 0,0164$). A suplementação oral com vitamina E e selênio, nos níveis utilizados, não influenciou os parâmetros de qualidade do sêmen fresco, porém promoveu efeito positivo sobre a integridade funcional da membrana espermática de touros jovens da raça Brangus.

Palavras chaves: antioxidantes, bovinos, espermatozóide, estresse oxidativo

Summary – The work was carried through with the objective to verify if the sperm membrane integrity and the fresh semen quality of young Brangus bulls are changed for supplementation with vitamin E and selenium. Seventeen Brangus bulls with 24 months of mean age and 454 kg of average live weight were used. The animals were divided randomly into two groups: control group (GC, without supplementation of vitamin E and selenium) and supplemented with vitamin E and selenium group (GS, 400 IU of vitamin E/day + 0.1 mg of selenium/kg of dry mater intake) added to concentrate. Each group was kept in separate areas formed by forage grass *Panicum maximum* cv. Mombasa and receiving concentrate supplied daily in amount of 4.5 kg/animal. The supplementation with vitamin E and selenium was carried out for 60 days. During the experimental period four semen collections were realized. Semen was collected by the method of eletroejaculation. The experiment was installed in a completely randomized design with repeated measures over time. There was no significant effect of supplementation with vitamin E and selenium ($p>0.10$) on the testicular consistency, ejaculate volume, concentration of spermatozoa, percentage of motile spermatozoa, spermatic vigor, spermatozoa morphology, percentage of intact acrosomes and sperm viability. Furthermore, there was significant effect of treatment on the sperm membrane integrity ($p=0.0164$). The oral supplementation with vitamin E and selenium, at levels used, did not influence the parameters of seminal quality, however promoted positive effect on the functional of spermatic membrane integrity of young Brangus bulls.

Keywords: antioxidants, bovine, spermatozoa, oxidative stress

1. Introdução

Além de nutrientes constantemente estudados como energia e proteína, as vitaminas e minerais também podem afetar a função reprodutiva (Dunn & Moss, 1992), contudo os papéis específicos desses nutrientes em tecidos reprodutivos ainda não estão bem definidos. Alguns autores atribuem importância à algumas vitaminas e minerais na reprodução por participarem de um sistema antioxidante, protegendo as células do estresse oxidativo e de danos na membrana e DNA (Aitken et al., 1989; Sharma & Agarwal, 1996).

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas ao oxigênio (EROs) no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento na geração de espécies oxidantes (Halliwell, 1991). Ele tem sido identificado como uma das causas da infertilidade masculina, pois pode provocar severos danos aos espermatozoides (Sikka, 1996).

Os espermatozoides são susceptíveis à danos peroxidativos por apresentarem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e associada à baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (Aitken, 1994).

Para prevenir ou reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante. Nesse contexto, a vitamina E e o Selênio desempenham papéis importantes, participando da estrutura ou como co-fatores de enzimas antioxidantes (Koury & Donangelo, 2003).

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e representa a principal defesa contra a lesão oxidativa das membranas celulares, sendo um eficiente inibidor da peroxidação lipídica (Quinn, 2004). Já o selênio, tem suas funções metabólicas associadas à captação de radicais livres e modulação do estresse oxidativo, funcionando como co-fator da glutathione

peroxidase, enzima que evita a lesão dos componentes celulares pelos peróxidos (Alvarez & Moraes, 2006).

Apesar de discutida a ação isolada do Selênio e da Vitamina E sobre a reprodução animal, a ação conjunta desses nutrientes apresenta poucos e controversos resultados. Na espécie bovina, não se tem encontrado referências bibliográficas sobre o efeito desses nutrientes nos parâmetros reprodutivos de machos. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da suplementação oral com vitamina E e selênio sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco de touros jovens da raça Brangus.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno – GAP, localizada no município de Jaciara, Mato Grosso, durante o período de junho a setembro de 2008. O município de Jaciara encontra-se na altitude de 367 metros acima do nível do mar, latitude 15°57'55'' sul e longitude 54°58'06'' oeste. O clima da região é tropical quente e úmido, com duas estações bem definidas, verão chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). A temperatura média anual é 28°C, e pluviosidade média anual de 2000 mm (INMET, 2009).

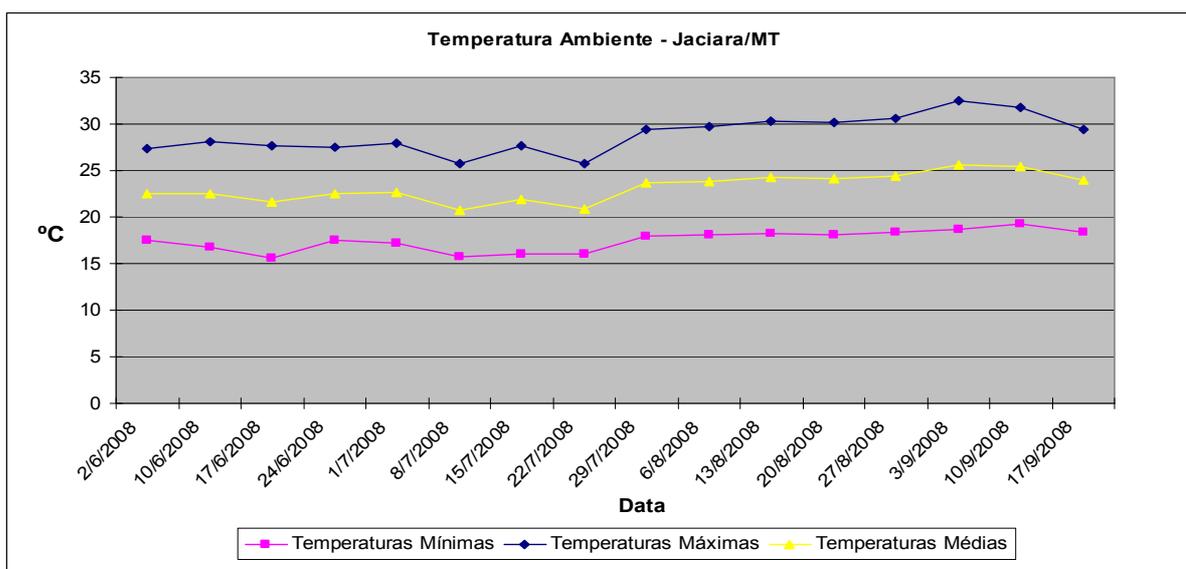


Gráfico 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média) da região de Jaciara, MT – 02/06/2008 – 17/09/2008.

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET)

Foram utilizados 17 touros da raça Brangus, com média de 24 meses de idade e peso vivo (PV) médio de 454 kg. Todos os touros utilizados encontravam-se em repouso sexual. Dez dias antes do experimento, os animais foram vermifugados (Doramectina, Dectomax®, Pfiser Saúde Animal) e tratados com ectoparasiticida (Cipermetrina + Ethion, Ciperthion®, Shering-Plough). E em seguida foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos:

- **Grupo Controle (GC)** - Sem suplementação adicional de vitamina E e selênio, contendo 9 animais;

- **Grupo Suplementado (GS)** – Suplementados com uma associação de vitamina E e selênio, constituído de 8 animais.

Cada grupo foi mantido separado em piquetes de 7,35 ha de área, formados por pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça com disponibilidade de 3.015 kg de matéria seca (MS) /ha. Todos os animais experimentais receberam concentrado balanceado (Tabelas 1 e 2) fornecido uma vez ao dia (4,5 kg/animal). O concentrado foi formulado para ganho de peso de 1 kg/dia, e água *ad libitum*.

Tabela 1. Composição percentual do suplemento fornecido aos animais experimentais

Ingrediente	Quantidade (%)
Farelo de soja	27,50
Milho grão moído	67,25
Calcário	1,50
Flor de Enxofre	0,25
Uréia Pecuária	0,50
Sal mineral 88*	3,00

*Níveis de garantia por kg do produto: Fósforo – 88g; Cálcio – 154g; Cobre – 1700mg; Enxofre – 12g; Cobalto – 200mg; Manganês – 1300mg; Zinco – 5000mg; Iodo – 130mg; Selênio – 20mg; Magnésio – 6mg; Sódio – 130mg.

Durante 60 dias do período experimental, os animais do GS receberam vitamina E (α -tocoferol, Agrocria Nutrição Animal) e Selênio (selenito de sódio, Agrocria Nutrição Animal)

adicionados ao concentrado, de modo a fornecer 400 UI de vitamina E/animal/dia e 0,1mg de selênio/kg de MS ingerida.

O período experimental teve a duração de total de 75 dias. Neste período foram realizadas quatro avaliações espermáticas, sendo a primeira antes do início da suplementação (coleta 1), com 30 dias de suplementação (coleta 2), com 60 dias de suplementação (coleta 3) e a última 15 dias após o término da suplementação (coleta 4) com a finalidade de observar se haveria ou não efeito residual da suplementação com vitamina E e selênio sobre os parâmetros espermáticos. Antes do período de suplementação, os animais passaram por um período de adaptação ao manejo e ao concentrado de 10 dias.

Tabela 2. Análise bromatológica do suplemento concentrado e da gramínea forrageira

Nutrientes	Concentrado (%)	Pastagem (%)
Matéria seca (MS)	90,00	37,99
Fibra em detergente neutro (FDN)	29,40	67,57
Proteína Bruta (PB)	21,00	6,23
Extrato etéreo (EE)	2,50	1,05
Matéria Mineral (MM)	8,43	7,80

Para a coleta de sêmen, os animais foram contidos em tronco apropriado, e após a limpeza do pênis e prepúcio, a consistência testicular (CONST) foi avaliada e classificada em escala de um a cinco, onde 1 foi considerado o testículo duro e 5 foi considerado o testículo mole (Reichenbach et al., 2008).

A coleta de sêmen foi realizada pelo método de eletroejaculação (Eletrovét®, Eletro Veterinária Ltda.) e o ejaculado acondicionado em tubo coletor graduado, devidamente identificado, isolado de choque térmico e luz.

As amostras de sêmen obtidas foram avaliadas para características macroscópicas e microscópicas. As características macroscópicas avaliadas foram volume, aspecto e coloração do ejaculado. O volume do ejaculado (VOL) foi aferido diretamente no tubo coletor graduado

em mL. O aspecto foi classificado em aquoso, semi-leitoso, leitoso e cremoso. Já a coloração em translúcida, branca turva, branca, branca leitosa e opaca.

As análises microscópicas de motilidade (MOT) espermática e vigor (VIG) foram realizadas no momento da coleta (CBRA, 1998). Imediatamente após a coleta foram retiradas alíquotas de sêmen para avaliações da: morfologia espermática, através da técnica de preparação úmida analisada em microscópio de contraste de fases (Alphaphot, Nikon®) com aumento de 1000 vezes em imersão (Barth & Oko, 1989), sendo as alterações morfológicas classificadas em defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) (CBRA, 1998); concentração espermática (CONC) (CBRA, 1998); número total de espermatozoides por ejaculado (TOTEJA) (CBRA, 1998); coloração de eosina-nigrosina (EOS) (WHO, 1992); coloração acrossomal simples (POPE) (Pope et al., 1991); teste de expansão hipo-osmótico (HIPO) (Jeyendran et al., 1984) e avaliação da reação acrossômica através da coloração tripla (Harayama et al., 1993). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (LABRA) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), localizado no município de Cuiabá.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, sendo cada animal considerado como unidade experimental e cada uma das coletas de sêmen foi considerada como uma medida repetida no tempo. Os dados foram analisados através da ANAVA com nível de significância de 10%, sendo utilizado o programa estatístico SAS (SAS, 2001). Algumas variáveis foram transformadas para serem analisadas como dados paramétricos. Os dados estão apresentados na forma de média e erro padrão da média dos dados originais.

3. Resultados e Discussão

A consistência testicular (CONS) não diferiu ($p>0,10$) entre os animais do grupo controle ($3,19 \pm 0,07$) e do grupo suplementado com vitamina E e selênio ($3,03 \pm 0,07$). Também não foi observado efeito da coleta e da interação entre tratamento e coleta para esta variável ($p>0,10$). A consistência testicular pode refletir condições de anormalidades como hipoplasias, degenerações e inflamações, bem como a funcionalidade testicular (Dode et al., 2004). De acordo com Reichenbach et al. (2008), touro em idade reprodutiva deve apresentar consistência testicular elástica e firme, condizendo assim, com os valores encontrados neste trabalho para esta variável.

Para as variáveis volume do ejaculado (VOL) e concentração espermática (CONC) não foram demonstrados efeitos estatístico significativos da suplementação com vitamina E e selênio, da coleta e da interação entre coleta e tratamento ($p>0,10$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Média \pm erro padrão da média (EPM) e nível de probabilidade (P) de efeito de tratamento das variáveis consistência testicular (CONS), volume (VOL), concentração espermática (CONC), número total de espermatozoides por ejaculado (TOTEJA), motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) das amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados com vitamina E e selênio (GS)

Variáveis	GC	GS	P*
CONS	$3,19 \pm 0,07$	$3,03 \pm 0,07$	0,1434
VOL (mL)	$6,43 \pm 0,76$	$5,61 \pm 0,46$	0,5333
CONC ($\times 10^6$ /mL)	$48,28 \pm 6,67$	$36,41 \pm 6,45$	0,2100
TOTEJA ($\times 10^6$)	$333,42 \pm 58,98$	$175,96 \pm 23,71$	0,0111
MOT (%)	$60,83 \pm 3,20$	$61,13 \pm 2,56$	0,7531
VIG (0-5)	$2,70 \pm 0,09$	$2,59 \pm 0,12$	0,4585
DEFMA (%)	$9,45 \pm 1,60$	$9,47 \pm 1,24$	0,9074
DEFME (%)	$4,33 \pm 0,62$	$4,84 \pm 0,76$	0,4150
DEFTOT (%)	$13,79 \pm 1,70$	$14,32 \pm 1,57$	0,8692

(*) Valor calculado pela análise de variância, sendo considerado como efeito significativo quando $P<0,10$

Comparando os valores obtidos para a variável volume com dados presentes na literatura, podemos verificar que as médias encontradas no grupo controle ($6,43 \pm 0,76$ mL) e no grupo suplementado ($5,61 \pm 0,46$) do presente experimento, foram inferiores a média descrita por Chacur et al. (2007), que trabalhando com touros Brangus de 36 meses de idade no período chuvoso do ano e utilizando a eletroejaculação para obtenção do ejaculado, encontraram volume seminal de $7,68 \pm 0,62$ mL. Todavia, deve-se ressaltar que ejaculados com volume entre 5 e 8 mL, quando obtidos pelo método de eletroejaculação são considerados dentro dos padrões normais para espécie bovina (CBRA, 1998). Segundo Reichenbach et al. (2008) o volume do ejaculado obtido pelo método da eletroejaculação não pode ser mensurado com segurança, uma vez que existem touros com respostas variadas de sensibilidade aos estímulos elétricos.

Em relação à variável número total de espermatozóides por ejaculado (TOTEJA) foi observado efeito significativo da suplementação com vitamina E e selênio ($p=0,0111$). Os animais do grupo controle apresentaram maior TOTEJA comparando-se ao grupo suplementado. O TOTEJA é calculado em função do VOL e da CONC, variáveis estas que não diferiram estaticamente entre os tratamentos. Apesar de não ter sido possível verificar diferenças estatísticas, tanto o VOL como a CONC do grupo controle, demonstraram maiores valores absolutos em relação ao grupo suplementado, fato este que poderia explicar o maior TOTEJA observado no grupo controle (Tabela 3).

As médias obtidas para as variáveis CONC e TOTEJA no grupo controle do presente estudo superaram as descritas por Chacur et al. (2007), que encontraram concentração espermática de $34,32 \pm 2,83$ ($\times 10^6$ /mL) e total de espermatozóides por ejaculado de $289,13 \pm 61,83$ ($\times 10^6$) em animais da mesma raça do presente estudo.

Corroborando com os resultados deste trabalho, Xavier et al. (2008) não observaram efeito da suplementação com 0,3 UI vitamina E/kg de PV e 0,1 mg/kg de PV de selênio no

volume e concentração espermática de caprinos suplementados, quando comparados aos animais do grupo controle. E Bartle et al. (1980) não encontraram alterações no volume, concentração espermática e total de espermatozóides por ejaculado de touros da raça Holandesa tratados com selênio via injeção intra-muscular de 5, 10, 20 e 40 mg de selenito de sódio.

Não foi registrado efeito ($p>0,10$) da suplementação com vitamina E e selênio para as variáveis motilidade espermática (MOT) e vigor (VIG) (Tabela 3). Para estas mesmas variáveis, também não foi demonstrado efeito ($p>0,10$) da coleta e da interação tratamento e coleta. Resultados semelhantes foram encontrados por Xavier et al. (2008), que não observaram efeito da suplementação com vitamina E e selênio nos parâmetros vigor e motilidade espermática de caprinos submetidos à insulação escrotal. Bartle et al. (1980) também não encontraram diferença na motilidade espermática de touros tratados com selênio.

Os valores obtidos neste estudo para as variáveis MOT e VIG foram similares aos encontrados por Moraes et al. (1998) em touros das raças Aberdeen Angus e Brangus. Por outro lado, Chacur et al. (2007) trabalhando com touros Brangus, encontraram valores para motilidade de $51,20 \pm 2,62$ (%) e para vigor espermático de $1,93 \pm 0,05$, valores portanto, inferiores aos observados no presente experimento.

A motilidade e o vigor são parâmetros que apresentam relação com a fertilidade do sêmen (Reichenbach et al., 2008). Entretanto são altamente susceptíveis à influências externas como temperatura do material utilizado na avaliação, contaminação da amostra por urina e tempo decorrido entre a coleta e a análise da amostra (Hatamoto, 2004), além de serem variáveis avaliadas por métodos subjetivos, o que poderia explicar a divergência entre os resultados obtidos por este trabalho com os resultados observados na literatura.

Quando se avaliou a morfologia espermática, não foi observado efeito ($p>0,10$) da suplementação com vitamina E e selênio sobre o conjunto de variáveis formado por defeitos

maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) (Tabela 3). Também não foi registrado efeito ($p > 0,10$) da interação entre tratamento e coleta sobre este conjunto de variáveis.

Contrastando os resultados obtidos no presente trabalho, Xavier et al. (2008), após submeterem caprinos a 18 dias de insulação escrotal, realizaram a avaliação da morfologia espermática, e encontraram maior quantidade de espermatozóides normais nos animais suplementados com selênio e vitamina E, em comparação com os animais não suplementados (65% e 26,5%, respectivamente). Segundo Hatamoto (2004) o efeito da vitamina E sobre as alterações morfológicas é controverso, e dependente da dose utilizada e do requerimento diário desta vitamina.

Comparando os resultados de DEFMA, DEFME e DEFTOT com dados presentes na literatura, podemos verificar que os valores encontrados neste trabalho foram inferiores aos descritos por Chacur et al. (2007), que encontraram $20,73 \pm 1,90$ % de defeitos maiores; $20,44 \pm 1,70$ de defeitos menores e $30,43 \pm 3,4$ % de defeitos totais em touros da raça Brangus.

Em relação à variável viabilidade espermática (EOS), não foi observado efeito ($p > 0,10$) da suplementação com vitamina E e selênio (Tabela 4), da coleta e da interação entre tratamento e coleta. A análise desta variável através do teste de eosina/nigrosina é considerada como importante indicador da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (Dode et al., 2004), uma vez que o princípio deste teste consiste na penetração e difusão do corante em células mortas, ao passo que nos espermatozóides vivos, portadores de membranas celulares intactas, isso não ocorre (Reichenbach et al., 2008).

Através dos resultados obtidos pelo teste de expansão hipo-osmótico, observou-se maior porcentagem ($p = 0,0164$) de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO) no GS em comparação ao GC (Tabela 4), demonstrando efeito positivo da suplementação com vitamina E e selênio sobre a integridade da membrana espermática. Para

esta variável, não foi verificado efeito ($p>0,10$) de coleta e da interação entre tratamento e coleta.

Tabela 4 – Média \pm erro padrão da média (EPM) e nível de probabilidade (P) das variáveis viabilidade espermática (EOS), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO), espermatozóides com acrossoma íntegro (POPE), espermatozóides vivos com acrossoma intacto (TRI-1), espermatozóides vivos com reação acrossômica (TRI-2), espermatozóides mortos com acrossoma intacto (TRI 3) e espermatozóides mortos com reação acrossômica degenerativa (TRI 4) das amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados com vitamina E e selênio (GS)

Variáveis	GC	GS	P*
EOS (%)	77,12 \pm 2,02	79,31 \pm 2,28	0,3287
HIPO (%)	26,70 \pm 2,89	35,71 \pm 2,98	0,0164
POPE (%)	89,78 \pm 3,83	97,76 \pm 2,28	0,9101
TRI 1 (%)	91,64 \pm 1,28	88,74 \pm 1,84	0,2246
TRI 2 (%)	0,51 \pm 0,10	0,57 \pm 0,15	0,6941
TRI 3 (%)	5,84 \pm 0,99	7,52 \pm 1,22	0,2823
TRI 4 (%)	2,04 \pm 0,67	3,16 \pm 0,82	0,3644

(*) Valor calculado pela análise de variância, sendo considerado como efeito significativo quando $P<0,10$

Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, Kolodzieg & Jacyno (2005) verificaram maior resistência ao teste osmótico nos espermatozóides de cachaaos suplementados com 0,5 mg de selênio + 60 mg de vitamina E/kg de dieta, ou seja duas vezes a quantidade requerida destes nutrientes para esta espécie, em relação aos animais suplementados com níveis de vitamina E e selênio na dieta somente para atender suas exigências.

Não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa ($p>0,10$) entre os grupos estudados para a porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro (POPE). No entanto, podemos verificar diferenças entre os valores absolutos referentes aos grupos em questão, sendo que houve maior porcentagem de células com acrossoma íntegro no grupo

suplementado com vitamina E e selênio em relação ao grupo controle (Tabela 4). Não foi registrado efeito ($p>0,10$) de coleta e de interação entre tratamento e coleta para esta variável.

Xavier et al. (2008) trabalhando com caprinos mantidos em regime de confinamento, não verificaram efeito da suplementação com vitamina E e selênio sobre a porcentagem de espermatozoides com integridade acrossomal. E Bartle et al. (1980) avaliaram o sêmen obtido por vagina artificial de touros da raça Holandesa e não observaram efeito do tratamento com selênio sobre a porcentagem de acrossomas intactos.

O efeito positivo da suplementação com vitamina E e selênio sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal encontrado neste experimento, poderia ser explicado pelos papéis desempenhados por estes nutrientes, uma vez que a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular (Quinn, 2004) e o selênio age como componente da glutathione peroxidase, enzima que atua reduzindo os peróxidos formados (Zanetti et al., 1998), sendo importante para a manutenção da integridade estrutural do espermatozoide (Surai et al., 1998).

Quando se avaliou os resultados obtidos pela coloração tripla, não se observou efeito do tratamento ($p>0,10$) e da interação entre tratamento e coleta ($p>0,10$) sobre a porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto (TRI 1), espermatozoides vivos com reação acrossômica (TRI 2), espermatozoides mortos com acrossoma intacto (TRI 3) e espermatozoides mortos com reação acrossômica degenerativa (TRI 4) (Tabela 4).

A observação da ocorrência de reação acrossomal nos espermatozoides de um ejaculado indica que esta reação ocorreu precocemente. A reação acrossomal tem a finalidade de tornar o espermatozoide hábil a penetrar na zona pelúcida do óvulo e expor seu segmento equatorial para que ocorra fusão entre as membranas dos gametas. No entanto, para que ocorra esta reação, é necessário que haja a capacitação espermática, processo este que deve

ocorrer no trato genital feminino com a remoção dos componentes decapacitantes da membrana plasmática dos espermatozóides (Gonçalves et al., 2001).

Na literatura, não se tem encontrado trabalhos que objetivaram avaliar a ação conjunta do selênio com a vitamina E sobre os parâmetros seminais de bovinos. Resultados semelhantes aos obtidos neste experimento foram encontrados por alguns pesquisadores, porém trabalhando com outras espécies. Castellini et al. (2002) não verificaram efeito da suplementação com 200 mg de vitamina E/kg de dieta + 0,5 ppm de selênio sobre o percentual de espermatozóides móveis, viabilidade espermática e ocorrência de reação acrossômica no sêmen de coelhos. Por outro lado, Kolodziej & Jacyno (2005) observaram maior concentração espermática ($p \leq 0,05$), maior número de espermatozóides totais ($p \leq 0,05$), maior porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro ($p \leq 0,01$) e menor porcentagem de defeitos morfológicos ($p \leq 0,05$) no sêmen de cachacos suplementados com 0,5 mg de selênio + 60 mg de vitamina E/kg de dieta em relação aos animais tratados com 0,2 mg de selênio + 30 mg de vitamina E/kg de dieta, níveis estes de requerimento para cachacos em crescimento (NRC, 1998).

Para bovinos de corte nas fases de crescimento e terminação, a exigência diária de selênio de acordo com o NRC (1996) é de 0,1 mg/kg de MS ingerida. Considerando a categoria e peso vivo médio dos animais deste experimento, estimou-se o consumo de matéria seca (CMS) e obteve-se a quantidade de 12 kg de CMS/dia. Logo, a exigência de selênio para estes animais foi de 1,2 mg/dia. Já o requerimento de vitamina E para a categoria animal em questão, varia entre 50 a 100 UI de vitamina E/dia (NRC, 1996). Neste experimento os animais de ambos os grupos foram mantidos em sistema de pastejo e recebendo 4,5 kg de concentrado fornecido diariamente. Deste modo, para se obter as estimativas da quantidade total de vitamina E e de selênio fornecida aos animais estimou-se as quantidades destes

nutrientes provenientes da ingestão de forragem e do concentrado (McDowell, 1999; NRC, 1996).

Logo, o total de vitamina E e selênio fornecido aos animais experimentais foi obtido em função da soma dos valores estimados destes nutrientes na forragem e de suas quantidades ingeridas no concentrado, e no caso do GS, foram acrescidas as quantidades provenientes da suplementação. Para vitamina E, não foi considerada quantidade proveniente da gramínea forrageira, pois segundo o NRC (1996) não são encontrados valores significativos de vitamina E na maioria das gramíneas.

Baseando-se nas estimativas calculadas e considerando a biodisponibilidade do selenito de sódio em torno de 40%, foi observado que os animais do GC receberam diariamente 58 UI de vitamina E e 1,98 mg de selênio (Tabela 5), ultrapassando portanto os níveis de requerimentos destes nutrientes para a categoria animal estudada. Já os animais do GS receberam diariamente 458 UI de vitamina E e 2,46 mg de selênio (Tabela 5), ou seja, níveis de vitamina E quatro vezes maiores que o exigido, e níveis de selênio duas vezes maiores que o requerido. Este fato ajudaria explicar a ausência de efeito da suplementação na maioria das variáveis estudadas, uma vez que em ambos os grupos avaliados, as exigências tanto de vitamina E quanto de selênio estavam sendo supridas.

Tabela 5 - Consumo estimado diário de vitamina E e selênio na gramínea forrageira, no concentrado, na gramínea forrageira + concentrado (situação do grupo controle, GC) e na gramínea forrageira + concentrado + suplementação (situação do grupo suplementado com vitamina E e selênio, GS) dos animais experimentais

Fonte	Vitamina E (UI)	Selênio (mg)
Gramínea forrageira	-----	0,5285
Concentrado	58	1,4517
Gramínea forrageira + Concentrado (GC)	58	1,9802
Gramínea forrageira + Concentrado + Suplementação (GS)	458	2,4600

É importante ressaltar que a estratégias de manejo nutricional utilizada no presente experimento, não é utilizada na maioria das propriedades brasileiras, onde os touros são mantidos em sistema de pastejo extensivo e, na maioria das vezes suplementados apenas com mistura mineral.

Levando-se em conta os resultados obtidos, pode-se concluir que a suplementação com vitamina E e selênio, nos níveis utilizados e nas condições de manejo do presente experimento, não influenciou o conjunto de variáveis formado pela consistência testicular, volume, concentração, motilidade, vigor, defeitos, viabilidade espermática, integridade acrossomal e reação acrossômica, porém promoveu efeito positivo sobre a integridade funcional de membrana espermática de touros jovens da raça Brangus suplementados a pasto no período seco do ano.

Agradecimentos

A todos que auxiliaram no desenvolvimento do projeto, a Fazenda Sereno - GAP, a Agrocria Nutrição Animal, a toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), a CAPES/PROCAD e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado concedida.

4. Referências

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

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISCHER, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**, 1 ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1989. 285 p.

BARTLE, J. L.; SENGER, P. L.; HILLERS, J. K.; Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 1007-1013, 1980.

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

CHACUR, M. G. M.; SIRCHIA, F. P.; ZERBINATTI, E. P.; KRONKA, S. N.; OBA, E. Relação entre circunferência escrotal, libido, hormônios e características do sêmen de touros Brangus e Pardo Suíço. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 35, n. 2, p. 173-179, 2007.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998, 49 p.

DODE, A. A. N.; SILVA, A. E. D. F.; MARTINS, C. F.; PIMENTEL, A. A.; ZUCARI, C. E. F. N.; MELO, S. S.; RUMPF, R.; SOUZA, R. V. **Curso de Andrologia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, 197 p.

DUNN, T.G.; MOSS, G.E. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1580-1593. 1992.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, p. 195-226, 2001.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 145-149, 1991.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.

HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**. 2004, 180 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

INMET-**Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/>, Acessado em: 06 de maio de 2009.

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

KOŁODZIEG, A.; JACYNO, E. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Archiv Tierzucht**, v. 48, n. 1, p. 68-75, 2005.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition**. New York: Academic press, 486 p., 1999.

MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO JÚNIOR, A. G. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington, D.C. National Academy of Sciences, 7 ed., 242 p., 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Swine**. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 10 ed., 55 p., 1998.

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

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

QUINN, P. J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions?. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2004.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed., São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 57-82.

REVELL, S. G.; MROEDE, R. A.; An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

SAS. **The statistical analyse system for windows**: version 8. Cary, 1999-2001. CD-Rom.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 78-86, 1996.

SURAI, P., KOSTJUK, I., WISHART, G., MACPHERSON, A., SPEAKE, B., NOBLE, R., IONOV, I.; KUTZ, E. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Elements Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

XAVIER, G. C.; MAYMONE, A. C. M.; SOARES, P. C.; SILVA JÚNIOR, V. A.; GUERRA, M. M. P. Suplementação dietética com selênio e vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal. **Acta Animal Science**, v. 30, n. 1, p. 103-111, 2008.

ZANETTI, M. A.; NEUNHAUS, L. E. B.; SCHALCH, E.; MARTINS, J. H. Efeitos da Suplementação de Selênio e Vitamina E em Bovinos Leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 405-408, 1998.

Capítulo 2

Integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen criopreservado de touros jovens da raça Brangus suplementados com vitamina E e selênio

Spermatic membrane integrity and cryopreserved semen quality of young Brangus bulls supplemented with vitamin E and selenium

Resumo – Objetivou-se avaliar se a integridade da membrana espermática e a qualidade do sêmen criopreservado de touros jovens Brangus são alteradas pela suplementação com vitamina E e selênio. Foram utilizados 17 touros Brangus com média de 24 meses de idade e peso vivo médio de 454 kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E e selênio (GS, 400 UI de vitamina E/dia + 0,1 mg de selênio/kg de matéria seca ingerida) adicionados ao concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados pela gramínea forrageira *Panicum maximum* cv. Mombaça e recebendo concentrado fornecido diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E e selênio foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental foram realizadas quatro coletas de sêmen. O sêmen foi coletado pelo método da eletroejaculação. Posteriormente, procedeu-se o congelamento das amostras seminais, que foram armazenadas em botijão criogênico até o momento das análises. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Não foi observado efeito significativo ($p > 0,10$) da suplementação com vitamina E e selênio sobre motilidade, vigor, reação acrossômica e viabilidade espermática das amostras de sêmen criopreservadas. Por outro lado, foi observado efeito positivo ($p = 0,0213$) da suplementação com vitamina E e selênio sobre a integridade de membrana espermática antes e após o processo de criopreservação do sêmen. A suplementação oral com vitamina E e selênio, nos níveis utilizados, não influenciou os parâmetros de qualidade do sêmen

criopreservado, no entanto minimizou o efeito deletério da criopreservação sobre a integridade funcional da membrana espermática de touros jovens da raça Brangus.

Palavras chaves: antioxidantes, bovino, criopreservação, espermatozóide, estresse oxidativo

Summary – The work was carried through with the objective to evaluate if the sperm membrane integrity and the cryopreserved semen quality of young Brangus bulls are changed for supplementation with vitamin E and selenium. Seventeen Brangus bulls with 24 months of mean age and 454 kg of average live weight were used. The animals were divided randomly into two groups: control group (GC) and supplemented with vitamin E and selenium group (GS, 400 IU of vitamin E/day + 0.1 mg of selenium/kg of dry mater intake) added to concentrate. Each group was kept in separate areas formed by forage grass *Panicum maximum* cv. Mombaça and receiving balanced concentrate daily in amount of 4.5 kg/animal. The supplementation with vitamin E and selenium was carried out for 60 days. During the experimental period, four semen collections were realized. Semen was collected by the method of electroejaculation. Subsequently, the semen samples were frozen and stored in cryogenic cylinders until the time of analysis. The experiment was installed in a completely randomized design with repeated measures over time. There was no significant effect ($p>0.10$) of supplementation with vitamin E and selenium on motile, vigor, acrossomal reaction and sperm viability of cryopreserved semen samples. Moreover, positive effect was observed ($p=0.0213$) of supplementation with vitamin E and selenium on the sperm membrane integrity before and after the process of semen cryopreservation. The oral supplementation with vitamin E and selenium, at levels used, did not change the cryopreserved seminal quality, however minimized the deleterious effects of cryopreservation on the functional spermatic membrane integrity of young Brangus bulls.

Keywords: antioxidants, bovine, cryopreservation, spermatozoa, oxidative stress

1. Introdução

Durante o processo de criopreservação, os espermatozóides estão sujeitos a inúmeras situações que comprometem sua viabilidade e fertilidade, como a exposição à temperaturas não fisiológicas, desidratação e cristalização (Holt, 2000). Além destes, o estresse oxidativo é considerado como um dos principais fatores responsáveis pelas injúrias causadas ao espermatozóide durante o processo de congelamento (Watson, 2000).

O estresse oxidativo é definido como uma situação onde existe concentração elevada de espécies reativas ao oxigênio (EROs) devido sua hiperprodução ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes (Pasqualotto et al., 2001). Apesar de serem originadas pela atividade metabólica normal, as EROs responsáveis por este estresse, podem causar danos estruturais significantes às membranas e, principalmente, ao material genético dos espermatozóides (Aitken, 1995).

Já foi demonstrado que o processo de congelação/descongelação do espermatozóide bovino reduz em torno de 78% a concentração de glutathiona reduzida (GSH), que é uma enzima que participa dos mecanismos de defesa antioxidante (Bilodeau et al., 1999), o que poderia explicar alguns dos efeitos deletérios da crioconservação na viabilidade de gametas. Assim, passa a ser de suma importância a compreensão desses mecanismos de defesa antioxidante, e nesse contexto a vitamina E e o selênio passam a ter papéis fundamentais.

A vitamina E por sua lipossolubilidade, representa a principal defesa contra a lesão oxidativa das membranas celulares, sendo um eficiente inibidor da peroxidação lipídica (Leite & Sarni, 2003). A ação da vitamina E como antioxidante é suplementada pela presença da enzima glutathiona peroxidase, que catalisa a conversão de peróxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em alcoóis ou água, evitando assim que os peróxidos lesem componentes celulares. A glutathiona peroxidase por sua vez, contém o selênio como elemento de seu local ativo (Fettman, 2003).

Apesar da reconhecida importância dos antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo no sêmen, ainda há controvérsias sobre a importância de cada uma das enzimas envolvidas nesse processo. Com o intuito de melhorar os resultados do congelamento de sêmen bovino, este trabalho teve por objetivo, avaliar os efeitos da suplementação oral com Vitamina E e Selênio sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen criopreservado de touros da raça Brangus, mantidos em pastejo o período seco do ano.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno – GAP, localizada no município de Jaciara, Mato Grosso, durante o período de junho a setembro de 2008. O município de Jaciara encontra-se na altitude de 480 metros acima do nível do mar, latitude 16°02'30'' sul e longitude 54°59'45'' oeste. O clima da região é tropical quente e úmido, com duas estações bem definidas, verão chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). A temperatura média anual é 28°C, e pluviosidade média anual de 2000 mm (INMET, 2009).

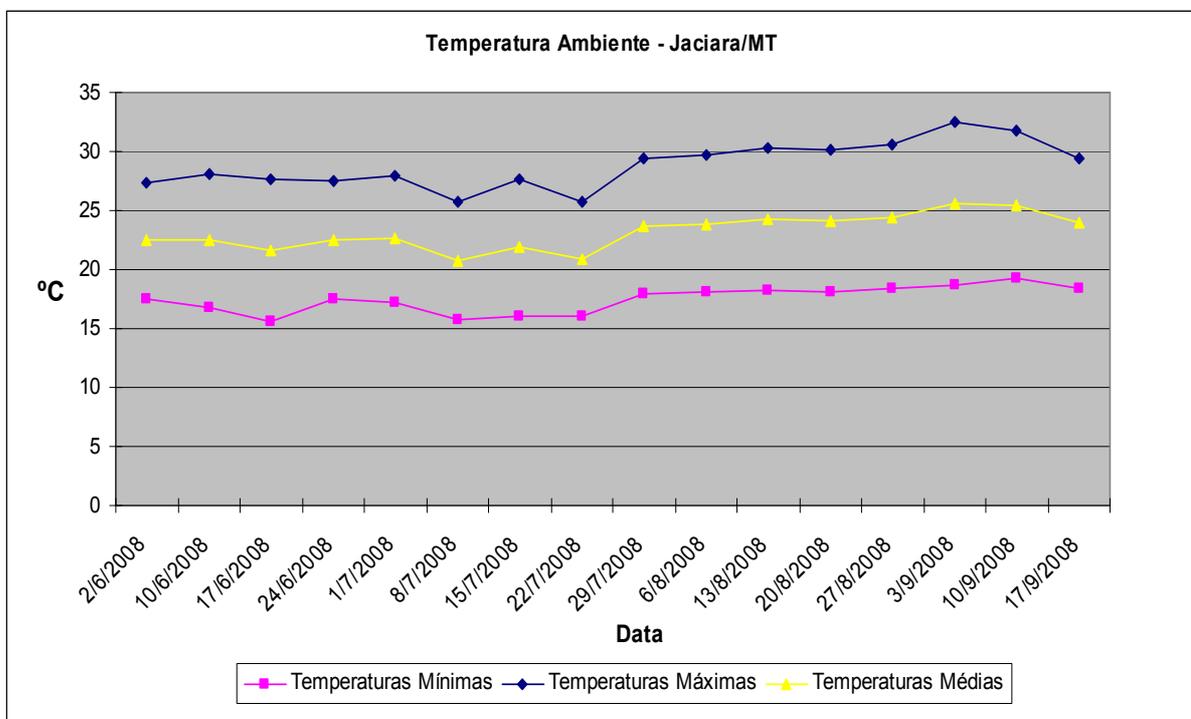


Gráfico 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média) da região de Jaciara, MT – 02/06/2008 – 17/09/2008.

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET)

Foram utilizados 17 touros da raça Brangus, com média de 24 meses de idade e peso vivo médio de 454 kg. Antes do experimento, os animais foram vermifugados (Doramecina, Dectomax®, Pfiser Saúde Animal) e tratados com ectoparasiticida (Cipermetrina + Ethion, Ciperthion®, Shering-Plough). E em seguida distribuídos aleatoriamente em dois grupos:

Grupo Controle (GC) - Sem suplementação de vitamina E e selênio, contendo 9 animais;

Grupo Suplementado (GS) – Suplementados com associação de vitamina E e selênio, constituído de 8 animais.

Cada grupo foi mantido separado em piquetes de 7,35 ha de área, formados pela gramínea *Panicum maximum* cv. Mombaça com disponibilidade de 3.015 kg de matéria seca (MS)/ha. Todos os animais experimentais receberam suplemento concentrado (Tabelas 1 e 2) fornecido uma vez ao dia (4,5 kg/animal). O suplemento concentrado foi formulado para ganho de peso de 1 kg/dia e água *ad libitum*.

Tabela 1. Composição porcentual do suplemento concentrado fornecido aos animais experimentais

Ingrediente	Quantidade (%)
Farelo de soja	27,50
Milho integral moído	67,25
Calcário	1,50
Flor de Enxofre	0,25
Uréia	0,50
Sal mineral 88*	3,00

*Níveis de garantia por kg do produto: Fósforo – 88g; Cálcio – 154g; Cobre – 1700mg; Enxofre – 12g; Cobalto – 200mg; Manganês – 1300mg; Zinco – 5000mg; Iodo – 130mg; Selênio – 20mg; Magnésio – 6mg; Sódio – 130mg.

Durante 60 dias do período experimental, os animais do GS receberam vitamina E (α -tocoferol, Agrocria Nutrição Animal) e Selênio (selenito de sódio, Agrocria Nutrição Animal) adicionados ao concentrado, de modo a fornecer 400 UI de vitamina E/animal/dia e 0,1mg de selênio/kg de MS ingerida.

Tabela 2. Análise bromatológica do suplemento concentrado e da gramínea forrageira

Nutrientes	Concentrado (%)	Gramínea forrageira (%)
Matéria seca (MS)*	90,00	37,99
Fibra em detergente neutro (FDN)**	29,40	67,57
Proteína Bruta (PB)**	21,00	5,85
Extrato etéreo (EE)**	2,50	1,05
Matéria Mineral (MM)**	8,43	11,60

*Com base na Matéria Natural

** Com base na Matéria Seca

O período experimental teve a duração de 75 dias. Neste período foram realizadas quatro avaliações espermáticas, sendo a primeira antes do início da suplementação (coleta 1), com 30 dias de suplementação (coleta 2), com 60 dias de suplementação (coleta 3) e a última 15 dias após o término da suplementação (coleta 4) com a finalidade de observar se haveria ou não efeito residual da suplementação com vitamina E e selênio sobre os parâmetros espermáticos. Antes do período de suplementação, os animais passaram por um período de adaptação ao manejo e ao concentrado de 10 dias.

Para obtenção dos ejaculados, empregou-se o método da eletroejaculação (Eletrovet®, Eletro Veterinária Ltda.) no qual os touros foram devidamente contidos em tronco apropriado, protegendo-os de possíveis lesões traumáticas. Para recepção dos ejaculados, foram utilizados sacolas plásticas descartáveis acopladas a um tubo Falcon previamente aquecido.

Imediatamente após a coleta, o tubo coletor foi colocado em banho-maria a 37°C, sendo mantido durante o processo de avaliação dos parâmetros macroscópicos e microscópicos imediatos do sêmen, quando então foi submetido ao processo de criopreservação.

Para o congelamento do sêmen, o diluente utilizado foi o tris-citrato-frutose-gema. A metodologia de congelamento utilizada foi a descrita Beconi et al. (1991). O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL e mantidas criopreservadas e armazenadas em botijão criogênico até o momento das análises. As análises foram realizadas no Laboratório de

Biotecnologia e Reprodução Animal (LABRA) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), localizado no município de Cuiabá.

O descongelamento do sêmen foi realizado colocando-se a palheta em banho-maria a 37°C por 30 segundos (Reichenbach et al., 2008). Logo após, o sêmen foi transferido para frascos *ependorf* de 1,5 ml previamente aquecidos, para então serem avaliados.

As avaliações espermáticas foram realizadas logo após a coleta (sêmen fresco) e após o descongelamento (sêmen criopreservado). Para a avaliação física do sêmen, os seguintes parâmetros foram considerados: motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático (CBRA, 1998).

Para avaliar a integridade da membrana espermática foram utilizados o teste hiposmótico, a coloração de eosina/nigrosina e a coloração tripla.

O teste de expansão hiposmótico foi realizado segundo a técnica descrita por Jeyendran et al. (1984). A solução hiposmótica utilizada foi de 150 mOsmol. Como controle, utilizou-se uma solução iso-osmótica de 300 mOsmol. O padrão de enrolamento de cauda utilizado foi o descrito por Fonseca et al. (2005).

A coloração de eosina/nigrosina foi realizada utilizando-se a metodologia proposta por WHO (1992). Esta metodologia permite avaliar a viabilidade espermática através da verificação da população de espermatozóides vivos e mortos, pois a eosina só é capaz de penetrar células com membrana plasmática lesada, corando-as em vermelho.

Para observação da reação acrossômica utilizou-se a técnica de Harayama et al. (1993), a qual consiste na coloração tripla dos espermatozóides capacitados. Para realização desta técnica, três corantes são empregados: o Trypan Blue que diferencia vivos e mortos; o Rosa Bengala que cora apenas células com acrossoma intacto e o Bismarck

Brown que cora a região pós-acrossomal de marrom servindo para aumentar o contraste e prevenindo colorações inespecíficas desta região pelo Rosa Bengala.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, sendo cada animal considerado como unidade experimental e cada uma das coletas de sêmen foi considerada como uma medida repetida no tempo. Em cada ejaculado foram comparados os valores pré e pós-congelamento. Os dados foram analisados através da ANAVA com um nível de significância de 10% pelo programa estatístico SAS (SAS, 2001). Algumas variáveis foram transformadas para serem analisadas como dados paramétricos. Os dados estão apresentados na forma de média e erro padrão da média dos dados originais.

3. Resultados e Discussão

Em relação às variáveis motilidade (MOT) e vigor espermático (VIG), não foi verificado efeito da suplementação com vitamina E e selênio e também não houve efeito da interação entre tratamento e criopreservação do sêmen ($p > 0,10$). Por outro lado, houve efeito da criopreservação sobre este conjunto de variáveis ($p < 0,0001$). Em ambos os tratamentos, o sêmen congelado/descongelado apresentou menores valores para MOT e VIG em relação ao sêmen fresco (Tabela 3).

Corroborando com os resultados obtidos neste experimento, Borges (2003) observou diminuição significativa ($p < 0,05$) nos percentuais de células móveis após o congelamento de sêmen bovino. A motilidade é um processo que requer maior demanda de energia e apresenta relação positiva com a demanda de ATP, cuja síntese está associada à capacidade funcional das mitocôndrias, sendo parte do estoque de energia consumido pelos espermatozóides durante o processo de criopreservação, resultando na perda prematura da motilidade espermática (Holt, 2000). Esta diminuição na motilidade espermática após o processo de

criopreservação também estaria sendo induzida pelas espécies reativas ao oxigênio produzidas durante o resfriamento, como sugerido por Beconi et al. (1991).

Tabela 3 – Média \pm erro padrão da média das variáveis motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), viabilidade espermática (EOS), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO), espermatozóides vivos com acrossoma intacto (TRI 1), espermatozóides vivos com reação acrossômica (TRI 2), espermatozóides mortos com acrossoma intacto (TRI 3), espermatozóides mortos com reação acrossômica (TRI 4), do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros Brangus suplementados com vitamina E e selênio (Vit E + Se) e não suplementados (controle)

Variáveis	Tempo			
	Sêmen Fresco		Sêmen Pós-congelamento	
	Controle	Vit. E + Se	Controle	Vit. E + Se
MOT (%)	60,83 \pm 3,20 ^a	61,13 \pm 2,56 ^a	16,45 \pm 3,38 ^b	22,95 \pm 4,29 ^b
VIG (0-5)	2,70 \pm 0,09 ^a	2,59 \pm 0,12 ^a	2,04 \pm 0,23 ^b	2,13 \pm 0,21 ^b
EOS (%)	77,12 \pm 2,02 ^a	79,31 \pm 2,28 ^a	76,83 \pm 2,07 ^a	76,99 \pm 3,73 ^a
HIPO (%)	26,70 \pm 2,89 ^b	35,71 \pm 2,98 ^a	8,74 \pm 1,41 ^d	11,36 \pm 2,32 ^c
TRI 1 (%)	91,64 \pm 1,28 ^a	88,74 \pm 1,84 ^a	15,00 \pm 4,08 ^b	16,66 \pm 4,73 ^b
TRI 2 (%)	0,51 \pm 0,10 ^a	0,57 \pm 0,15 ^a	0,13 \pm 0,05 ^b	0,33 \pm 0,30 ^b
TRI 3 (%)	5,84 \pm 0,99 ^b	7,52 \pm 1,22 ^b	83,47 \pm 4,08 ^a	81,33 \pm 4,92 ^a
TRI 4 (%)	2,04 \pm 0,67 ^a	3,16 \pm 0,82 ^a	1,38 \pm 0,15 ^a	1,66 \pm 0,31 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,10$), pelo Teste SNK.

A porcentagem de espermatozóides vivos, avaliados pelo teste de eosina/nigrosina, não diferiu entre os grupos controle (77,48 \pm 1,58) e suplementado com vitamina E e selênio (79,87 \pm 1,98) antes do processo de criopreservação. Também após o processo de criopreservação, não foi observado diferença entre os grupos controle (78,57 \pm 1,89) e suplementado (79,39 \pm 3,23) (Tabela 3). Estes resultados demonstram que não houve efeito ($p > 0,10$) da suplementação, do processo de criopreservação e da interação entre suplementação e criopreservação sobre a viabilidade espermática (EOS).

A manutenção da viabilidade espermática observada após o processo de criopreservação indica que o resfriamento foi realizado de modo adequado neste experimento. É durante o período de resfriamento que os fosfolipídios do diluidor interagem com os lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides, conferindo-lhes maior resistência ao choque térmico e auxiliando na preservação da integridade celular. Com os períodos de resfriamento e equilíbrio controlados, os espermatozóides ao invés de sofrerem choque térmico, sofrem modificações graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos, resultando em maior resistência celular durante o congelamento (Watson, 1995).

Contrariando os resultados obtidos no presente trabalho, Ruiz et al. (2007) trabalhando com amostras seminais obtidas pelo método da vagina artificial, de carneiros de 3 anos de idade da raça Merino, observaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade espermática após o processo de criopreservação (87,8% e 58,4% no sêmen fresco e pós-descongelamento, respectivamente). De acordo com Chatterjee & Gagnon (2001) as alterações da membrana plasmática induzidas pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio poderiam ser responsáveis pela diminuição da viabilidade espermática durante o processo de criopreservação.

Através dos resultados obtidos pelo teste de expansão hipo-osmótico, observou-se maior porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO) no GS em comparação ao GC tanto no sêmen fresco quanto no sêmen criopreservado ($p = 0,0213$). Também foi verificado efeito deletério da criopreservação sobre esta variável ($p < 0,0001$), no entanto a suplementação com vitamina E e selênio atuou minimizando este efeito (Tabela 3), demonstrando assim, efeito positivo da suplementação sobre a integridade da membrana espermática. Este fato poderia ser explicado pelos papéis desempenhados pelos nutrientes em questão, uma vez que a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular (Quinn, 2004) e o selênio age como componente da glutathiona peroxidase, enzima que atua

reduzindo os peróxidos formados (Zanetti et al., 1998), sendo importante para a manutenção da integridade estrutural do espermatozóide (Surai et al., 1998).

Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, Borges (2003) trabalhando com sêmen de bovinos, observou efeito negativo ($p < 0,05$) do processo de criopreservação sobre a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra.

Quando se avaliou os resultados obtidos pela coloração tripla, não foram observados efeitos ($p > 0,10$) da suplementação com vitamina E e selênio e da interação entre tratamento e criopreservação sobre o conjunto de variáveis formado pela porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto (TRI 1), espermatozóides vivos com reação acrossômica (TRI 2) e espermatozóides mortos com acrossoma intacto (TRI 3). E foi demonstrado efeito negativo da criopreservação sobre este conjunto de variáveis ($p < 0,10$) (Tabela 3).

Em relação à variável porcentagem de espermatozóides mortos com reação acrossômica degenerativa (TRI 4), não foi possível verificar efeito ($p > 0,10$) da suplementação, da criopreservação e da interação entre suplementação e criopreservação.

Neste experimento, a suplementação com vitamina E e selênio na dieta de touros foi utilizada para verificar se haveria redução dos danos de membrana plasmática e da queda na qualidade do sêmen decorrentes do processo de criopreservação. Quando as células são congeladas, elas estão sujeitas a inúmeras situações que comprometem sua viabilidade como a exposição a temperaturas não fisiológicas, desidratação, alterações na membrana, cristalização e estresse oxidativo (Holt, 2000; Watson, 2000). Também já foi demonstrado que o processo de congelação/descongelação reduz os mecanismos de defesas antioxidantes nos espermatozóides bovinos (Bilodeau et al., 1999).

Na literatura não se tem encontrado trabalhos que avaliaram a ação conjunta do selênio com a vitamina E sobre os parâmetros do sêmen criopreservado de bovinos. Bartle et al. (1980) não encontraram alterações na motilidade espermática e no percentual de

acrossomas íntegros, no sêmen criopreservado de touros da raça Holandesa tratados com selênio via injeção intra-muscular de selenito de sódio. Hatamoto (2004) não observou efeito da suplementação oral com vitamina E sobre a motilidade espermática, vigor, integridade de membrana e percentual de acrossomas íntegros no sêmen criopreservado de cães.

De acordo com o NRC (1996) a exigência diária de selênio para bovinos de corte nas fases de crescimento e terminação, é de 0,1 mg/kg de MS ingerida. Levando-se em consideração o peso vivo médio e a categoria dos animais deste experimento, estimou-se o consumo de matéria seca (CMS) e obteve-se a quantidade de 12 kg de CMS/dia. Sendo assim, o requerimento diário de selênio para estes animais foi de 1,2 mg. Já o requerimento diário de vitamina E para a categoria animal avaliada neste experimento, varia entre 50 a 100 UI de vitamina E (NRC, 1996). No presente trabalho, os dois grupos de animais estudados foram mantidos em sistema de pastejo e recebendo 4,5 kg de concentrado fornecido diariamente. Deste modo para se obter as estimativas da quantidade total de vitamina E e de selênio fornecida aos animais, estimou-se as quantidades destes nutrientes provenientes da ingestão de forragem e do concentrado (McDowell, 1999; NRC, 1996).

Logo, o total de vitamina E e selênio fornecido aos animais experimentais foi obtido em função da soma dos valores estimados destes nutrientes na forragem e de suas quantidades ingeridas no concentrado, e no caso do GS, foram acrescidas as quantidades provenientes da suplementação. Para vitamina E, não foi considerada quantidade proveniente da gramínea forrageira, pois segundo o NRC (1996) não são encontrados valores significativos de vitamina E na maioria das gramíneas.

Baseando-se nas estimativas calculadas e considerando a biodisponibilidade do selenito de sódio em torno de 40%, foi observado que os animais do GC receberam diariamente 58 UI de vitamina E e 1,98 mg de selênio (Tabela 4), ultrapassando portanto os níveis de requerimentos destes nutrientes para a categoria animal estudada. Já os animais do

GS receberam diariamente 458 UI de vitamina E e 2,46 mg de selênio (Tabela 4), ou seja, níveis de vitamina E quatro vezes maiores que o exigido, e níveis de selênio duas vezes maiores que o requerido. Este fato ajudaria explicar a ausência de efeito da suplementação na maioria das variáveis estudadas, uma vez que em ambos os grupos avaliados, as exigências tanto de vitamina E quanto de selênio estavam sendo supridas.

É importante ressaltar que a estratégia de manejo nutricional utilizada no presente experimento não é encontrada comumente na maioria das propriedades brasileiras, onde os touros são mantidos em sistema de pastejo extensivo e, em alguns casos suplementados apenas com mistura mineral.

Tabela 4- Consumo estimado diário de vitamina E e selênio na gramínea forrageira, no concentrado, na gramínea forrageira + concentrado (situação do grupo controle, GC) e na gramínea forrageira + concentrado + suplementação (situação do grupo suplementado com vitamina E e selênio, GS) dos animais experimentais

Fonte	Vitamina E (UI)	Selênio (mg)
Gramínea forrageira	-----	0,5285
Concentrado	58	1,4517
Gramínea forrageira + Concentrado (GC)	58	1,9802
Gramínea forrageira + Concentrado + Suplementação (GS)	458	2,4600

De acordo com os resultados obtidos, a suplementação com vitamina E e selênio, nos níveis utilizados e nas condições de manejo nutricional do presente experimento, não influenciou os parâmetros qualitativos do sêmen criopreservado, no entanto minimizou o efeito deletério da criopreservação sobre a integridade funcional da membrana espermática de touros jovens da raça Brangus.

Agradecimentos

A todos que auxiliaram no desenvolvimento do projeto, a Fazenda Sereno - GAP, a Agrocria Nutrição Animal, a toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), a CAPES/PROCAD e a Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado concedida.

4. Referências

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

BARTLE, J. L.; SENGER, P. L.; HILLERS, J. K.; Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 1007-1013, 1980.

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

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIZARD, M.A. Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 102-110, 1999.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 451-458, 2001.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998, 49 p.

FETTMAN, M. J. Vitaminas lipossolúveis. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica veterinária**, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 571-586.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILLI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hipoosmotic swelling tes in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 135-144, 2005.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.

HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**. 2004, 180 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.

INMET-Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/>, Acessado em: 06 de maio de 2009.

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

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição e Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition**. New York: Academic press, 486 p., 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington, D.C. National Academy of Sciences, 7 ed., 242 p., 1996.

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

QUINN, P. J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions?. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2004.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed., São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 57-82.

RUIZ, L. G.; SANTIANI, A. A.; SANDOVAL, R. M.; HUANCA, W. L.; DELGADO, A. C.; CORONADO, L. S.; ALZAMORA, C. P. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) em La criopreservación de sêmen ovino empleando um dilutor em base a tris. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.

SAS. **The statistical analyse system for windows**: version 8. Cary, 1999-2001. CD-Rom.

SURAI, P., KOSTJUK, I., WISHART, G., MACPHERSON, A., SPEAKE, B., NOBLE, R., IONOV, I.; KUTZ, E. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Elements Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

ZANETTI, M. A.; NEUNHAUS, L. E. B.; SCHALCH, E.; MARTINS, J. H. Efeitos da Suplementação de Selênio e Vitamina E em Bovinos Leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 405-408, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Levando-se em consideração os resultados obtidos, as condições de manejo nutricional e os níveis utilizados neste trabalho, pode-se concluir que a suplementação dietética com vitamina E e selênio:

- Não alterou os parâmetros de qualidade do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros jovens da raça Brangus;
- Por outro lado, promoveu efeito positivo sobre a integridade funcional da membrana espermática tanto no sêmen fresco quanto no sêmen criopreservado dos animais estudados;
- Minimizou os efeitos deletérios provocados pelo processo de criopreservação sobre a integridade da membrana espermática;
- Mais estudos são necessários para que o efeito da vitamina E e selênio sobre os parâmetros reprodutivos de touros seja melhor esclarecido.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)