

WALTER AUGUSTO DOS SANTOS MARINHO

Suplementação oral com vitamina E para touros Brangus: Integridade da membrana espermática, qualidade seminal a fresco e pós-congelamento

Cuiabá – MT
Março, 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

WALTER AUGUSTO DOS SANTOS MARINHO

Suplementação oral com vitamina E para touros Brangus: Integridade da membrana espermática, qualidade seminal a fresco e pós-congelamento

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
Orientador: Prof. Dra. Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis

Co-Orientador: Prof. Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis

Cuiabá – MT
Março, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

M339s Marinho, Walter Augusto dos Santos
Suplementação oral com vitamina E para touros
Brangus: integridade da membrana espermática, qua-
lidade seminal a fresco e pós-congelamento / Walter
Augusto dos Santos Marinho. – 2009.
70p. ; 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. Touros Brangus
4. Gado bovino – Pecuária – Zootecnia
5. Bovino – Pecuária – Zootecnia
6. Vitamina E – Suplemento alimentar – Touros

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Aluno: WALTER AUGUSTO DOS SANTOS MARINHO

Título: Suplementação oral com vitamina E para touros Brangus: Integridade da membrana espermática, qualidade seminal a fresco e pós-congelamento

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

Aprovado em: 02/04/2009

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr.:Joanis Tilemahos Zervoudakis
(FAMEV/UFMT – Co-orientador)

Prof. Dr.Eduardo Henrique Bevitori Kling de Moraes
(UFMT/Campus Sinop – Membro)

Prof. Dr. Fernando de Paula Leonel
(Universidade Federal de São João Del Rei - Membro)

Dedicatória

As minhas mães “Helena e Sandra” e meu pai Milton pelo apoio;

**A minha avó Layde Therezinha Hermes (*in memorian*) que sempre orou por mim e
ao meu tio Fernando (*in memorian*) por sempre terem torcido pelo meu sucesso,
vocês fazem falta na minha vida**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pela minha família e amigos que são as coisas mais importantes que tenho.

As minhas mães Sandra e Helena, obrigado pelo carinho, pelos cuidados e ensinamentos, sempre buscando o melhor pra mim e me ensinaram a ser uma pessoa digna.

Ao meu pai Milton pelo exemplo de força e perseverança, que sempre me ensinou a valorizar a importância do trabalho e dedicação.

À minha irmã Alessandra e seu marido Noslen, pelo apoio sempre e por terem me dado sobrinhos lindos (Noslen Filho e Victória) que amo muito, obrigado pelas palavras de carinho nos momentos difíceis.

À minha irmã Thaís, agradeço por todo o carinho e o amor que temos um pelo outro.

Aos meus tios Alba, Claudio, Fernandão e tio Tônico Agradeço pelo carinho e pelo estímulo.

Tia Ângela e Leonardo agradeço pelos bons conselhos e o apoio que sempre me deram.

Meus primos Thiago e Fernanda pessoas maravilhosas que sempre torceram por mim.

À Daiany agradeço pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis e sempre ter me apoiado em todos os momentos, obrigado “Nega”.

À Universidade Federal do Mato Grosso e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, responsáveis pela minha formação profissional com um excelente quadro de professores nos propiciando excelentes condições de aprendizado.

À professora Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis agradeço pela orientação e pela amizade, a ela tenho muita admiração que com muita sabedoria, competência e paciência nos ensinou. Foi uma pessoa muito importante na minha vida, serei sempre grato.

Ao amigo e co-orientador professor Joanis Tilemahos Zervoudakis, agradeço pelo apoio na execução e na elaboração desse trabalho. Sempre nos apoiando com seu jeito bem humorado e competência profissional.

Aos professores Luciano Cabral, João Caramori, Joadil Abreu e Anselmo, agradeço pela ajuda, estando sempre dispostos a ajudar a qualquer momento.

À fazenda Sereno por ter cedido os animais e toda estrutura necessária para realização desse projeto, também aos funcionários: Tonho, Baixinho, Sérgio, Paulo, Aldo, que não mediram esforços em nos auxiliar durante as coletas e durante todo o experimento. Agradeço também ao médico veterinário e Administrador da Fazenda Sr. Santana por ter nos

recepcionado e por ter nos dado toda estrutura necessária para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

Aos grandes amigos Bruno “Jaum, The Jack” e Guto “Pescotapa”, integrantes da equipe cachimbo, não existiu problemas que não tivesse solução pra essa equipe, foi uma honra ter trabalhado com pessoas tão capacitadas.

Aos estagiários Alexandre Gozer “Nhônho”, Júlia , Moacir “Seco, Balancin, Sarrafo, Fiapo, etc...”, Marília, Eleonora “Chefe do laboratório, Relaxo” .

Leonardo e Renatinha pela ajuda na análise das forragens. Aos amigos de mestrado Lourival, Giselde, Marcos, Jonathan, Camila, Isis, Cassiano, Lorenzo, Alisson, Carol, Ronaldinho, Danillo, Nelcino, Flavinha, Vivian, João Paulo, Rafaela, João Marcos.

Aos secretários e também amigos Douglas “Bombomzinho” e a Elaine.

A FAPEMAT pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

MARINHO, W. A. S. **Suplementação oral com Vitamina E para touros Brangus: Integridade da membrana espermática, qualidade seminal a fresco e pós-congelamento.** 2009 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2008.

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno, localizada em Jaciara-MT, com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática e qualidade seminal de touros que receberam suplementação com vitamina E. Foram utilizados 16 touros Brangus com idade e peso médio respectivamente de 24 meses e 462,2 Kg distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. Os tratamentos foram: grupo controle (GC) e grupo que recebeu suplementação com vitamina E (GE- 400 UI de vitamina E/dia) adicionados ao concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados por pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça e receberam concentrado diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental, foram realizadas 4 coletas de sêmen sendo: antes do início da suplementação; com 30 e com 60 dias de suplementação, e 15 dias após o término da suplementação. O sêmen foi coletado por eletroejaculação, em tubo graduado, mensurou-se o volume, cor e aspecto. Em seguida foram avaliados motilidade, vigor e turbilhonamento. Realizou-se o teste hiposmótico para integridade de membrana, coloração eosina/nigrosina, Pope e coloração tripla. Foram congeladas cinco palhetas de sêmen de cada animal em cada coleta, para isso utilizou-se o meio diluidor tris gema-citrato de sódio mantido em botijão criogênico. Após o descongelamento do sêmen foram avaliados motilidade, vigor, Pope, hiposmótico, eosina e coloração tripla. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo e os dados analisados por meio de ANOVA e do teste SNK com nível de significância de 10%, com auxílio do programa estatístico SAS. Houve efeito da suplementação ($p=0,0367$) para consistência testicular; vigor ($p=0,0183$); defeito menor ($p=0,0617$). Não foram encontradas diferenças ($p>0,10$) para as variáveis: volume, motilidade, concentração, morfologia, integridade acrossomal, viabilidade espermática e integridade de membrana. Para o sêmen pós-congelamento, foi observado efeito da suplementação com vitamina E apenas para a coloração eosina/nigrosina, havendo melhoria na viabilidade espermática dos animais do GE. Para vigor houve interação ($p=0,0878$) tratamento x tempo, observou-se que o GE teve menor queda de vigor que o GC pós-congelamento. Não se observou efeito de tratamento ($p>0,10$) para POPE, teste hipo-osmótico e coloração tripla. Com base nos parâmetros avaliados e os resultados obtidos nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que a suplementação oral com vitamina E (400UI/dia) não melhorou a qualidade seminal nem a integridade da membrana espermática de touros. Para o sêmen fresco conclui-se que esse nível de suplementação foi benéfico para o sêmen submetido ao processo de criopreservação indicando melhoria na proteção da membrana espermática ao estresse oxidativo aos danos de membrana causados pelo congelamento do sêmen.

Palavras-chave: antioxidantes, estresse oxidativo, viabilidade espermática

ABSTRACT

MARINHO, W. A. S. **Vitamin E oral supplementation for Brangus bulls: spermatic membrane integrity and quality of cool and post-freezing semen.** 2008 68f. Dissertation (Master in Animal Science), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2008.

The experiment was realized in Fazenda Sereno, located in Jaciara-MT, objectified to evaluate the plasmatic membrane integrity and seminal quality of vitamin E supplemented bulls. Were used 16 Brangus bulls 24 months average age and 462,2kg average weight fortuitous distributed in two treatments. The treatments were: controlled group(GC) and vitamin E supplemented group (GE- 400UI of vitamin E/day) added to the concentrate. Each group was kept separated in poles formed for Panicum maximum cv. Mombaça pasture and receiving 4.5kg/animal of concentrated daily. The vitamin E supplementation was accomplished for 60 days. During the experimental period, 4 semen collections were realized being: before the supplementation beginning; with 30 and 60 days of supplementation, and 15 days after the supplementation ending. The semen was collected by electroejaculation, in graduated pipe, surveying the volume, color and aspect. After that motility, vigor and mass had been evaluated. It is accomplishes the hiposmotic test for membrane integrity, eosine/nigrosine coloration, Pope and triple coloration. Were freezing five semen straws of each animal in each collect, using diluents of tris-yolk sodium citrate kept in cryogenic botijão and analyzed later. After the semen melting were evaluated the motility, vigor, Pope, hiposmotic, eosine and triple coloration. The experiment was installed in casual entirely delineation with repeated measures in time and the data had been analyzed through the ANOVA and SNK test with a significance level of 10% with assist of the statistical program SAS. Was found treatment effect ($p=0.0367$) for testicular consistence; vigor ($p=0.0183$); lesser defect ($p=0.0617$). Were not found differences ($p>0.10$) for the variables: volume, motility, concentration, morphology, acrosomal integrity, spermatic viability and membrane integrity. For the post-freezing semen, was observed treatment effect only for eosine/negrosine coloration, there was betterment on spermatic viability of GE animals. For vigor there was treatment x time interaction ($p=0.0878$), observed that the GE had lesser vigor decrease than GC post-freezing. Did not observed treatment effect ($p>0.10$) for POPE, HIPO and TRIPAN. Based in evaluated parameters and the obtained results on experimental conditions of the present work, conclude that the 400 UI/day oral vitamin E supplementation don't have influence on seminal quality nor in spermatic membrane integrity of bulls. To the cool semen conclude that this supplementation level was benefic for the semen submitted to the cryopreservation process indicating a better protection of spermatic membrane to the oxidative stress and to the membrane damages caused by semen freezing.

Keywords: antioxidants, oxidative stress, sperm viability

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina tri fosfato
CAT	Catalase
°C	Celsius
Cu ⁺	íon cobre monovalente
DNA	ácido desoxirribonucléico
ROS	espécies reativas ao oxigênio
GPx	glutathione peroxidase
GRD	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
G6PD	glucose-6-fosfato desidrogenase
H ⁺	próton de hidrogênio
H ₂ O	molécula de água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Kg	Quilograma
Km	Quilometro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
O ₂	molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	radical hidroxila
SOD	superóxido dismutase
UI	Unidade internacional
pH	Potencial hidrogeniônico
Zn ²⁺	Zinco
Mn ²⁺	Manganês

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pela SOD..... 24

Figura 2: Conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em água (H_2O) e O_2 26

CAPÍTULO 1:

Figura 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, máxima e média) da região de Jaciara, MT - 02/06/2008 à 17/09/2008.....38

CAPÍTULO 2:

Figura 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, máxima e média) da região de Jaciara, MT - 02/06/2008 à 17/09/2008.....58

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

	Página
Tabela 1. Composição porcentual do suplemento concentrado fornecido aos animais experimentais.....	39
Tabela 2. Composição químico-bromatológica do suplemento concentrado e da forragem utilizada na alimentação dos animais experimentais com base na matéria natural.....	38
Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média das variáveis: consistência (CONS), volume (VOL), motilidade (MOT), vigor (VIG), concentração (CONC), total do ejaculado (TOTEJA), defeitos menores (DEFME), defeitos maiores (DEFMA), defeitos totais (DEFTOT) das amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados com vitamina E (GE).	44
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 (GE).....	47
Tabela 5 - Consumo estimado diário de vitamina E na forragem (Mombaça), no concentrado, no mombaça + concentrado (situação do grupo controle, GC) e no mombaça + concentrado + suplementação (grupo suplementado com vitamina E, GE) dos animais experimentais.....	49

Capítulo 2

Tabela 1. Composição porcentual do suplemento concentrado fornecido aos animais experimentais.....	59
Tabela 2. Composição químico-bromatológica do suplemento concentrado e da forragem utilizada na alimentação dos animais experimentais com base na matéria natural	59
Tabela 3 – Média ± erro padrão da média das variáveis motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), viabilidade espermática (EOS), integridade de acrossomo (POPE); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO), espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (TRI-1), espermatozóides vivos com reação acrossômica (TRI-2), espermatozóides mortos com acrossoma íntegro (TRI 3) do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros Brangus suplementados com vitamina E (GE) e não suplementados (controle- GC).	63
Tabela 4 - Consumo estimado diário de vitamina E na forragem (Mombaça), no concentrado, no mombaça + concentrado (situação do grupo controle, GC) e no mombaça + concentrado + suplementação (grupo suplementado com vitamina E, GE) dos animais experimentais.....	66

SUMÁRIO

	Página
1.Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1. Membrana Espermática e Fertilidade.....	16
2.2. Radicais Livres e Espécies Reativas ao Oxigênio.....	17
2.3. Estresse oxidativo.....	19
2.4. Estresse Oxidativo e Infertilidade.....	20
2.5. Criopreservação x ROS.....	21
2.6. Mecanismos de Defesa Antioxidante.....	22
2.6.1. Controle Enzimático.....	24
2.6.1.1. Superóxido Dismutase (SOD).....	24
2.6.1.2. Glutathiona Peroxidase (GPX).....	25
2.6.1.3. Catalase (CAT).....	26
2.7. Controle não Enzimático.....	26
2.7.1. Vitamina E.....	26
2.8. Bibliografia.....	29
3. Capítulo 1. Suplementação oral com vitamina E: integridade da membrana espermática e qualidade seminal em touros jovens suplementados à pasto.....	33
3.1. Introdução.....	36
3.2. Material e Métodos.....	37
3.3. Resultado e Discussão.....	43
3.4. Referências	50
4. Capítulo 2. Suplementação oral com vitamina E para touros : Integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen pós-congelamento	53
4.1. Introdução.....	56
4.2. Material e Métodos.....	57
4.3. Resultados e Discussão.....	62
4.4. Referências.....	68
4.4. Conclusões Gerais.....	70

1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo e os índices de produção e produtividade melhorando consideravelmente nos últimos anos, porém a pecuária de corte no país caracteriza-se por baixos índices de produtividade, principalmente devido aos baixos índices reprodutivos do rebanho, destacando-se os longos intervalos entre partos (SCHAFHÄUSER Jr. e GAEDE, 1997; OLIVEIRA et al., 2006).

O touro tem a maior responsabilidade nos índices reprodutivos quando comparado a fêmea. No Brasil em torno de 95% das vacas e novilhas em condições de reprodução são servidas pela monta natural, restando menos de 5% para o serviço de inseminação artificial (FONSECA, 2003).

Os efeitos deletérios das condições ambientais em regiões tropicais sobre o aspecto reprodutivo são mais relevantes nos touros quando comparado a vaca, pois se uma vaca falha por algum motivo perde-se um bezerro, já quando o touro falha há uma perda potencial de 25 a 50 bezerros para cada 100 vacas (Carrilo, 1988¹; citado por NICHII, 2003).

O clima tropical, por apresentar altas temperaturas facilita o aparecimento de alterações no epitélio seminífero, com conseqüentes efeitos na qualidade do sêmen. A avaliação potencial da fertilidade do macho está centrada nas características seminais do reprodutor, sendo importante a qualidade do espermatozóide na fertilização e no desenvolvimento embrionário (ROMITTO, 2003).

Em condições de Brasil Central, a elevação da temperatura ambiental altera o mecanismo de termorregulação testicular que acarreta degeneração, causa principal de subfertilidade e infertilidade em reprodutores. Uma das hipóteses para a diminuição da qualidade seminal em animais submetidos ao estresse térmico seria o aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (GABALDI e WOLF, 2002; ROMITTO, 2003).

Os espermatozoides são células altamente suscetíveis aos danos peroxidativos, pois contém em sua membrana plasmática alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e esses danos causados em sua membrana

¹ CARRILO, J. Manejo de un rodeo de cría. Buenos Aires: 2ª ed.,INTA CERBAS EEA Balcarce,1998,194 p.

espermática, ocorrem devido ao estresse oxidativo causado pela geração de ROS. A membrana espermática não possui capacidade de reparar os seus danos peroxidativos, o que leva a significativa geração de ROS, principalmente ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, grandes responsáveis por danos na viabilidade do espermatozóide reduz a motilidade espermática e diminui a capacidade fertilizante dos espermatozóides (ALVAREZ e MORAES, 2006; TREMELLEN, 2008).

Com o objetivo de diminuir os danos na membrana espermática causados pelo estresse oxidativo e melhorar a eficiência reprodutiva, tem-se testado a suplementação com substâncias antioxidantes, entre eles as vitaminas E, C e A (CARVALHO et al., 2002).

Os anti-oxidantes restabelecem o balanço entre as moléculas oxidantes e anti-oxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel, e atua inibindo os processos de peroxidação de lipídios *in vivo*. Estas substâncias agem como doadores de hidrogênio (H^+) para o radical peroxila interrompendo a reação em cadeia de geração de ROS, dessa forma diminui o estresse oxidativo das membranas espermáticas (BARREIROS et al, 2006).

Contudo, constata-se a necessidade de maiores estudos envolvendo a suplementação com vitamina E para touros e sua influência no controle dos danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo, tendo em vista a escassez de estudos com machos, que aborde os efeitos deletérios das ROS sobre a viabilidade espermática de bovinos. Assim, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito da suplementação oral com vitamina E sobre a qualidade e viabilidade espermática de touros mantidos em sistema de suplementação a pasto durante o período seco do ano.

2. Revisão de Literatura

2.1 Membrana Espermática e Fertilidade

Todas as células são circundadas por uma membrana plasmática que a delimitam, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a membrana plasmática determina a composição do citoplasma celular e, tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (CUNHA, 2002).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide sendo o componente mais externo. Do mesmo modo que na membrana plasmática de células somáticas, os lipídeos são distribuídos assimetricamente sobre a bicamada de lipídeos na membrana plasmática do espermatozóide (FLESCH e GADELLA, 2000).

A membrana espermática é uma estrutura altamente especializada, que assume papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação, reação acrossomal e penetração no oócito. Portanto é essencial uma membrana espermática intacta e funcional para que esses processos fundamentais à fertilização ocorram (CUNHA, 2002; ALVES et al., 2005).

Embora haja variação considerável entre as diferentes espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática do espermatozóide contém 70% de fosfolipídeos, 25% lipídeos neutros e 5% de glicolipídeos (FLESCH e GADELLA, 2000). A membrana é composta por lipídeos e proteínas e o fato de não serem covalentes, conferem a mesma uma característica de fluidez (BORGES, 2003).

Fatores externos às células espermáticas, tais como, alterações na composição, variações de pH, oxidação, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas, limitando com isso a função fertilizante dos espermatozóides (CUNHA, 2002).

A suscetibilidade dos espermatozóides aos danos peroxidativos ocorrem devido suas membranas serem compostas por grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Esses danos peroxidativos são induzidos pela formação das ROS, que é uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozóides (ALVAREZ e MORAES, 2006).

2.2. Radicais Livres e Espécies Reativas ao Oxigênio

O oxigênio foi descoberto no ar pelo químico inglês Joseph Priestley em 1774. Embora seja uma molécula essencial para os animais e plantas que utilizam energia oriunda da oxidação das moléculas biológicas, o oxigênio também pode ser potencialmente tóxico. De fato, sob certas condições, o oxigênio pode reagir com moléculas orgânicas através de processos bioquímicos e, assim, levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre os quais se destacam os intermediários altamente reativos, os radicais livres (GRIVEAU e LANNOU, 1997).

As ROS são radicais livres e oxidantes altamente reativos e incluem: radicais peróxido, óxido nítrico, superóxido (O_2^-), oxigênio livre (O_2), peroxinitrito, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH^\cdot). Os radicais superóxido e hidroxila possuem elétrons livres em sua órbita exterior sendo, portanto, altamente reativos e oxidantes. As ROS podem ser produzidas por espermatozoides imaturos e leucócitos. Na fisiologia normal dos espermatozoides, baixos níveis de ROS são benéficos, pois estimulam a capacitação espermática, e promovem a reação acrossômica. Em contraste, altos níveis de ROS são nocivos levando a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides e a fragmentação do DNA. O aumento da peroxidação lipídica está associado com a diminuição da motilidade e capacidade de fusão do espermatozoide com o oócito (WICKENS, 2001; MARTINS et al., 2004; WEN, 2006).

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O oxigênio é fundamental para o metabolismo celular e a produção de energia. Contudo, o metabolismo celular de oxigênio também produz ROS, que têm o potencial de causar danos significativos aos tecidos biológicos (WICKENS, 2001). A maior parte da energia é produzida pela reação controlada enzimaticamente de oxigênio com hidrogênio na fosforilação oxidativa ocorrendo dentro da mitocôndria durante o metabolismo oxidativo (TREMELLEN, 2008).

As ROS podem ser formadas de várias maneiras, mas os principais sítios de formação são as mitocôndrias, onde o oxigênio é reduzido em reações seqüenciais para produção de água (WICKENS, 2001).

As ROS são compostos instáveis com meia vida curta e quando presentes intracelularmente podem afetar alguns processos celulares, além de degradar primariamente as estruturas da membrana. A razão dessa fragilidade é a alta proporção de ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídios da membrana. A degradação das estruturas da membrana pelas ROS é denominada lipoperoxidação (GRIVEAU e LANNOU, 1997).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, sendo a membrana um dos componentes mais atingidos pela lipoperoxidação, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade das mesmas. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GUIMARÃES et al., 2007) .

Em condições normais, as ROS são produzidas e os seus efeitos são contrabalançados pelo sistema antioxidante endógeno. Quando a geração de ROS excede os mecanismos de defesa, o estresse oxidativo é gerado e contribui para a lesão celular reversível ou irreversível (GUIMARÃES et al., 2007). As ROS são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, portanto é necessário que haja uma concentração fisiológica ideal para o funcionamento normal das células (DROGE, 2002).

Os efeitos adversos das ROS na reprodução em mamíferos têm sido estudados há mais de três décadas e sua relação com infertilidade tenha sido relatada na literatura (SILVA, 2006).

Os fatores responsáveis pela excessiva produção de espécies reativas ao oxigênio pelos espermatozóides ainda não estão bem esclarecidos. Em alguns casos a presença de xenobióticos gera radicais livres tóxicos para os espermatozóides. Outro fator seria a falha nos mecanismos celulares que regulam a geração de radicais livres por essas células (AITKEN e KRAUSZ, 2001).

2.3. Estresse Oxidativo

Os danos celulares causados nos espermatozóides são resultado de um desequilíbrio entre a geração de ROS e seu potencial antioxidante. Normalmente nas gônadas e no fluido seminal são mantidos níveis adequados dos antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) peroxidase e redutase, que são responsáveis por manter o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. No entanto o desequilíbrio pode ocorrer, sendo este denominado como estado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica que causa danos às membranas espermáticas alterando sua funcionalidade, causando disfunção espermática, diminuição da motilidade e fertilidade (SIKKA, 1996; AITKEN, 1997; DROGE, 2002).

As principais fontes de produção de radicais livres no sêmen são os leucócitos e os espermatozóides. A produção de ROS é um dos principais mecanismos pelo qual os neutrófilos destroem patógenos, sendo uma possível fonte geradora de estresse oxidativo no sêmen, estudos sobre a relação entre a presença de leucócitos no sêmen e a ocorrência do estresse oxidativo ainda não são conclusivos, porém alguns autores relatam correlação positiva entre a quantidade de leucócitos e a produção de ROS no sêmen (TREMELLEN, 2008).

A produção de ROS por espermatozóides parece estar associada com a retenção do citoplasma residual na peça intermediária (gota proximal) após a espermição, o aparecimento de gota proximal nos espermatozóides é observado no ejaculado de animais submetidos ao estresse térmico. A razão pela qual as células com um excesso de citoplasma residual apresentam altas taxas de geração de ROS está relacionada com a presença de outra enzima citoplasmática, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Esta enzima mantém os níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que por sua vez, é uma fonte de elétrons estimulando a produção de ROS. (BARTH e OKO, 1989; AITKEN et al., 1997; AITKEN, 1999).

O estresse oxidativo é responsável pela redução na fertilidade dos espermatozóides, no entanto os mecanismos responsáveis por essas alterações ainda não estão bem esclarecidos. Uma provável causa no aumento da geração de ROS é o aumento da temperatura testicular, situação comum em clima tropical, principalmente na região centro-oeste do Brasil que se caracteriza por altas

temperaturas ambientais, aumentando a ocorrência de estresse térmico (GABALDI e WOLF, 2002; ROMITTO, 2003).

O estresse térmico predispõe ao estresse oxidativo, pois com o aumento da temperatura testicular há um aumento na atividade de NADPH oxidase e aumento na disponibilidade de metais de transição. Deficiências dietéticas também podem estar associadas com a diminuição nos mecanismos de defesa antioxidantes (AITKEN, 1999). Quando os testículos são submetidos a uma elevação de temperatura, ocorre aumento no metabolismo causando hipóxia nesses tecidos e aumento na produção de ROS, levando a alterações espermáticas (SETCHELL, 1998).

2.4. Estresse Oxidativo e Infertilidade:

O estresse oxidativo é responsável pelos danos causados ao DNA, que aceleram a apoptose de células germinativas, diminuindo dessa forma a quantidade de espermatozoides e reduzindo a qualidade espermática. Os danos peroxidativos na membrana espermática promovem aumento nos defeitos espermáticos, redução da motilidade e conseqüentemente redução na fertilidade do espermatozoide (AITKEN, 1999; SHARMA et al., 1999).

Os espermatozoides são especialmente suscetíveis aos danos peroxidativos porque contêm elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, não apresentam capacidade para repará-la e possuem significativa capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, grandes responsáveis por danos na viabilidade e fertilidade de espermatozoides (AITKEN et al, 1997; ALVAREZ. e MORAES, 2006).

A peroxidação lipídica da membrana espermática faz com que haja alteração nas características de fluidez da membrana espermática levando a uma redução na motilidade espermática, provavelmente devido a uma rápida perda de ATP intracelular, ocasionando danos no axonema, diminuição na viabilidade espermática, aumento dos defeitos de morfologia na região da peça intermediária afetando a capacidade de fusão das membranas, importante para a exocitose durante a reação acrossomal, com isso, reduzindo a capacidade de fusão do espermatozoide com o ócito. Além de causarem danos diretamente ao DNA, comprometendo a

contribuição genômica paterna para o embrião (SIKKA,1996; BALL, 2008; TREMELLEN, 2008).

2.5. Criopreservação x ROS

Com o congelamento de sêmen objetiva-se obter um banco de sêmen a ser utilizado para a inseminação artificial, sendo uma importante ferramenta para o melhoramento genético no rebanho. No entanto, várias alterações bioquímicas e anatômicas na célula espermática (acrossoma, núcleo, mitocôndria, axonema e membrana plasmática) podem ocorrer durante o congelamento e descongelamento. Dessa forma objetiva-se com os protocolos de congelamento minimizar os danos causados à membrana espermática pela formação de cristais de gelo e também pelo estresse oxidativo causados durante a criopreservação do sêmen (AMIRAT et al.,2004).

Durante o congelamento as células são submetidas a um estresse que ocorre devido à formação de cristais de gelo. A exposição das células aos meios crioprotetores hiperosmóticos, provoca um efluxo de água e íons do meio intracelular causando um encolhimento da célula, porém o processo de descongelamento implica na inversão destes efeitos, sendo que esses dois processos induzem a danos na membrana espermática (HOLT, 2000).

A diminuição da viabilidade espermática ocorre devido aos danos causados à membrana espermática pelo congelamento e o descongelamento, pois durante esses processos ocorre aumento na sensibilidade aos ROS elevando os níveis de peroxidação lipídica.

A peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana espermática é responsável pelo aumento na permeabilidade da membrana com conseqüente diminuição na motilidade espermática e alterações na morfologia normal do espermatozóide (ALVAREZ e STOREY, 1992; SIKKA, 1996; WANG, 1997; WATSON, 2000). Após o congelamento e descongelamento do sêmen pode ocorrer diminuição na motilidade espermática em torno de 50% comparado com o sêmen fresco, isso ocorre devido ao aumento na morte celular e perda da função espermática causados pelo estresse oxidativo (WATSON, 2000; BILODEAU, 2002).

O estresse oxidativo causado ao espermatozóide durante o processo de congelamento ocorre durante a fase de resfriamento até que a célula espermática atinja 4°C, pois nessa etapa há grande produção de ROS (BILODEAU, 2002). O

descongelamento do sêmen também causa danos oxidativos à célula espermática, isso acontece em decorrência da rápida utilização de oxigênio pelos espermatozóides após o período de interrupção no metabolismo, com isso há maior produção de radicais livres, conseqüentemente alteração da membrana e fragmentação do DNA (BALL, 2008).

Em condições normais o estresse oxidativo mediado pela elevada produção de ROS é dependente da quantidade de antioxidantes celulares presentes no sêmen, o qual irá contrapor o efeito dos ROS minimizando o estresse oxidativo. Em decorrência do aumento dos danos físicos causados pelo choque térmico nas células espermáticas associado ao aumento da sua susceptibilidade ao estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de ROS pelo processo de criopreservação, alguns autores tem avaliado o efeito da adição de antioxidantes, como a vitamina E, para neutralizar a perda de motilidade gerada pelas ROS (TAYLOR, 2001).

Na literatura encontram-se trabalhos avaliando a adição de antioxidantes ao meio de criopreservação do sêmen com o objetivo de atenuar os efeitos das ROS nos espermatozóides, porém os resultados encontrados ainda são conflitantes, pois o estresse oxidativo pode ter sido originado antes mesmo do processo de criopreservação do sêmen. Entretanto, o uso de antioxidantes na dieta pode ser uma alternativa para reduzir o estresse oxidativo no sêmen fresco, conseqüentemente diminuindo os danos causados no pós-congelamento (TAYLOR, 2001; BALL, 2008).

2.6. Mecanismos de Defesa Antioxidante

O organismo animal desenvolveu mecanismos para proteger-se parcial ou totalmente do dano peroxidativo causado pelas ROS aos componentes celulares e as substâncias que participam destes mecanismos receberam o nome de antioxidantes (BORGES, 2003; HATAMOTO, 2004; SILVA, 2006).

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato (BIANCHI e ANTUNES, 1999; ALVAREZ e MORAES, 2006).

As defesas antioxidantes protegem os tecidos e líquidos corpóreos da lesão causada pelos oxidantes produzidos pelo metabolismo normal. Constituídas por ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, substâncias hidrossolúveis e

enzimas, derivam principalmente da dieta, como no caso das vitaminas E, C, beta caroteno, e dos elementos-traço zinco, cobre e selênio. Ressalta-se que as defesas antioxidantes não conferem proteção completa contra as ROS produzidas pelo organismo (LEITE e SARNI, 2003).

O equilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes tende ligeiramente em favor das espécies reativas, de modo que elas possam cumprir suas funções biológicas. As defesas antioxidantes restabelecem o equilíbrio permitindo ao organismo tolerar o estresse oxidativo leve e moderado. A presença de doença e desnutrição rompe este equilíbrio provocando estresse grave, com alterações do metabolismo celular, lesão do DNA e dos transportadores de íons das membranas celulares, elevação de cálcio e ferro ionizados e peroxidação lipídica, estes eventos culminam em morte celular (LEITE e SARNI, 2003).

Em geral os mecanismos de defesa antioxidantes podem ser definidos como sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase são antioxidantes preventivos, porque eliminam espécies reativas envolvidas no início das reações de cadeia dos radicais livres, enquanto que as pequenas moléculas antioxidantes, tais como ascorbato, o tocoferol, coenzima Q, urato, e glutathione, são capazes de reparar radicais oxidados e, além disso, o ascorbato e o tocoferol funcionam em conjunto para proteger a membrana de danos peroxidativos (ALVAREZ et al.,1987; BUETTNER, 1993; SILVA, 2006).

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, o que evita a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. Entre estes antioxidantes está o α -tocoferol, que interage com o oxigênio livre (O_2) e fornece átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo desta forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (MAFRA et al.,1999).

Os antioxidantes oriundos da dieta, tais como as vitaminas E, C e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A proteção dos efeitos dos oxidantes também pode ser feita pela reparação dos prejuízos. Porém, os espermatozóides são incapazes de reparação os danos induzidos pelo estresse oxidativo, pois falta-lhes a enzima citoplasmática necessários para realizar a reparação (AGARWAL e SALEH, 2002).

2.6.1. Controle Enzimático

O espermatozóide das espécies animais possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as ROS, que consiste principalmente das enzimas: superóxido dismutase (SDO), catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GRD) (ALVAREZ e MORAES, 2006).

2.6.1.1-Superóxido Dismutase (SOD)

As células aeróbias são protegidas da ação do superóxido e do peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido-dismutase (SOD), uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e pela ação da catalase, o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular. A Superóxido dismutase converte o radical superóxido altamente reativo para H_2O_2 que são menos reativas (LEITE e SARNI, 2003).

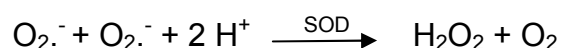


Figura 1: Formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pela SOD

A SOD catalisa a destruição do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot -}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot -}$ ocorre naturalmente, porém necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\cdot -}$, de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion

superóxido. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do O_2^- mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centro redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (LEITE e SARNI, 2003; BARREIROS et al., 2006)

2.6.1.2. Glutathione Peroxidase (GPX)

O tripeptídeo glutathione (GSH), principalmente na sua forma reduzida, está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora está associada ao grupamento -SH presente na cisteína. A glutathione tem sido reconhecida como substrato para GSH-transferases e GSH peroxidases, enzimas que catalizam as reações de detoxificação de compostos xenobióticos e da antioxição de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. A concentração tissular de GSH pode ser regulada pela dieta e pelo estado nutricional (VANUCCHI et al., 1998).

A glutathione peroxidase (GPX), que utiliza para sua ação a glutathione (GSH) é um tripeptídeo contendo cisteína e representa o tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos. É substrato para as enzimas anti-oxidantes: GSH transferases e peroxidases (dependentes de selênio). As demais funções da GSH envolvem sua participação no estoque e transporte de cisteína, regulação do balanço "redox", metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos, função imune e proliferação celular. Suas múltiplas funções, em vários tecidos, têm sido documentadas na literatura, pelas inter-relações entre GSH tecidual, nutrição, estresse oxidativo e doença (LEITE e SARNI, 2003).

O sistema GSH atua catalisando a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathione opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPX, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada (BARREIROS et al., 2006).

A GPX é um dos principais varredores enzimáticos de radicais livres, estando presentes em teores elevados nos eritrócitos e hepatócitos e moderados nos pulmões e no coração. (LEITE e SARNI, 2003).

2.6.1.3 Catalase (CAT)

Catalase é uma das mais eficientes enzimas conhecidas. É tão eficiente que não pode ficar saturada por qualquer concentração de H₂O₂. CAT reage com H₂O₂ para formar água e oxigênio molecular (MATES e SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

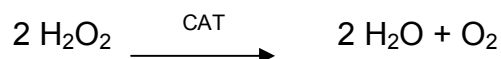


Figura 2: Conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em água (H₂O) e O₂.

Nos animais o H₂O₂ é detoxificado pela CAT e embora a CAT não seja essencial para alguns tipos celulares, em condições normais ela possui um importante papel na tolerância ao estresse oxidativo, e na resposta adaptativa das células a este estresse (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

2.7. Controle não Enzimático

2.7.1. Vitamina E

O termo vitamina E foi descrito primeiramente por Evans e Bishop em 1922 e é considerado um micronutriente essencial para a reprodução, tendo como função a manutenção da integridade e funcionalidade dos sistemas reprodutivo, muscular, circulatório, nervoso e imune. (RICCIARELLI et al. , 2001; BORGES, 2003).

A vitamina E é uma substância lipossolúvel, e composta por dois grupos: tocoferóis (α,β,γ,δ) e tocotrienóis (α,β,γ,δ), sendo que cada grupo possui quatro isoformas (α,β,γ,δ) (BRIGELIUS – FLOHÉ, 1999). Ela está presente nas membranas biológicas e desempenha importante ação na preservação da integridade das membranas, protegendo os lipídeos poliinsaturados da bicamada de fosfolipídios contra a oxidação (QUINN, 2003).

O tocoferol encontra-se presente na dupla camada lipídica de membranas celulares. Sendo que a cadeia lateral do tocoferol mistura-se com os ácidos graxos de cadeia longa com o núcleo cromado na superfície da membrana celular (Booth e McDonald, 1992², citados por Borges, 2003). Neste local, o tocoferol atua como antioxidante para proteger a membrana celular dos efeitos nocivos dos radicais livres (BORGES, 2003).

² BOOTH, N. H.; MCDOWELL, L. E. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. 6ª edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1992. 997p.

Os radicais livres têm uma tendência à reação em cadeia, ou seja, um composto que transporta elétrons desemparelhados vai reagir com outro composto, gerando um desemparelhamento de elétrons, produzindo assim espécies reativas ao oxigênio (AGARWAL e SALEH, 2002). O α -tocoferol, um antioxidante que inibe a peroxidação lipídica nas membranas pelo seqüestro dos radicais peroxil e alkoxil, quebrando assim a reação em cadeia. A capacidade do α - tocoferol em manter uma taxa de equilíbrio na redução de radicais peroxil na membrana plasmática depende da reciclagem de α -tocoferol por reduzir agentes tais como ascorbato ou tióis. Desta forma, α -tocoferol está apto a funcionar novamente quebrando as reações em cadeia de formação de radical livre (AGARWAL e SALEH, 2002).

A vitamina E é comprovadamente um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios in vivo, agindo como doadores de H^+ para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que eles não se desativem, necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (BARREIROS et al, 2006).

De acordo com Suleiman et al. (1996) a suplementação oral com vitamina E, em humanos, reduziu significativamente a peroxidação lipídica (avaliada através das concentrações de malonaldeído) e aumentou a motilidade espermática, promovendo aumento da ocorrência de gravidez durante o estudo em 21%. A administração oral de vitamina E melhora a motilidade espermática (SULEIMAN et al.,1996).

De acordo com Velasquez-Pereira (1998) touros alimentados com 14 mg de gossipol livre/Kg de peso corporal e suplementados com vitamina E tiveram um aumento da porcentagem de espermatozóides normais, aumento no percentual de motilidade, diminuição de anormalidades de peça intermediária, reduzindo os efeitos do gossipol sobre essas variáveis, devido a vitamina E reduzir os danos causados pelas ROS ou pelo efeito das enzimas envolvidas no sistema antioxidante do testículo.

O efeito da vitamina E na proteção da membrana espermática tem grande importância ao final da espermiogênese, pois é o momento em que o espermatozóide perde maior parte do seu citoplasma, com isso diminuindo as concentrações citoplasmáticas das enzimas antioxidantes.

Embora a suplementação oral para touros com vitamina E seja uma alternativa para evitar os danos peroxidativos na membrana espermática causados pelas ROS, ainda não se tem comprovado a eficácia dessa suplementação sobre a viabilidade espermática, uma vez que ainda são escassos os estudos sobre a ação da vitamina E suplementar na dieta animal e os resultados ainda são controversos no que diz respeito ao uso oral de vitamina E.

Dessa forma com o objetivo de minimizar essa deficiência foram realizados os seguintes artigos: “Suplementação oral com vitamina E: integridade da membrana espermática e qualidade seminal em touros jovens suplementados à pasto” (Capítulo 1), “Suplementação oral com vitamina E para touros: Integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen pós-congelamento” (Capítulo 2). Estes artigos foram elaborados segundo as normas propostas pela Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal .

2.8. Bibliografia

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895–907, 2004.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.13, n.3, p.232-241, 1992.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America** v.29 p.817–827, 2002.

AITKEN, R. J. e KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Society for Reproduction and Fertility** v.122, p. 497–506, 2001.

AITKEN, R. J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.3, p.169-173, 1997.

AITKEN, R. J. The amoroso lecture. The human spermatozoon- a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**. v.115, p. 1-7, 1999.

ALVAREZ, C. A. e MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen. **Sábios: Revista de Saúde e Biologia**., Campo Mourão, v. 1, n.1, 2006.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 336-346, 1987.

ALVES, S. G. G.; FILHO, A. L. R.; SNOECK, P. P. N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen eqüino congelado, **Ciência Animal Brasileira** v. 6, n. 3, p. 219-225, 2005.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science** v.107, p.257–267, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

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

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Artigo de revisão radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12 n.2 p. 123-130, 1999.

BILODEAU, J; BLANCHETTE, S; CORMIER, N; SIRARD, M. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender. Protection

by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. Dissertação (mestrado) apresentado à Universidade Federal de Viçosa, 2003, Viçosa - MG , 2003.

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

BUETTNER, G. R. The pecking of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and Ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.300, nº 2, p.535-543, 1993

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** , Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002

CUNHA, I. C. N. -**Criopreservação do sêmen de cães**.Tese (doutoramento) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002, 149 p.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews** v.82 p.47–95, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. - Artigo de Revisão - Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**; v.43 n.1 p. 61-8, 1997

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197 – 235, 2000.

FONSECA, V. O. in Marques, D. C. – **Criação de bovinos** – 7 ed. – Belo Horizonte, 2003.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. A Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias Saúde. FEA**, Andradina, v. 2, n. 2, p 66-70, 2002.

GRIVEAU, J. F.; LANNOU, D. - Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20 p.61 -69, 1997.

GUIMARÃES, S. B.; ARAGÃO, A. A.; SANTOS, J. M. V.; KIMURA, O. S.; BARBOSA, P. H. U. ; VASCONCELOS, P. R. L. Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** - v.22 n.1, 2007.

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** / Luciana Keiko Hatamoto Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. – São Paulo, 2004. 180f.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

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

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12 n.3 p. 205-212, 1999.

MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, D. M., TEIXEIRA, T. F. S., PELUZIO, M. C. G. O paradoxo do papel da vitamina e na iniciação e progressão da aterosclerose e sua correlação com os radicais livres. **Revista Medica de Minas Gerais**. v.14 n. 2 p.113-6, 2004.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in photophysiological process. **Frontiers in Bioscience**, v.4, n.4, p.339-345, 1999.

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**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003 101p.

NUNES, B.; BALCÃO, V. Natural antioxidants and ageing: myth or paradox? **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto. ISSN 1646-0480. v.4 p.66-75., 2007.

OLIVEIRA, R. L.; Barbosa M. A. A. F.; Ladeira M. M. -II **SIMBOI - Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, 29 a 30.04.2006,

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

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, 2001.

ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, 2003, 192 p.

SCHAFHÄUSER, Jr. J; GAEDE, W. Suplementação vitamínica e desmame temporário sobre a atividade reprodutiva em vacas de corte. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaiana**, v4, n1, p.93-104, 1997.

SETCHELL B. P. The parkes lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.114, p.179-194, 1998.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R.; THOMAS Jr., A. J.; AGARWAL, A. The reactive species – total antioxidant capacity score is a new of measure of oxidative stress to predict. **Human Reproduction**, v.14, n.11, p 2801-2807, 1999.

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

SILVA, P. F. N. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. PhD Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2006

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EI-MALIK, A. M. A.; NASR, M.A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.189-198, 2001.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, n.3 p. 243–258, 2008.

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

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; CHENOWETH, P. J.; MCDOWELL, L. R.; RISCO, C. A.; STAPLES, C. A.; PRICHARD, D.; MARTIN, F. G.; CALHOUN, M. C.; WILLIAMS, S. N.; WILKINSON, N. S. Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls. **Journal Animal Science** v.76, p.2894–2904, 1998.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WANG, Y.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. **Adult Urology**, v.50, p. 409-413, 1997.

WEN, J. C. The role of vitamin E in the treatment of male infertility. **Nutrition Bytes**, v.11, n.1, p.1-6, 2006.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology** v.128 p.379–391, 2001.

3. Capítulo 1

Suplementação oral com vitamina E: integridade da membrana espermática e qualidade seminal em touros jovens suplementados à pasto.

Oral supplementation with vitamin E: membrane integrity of sperm and semen quality in young bulls

Resumo

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno, localizada em Jaciara-MT, com objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática e qualidade seminal de touros suplementados com 400 UI de vitamina E/dia. Foram utilizados 16 touros Brangus com idade média de 24 meses e peso médio de 462,2 Kg distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E (GE- 400 UI de vitamina E/dia) adicionados ao suplemento concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados por pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça e receberam concentrado diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental foram realizadas 4 coletas de sêmen sendo: antes do início da suplementação; com 30 e com 60 dias de suplementação, e 15 dias após o término da suplementação. O sêmen foi coletado por eletroejaculação, em tubo graduado, aferiu-se o volume, cor e aspecto do ejaculado. Em seguida foram avaliados motilidade, vigor e turbilhonamento espermático. Realizou-se o teste hiposmótico para avaliar integridade de membrana, coloração eosina/nigrosina, Pope e coloração tripla. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os dados foram analisados através da ANOVA e do teste SNK com um nível de significância de 10%. Foi encontrado efeito da suplementação ($p=0,0367$) para consistência testicular (GC= $3,17\pm 0,08$ e GE= $2,95\pm 0,45$); vigor ($p=0,0183$) (GC= $2,71\pm 0,095$ e GE= $2,23\pm 0,16$); defeito menor ($p=0,0617$) (GC= $4,33\pm 0,62$ e GE= $5,29\pm 0,58$). Não foram encontradas diferenças

26 (p>0,10) para as demais variáveis: volume, motilidade, concentração, morfologia, integridade
27 acrossomal, viabilidade espermática e integridade de membrana. Com os resultados obtidos
28 nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que a suplementação oral com
29 vitamina E de 400UI/dia não apresentou melhoria sobre a qualidade seminal nem a
30 integridade da membrana espermática de touros.

31 **Palavras-chaves:** espécies reativas ao oxigênio, estresse oxidativo, lipoperoxidação

32 **Summary**

33 The experiment was realized in Fazenda Sereno, located in Jaciara-MT, with objective
34 to evaluate plasmatic membrane integrity and seminal quality of bulls supplemented with
35 vitamin E. Had been used 16 Brangus bulls with 24 months average age and 462.2kg average
36 weight fortuitous distributed in two treatments. The treatments had been: controlled group
37 (GC) and vitamin E supplemented group (GE 400 UI of vitamin E/dia) added to the
38 concentrate. Each group was kept separate in poles formed for of Panicum maximum cv.
39 Mombaça pasture and receiving 4.5kg/animal of concentrated daily. The vitamin E
40 supplementation was accomplished for 60 days. During the experimental period, 4 semen
41 collections were realized being: before the supplementation beginning; with 30 and 60 days of
42 supplementation, and 15 days after the supplementation ending. The semen was collected by
43 electroejaculation, in graduated pipe, surveying the volume, color and aspect. After that
44 motility, vigor and mass had been evaluated. Accomplished the hiposmotic test for membrane
45 integrity, eosine/nigrosine coloration, Pope and triple coloration. The experiment was realized
46 in casual entirely delineation with repeated measures in time. The data had been analyzed
47 through the ANOVA and SNK test with a significance level of 10% with assist of the
48 program statistical SAS. The treatment effect was found (p=0,0367) for testicular consistency
49 (GC= 3,17±0,08 and GE= 2,95±0,45); vigor (p=0,0183) (GC=2,71±0,095 and
50 GE=2,23±0,16); lesser defect (p=0,0617) (GC=4,33±0,62 e GE=5,29±0,58). Differences had

51 not been found ($p > 0,10$) for the variables: volume, motility, concentration, morphology,
52 acrosomal integrity, spermatic viability and membrane integrity. The results gotten in the
53 experimental conditions of the present work, conclude that the oral supplementation with
54 vitamin E 400UI/dia did not have influences on the seminal quality nor the spermatic
55 membrane integrity of bulls.

56 **Keywords:** lipoperoxidation, reactive oxygen species, oxidative stress

57

58 3.1. Introdução

59 O Brasil é um país de clima tropical, que se caracteriza por clima quente úmido, sendo
60 a região Centro-Oeste o principal produtor de gado de corte do país, essa região possui um
61 clima com temperatura ambiente elevada. Altas temperaturas ambientais é a principal causa
62 de alterações no epitélio seminífero, com conseqüentes efeitos na qualidade seminal (NICHII,
63 2003; ROMITTO, 2003).

64 Assim em condições de Brasil Central a elevação da temperatura ambiente altera o
65 mecanismo de termorregulação testicular acarretando degeneração que é a causa principal da
66 queda de fertilidade em touros. Uma das hipóteses para a diminuição da qualidade seminal em
67 touros submetidos ao estresse térmico seria o aumento na produção de espécies reativas ao
68 oxigênio (ROS) (GABALDI e WOLF, 2002; NICHII, 2003; ROMITTO, 2003).

69 A capacidade de fertilização dos espermatozóides é dependente, entre outros fatores da
70 sua motilidade e da integridade de sua membrana. As substâncias oxidativas quando
71 produzidas em excesso no organismo, em particular no líquido seminal comprometem a
72 motilidade e viabilidade espermática (CARVALHO et al.,2002).

73 A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados necessários para
74 manter a fluidez da membrana durante a fusão no momento da fertilização. Devido a isso a
75 membrana espermática torna-se vulnerável aos danos oxidativos decorrentes da excessiva
76 produção de ROS no sêmen, causando o estresse oxidativo. Este fato resulta em
77 comprometimento da capacitação espermática, reação acrossômica, aumento na
78 permeabilidade da membrana espermática, causando anomalias morfológicas e prejudicando a
79 fertilidade (PASQUALOTTO et al., 2001; CARVALHO et al., 2002).

80 A diminuição da qualidade seminal geralmente é mal compreendida, porém pode ser
81 influenciada por fatores como ambiente, idade e dieta. Dietas contendo antioxidantes e sua
82 influencia na qualidade seminal tem sido estudada, a fim de minimizar os danos causados

83 pelas ROS, porém os resultados avaliando o uso oral de vitamina E são conflitantes
84 (ESKENAZI et al., 2005).

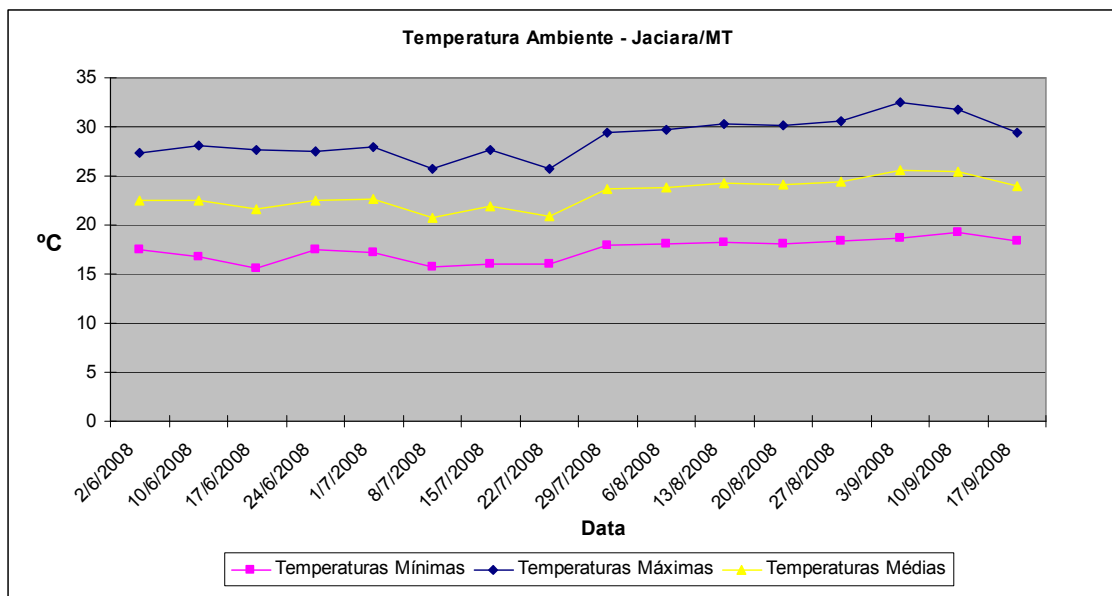
85 A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e tem a capacidade de impedir a
86 propagação das reações em cadeia induzidas pelas ROS nas membranas biológicas,
87 representando uma importante defesa contra as lesões oxidativas causadas à membrana
88 espermática, inibindo a peroxidação lipídica dessas membranas (SMITH e AKINBAMIJO,
89 2000).

90 Devido à escassez de trabalhos avaliando o uso oral de vitamina E na qualidade
91 seminal de touros, objetivou-se com este trabalho avaliar se a suplementação oral de touros
92 com vitamina E alteraria as características seminais e a integridade da membrana espermática.

93

94 **3.2. Material e Métodos**

95 O experimento foi realizado na Fazenda Sereno - GAP, localizada no município de
96 Jaciara, distante 140 km de Cuiabá, Mato Grosso, no período de junho a setembro de 2008. O
97 município de Jaciara encontra-se na altitude de 367m, latitude 15° 57' 55" sul e longitude 54°
98 58' 06" oeste. O clima da região é tropical, sazonal, com duas estações bem definidas, verão
99 chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). A temperatura média anual é
100 28°C e pluviosidade média anual de 2000 mm (Wikipédia, 2009).



101
102 Figura 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, máxima e média) da região de Jaciara,
103 MT - 02/06/2008 à 17/09/2008, Fonte: INMET, 2009.
104

105 Foram utilizados 16 touros da raça Brangus com idade média de 24 meses, e peso vivo
106 médio inicial de 462,2 Kg. Ao início do experimento, os animais foram vermifugados
107 (Doramectina 1% - Dectomax®, Pfizer Saúde Animal) e tratados com ectoparasiticida
108 (Cipermetrina + Ethion - Ciperthion®, Shering-Plough), o controle de ectoparasitas foi
109 realizado a cada coleta de dados. Em seguida os animais foram distribuídos aleatoriamente em
110 dois grupos:

111 GC= Grupo controle (suplementação concentrada sem adição de vitamina E);

112 GE=Grupo vitamina E (suplementação concentrada com 400UI/animal/dia de vitamina E).

113 A área destinada aos animais experimentais foi constituída de dois piquetes de 7,35 ha,
114 com *Panicum maximum* cv. Mombaça. Providos de bebedouro e cocho para fornecimento do
115 suplemento, cujas dimensões permitiam o acesso de todos os animais simultaneamente.

116 Os animais foram mantidos em pastejo, sendo suplementados com ração concentrada
117 (Tabela 1) uma vez ao dia.
118

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

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

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

124

125 Os suplementos foram formulados para ganho de peso de 1 kg/dia e conterem 21% de
 126 PB na matéria natural. Foram fornecidos em quantidade equivalentes a 4,5 kg/animal/dia e,
 127 sempre às 11:00h. Foram coletadas amostras de forragem e do suplemento para posteriores
 128 análises no Laboratório de Nutrição Animal da FAMEV-UFMT (Tabela2).

129 Tabela 2. Composição químico-bromatológica do suplemento concentrado e da forragem
 130 utilizada na alimentação dos animais experimentais com base na matéria natural

Nutriente	Suplemento (%)	Forragem (%)
Matéria seca (MS)	90,00	37,99
Proteína bruta (PB)	21,00	6,23
Fibra em detergente neutro (FDN)	29,40	67,57
Extrato etéreo (EE)	2,50	1,05
Matéria mineral (MM)	8,43	7,80

131

132 O experimento teve duração de 75 dias. Os animais foram suplementados por um
 133 período de 60 dias. Ao final dos 60 dias os animais continuaram recebendo o mesmo manejo,
 134 sendo fornecido concentrado sem a suplementação de vitamina E durante 15 dias, para
 135 avaliação de possível efeito residual. Antes do período experimental os animais passaram por
 136 um período de adaptação de 10 dias, aos piquetes e ao concentrado.

137 Durante o período de suplementação (60 dias) foram feitas 3 coletas com intervalo de
138 30 dias e a quarta e última coleta foi feita 15 dias após a coleta 3, (dias: D0, D30, D60 e D75).
139 Sendo que a coleta 1 foi realizada antes de iniciar a suplementação com vitamina E (D0 – sem
140 suplementação de vitamina E) , no dia seguinte iniciou-se a suplementação com vitamina E
141 dos touros do grupo GE e 30 dias após realizou-se a coleta 2 (D30- com suplementação de
142 vitamina E) e 60 dias após realizou-se a coleta 3 (D60- com suplementação de vitamina E).

143 Após os 60 dias de suplementação os animais continuaram a receber o mesmo manejo,
144 porém não foi adicionado a vitamina E ao suplemento, e após 15 dias da terceira coleta
145 realizou-se então a coleta 4 (D75- sem suplementação de vitamina E) para avaliação do efeito
146 residual da suplementação vitamínica sobre os parâmetros espermáticos.

147 Para a coleta do sêmen os animais foram contidos em tronco apropriado e submetidos
148 à higienização do pênis e prepúcio. A consistência testicular (CONS) foi avaliada e
149 classificada em escala de um a cinco, onde, 1 foi considerado o testículo duro e 5 foi
150 considerado o testículo mole (Reichenbach et al., 2008). Posteriormente a realização do
151 exame clínico dos animais, realizou-se a limpeza do reto e ao mesmo tempo avaliou-se a
152 genitália interna e em seguida o sêmen era coletado através do método de eletroejaculação, e
153 recolhido em tubo plástico graduado em mililitros, isolado de choque térmico e da luz,
154 previamente aquecido.

155 Após a coleta do sêmen, aferiu-se o volume (VOL), cor e aspecto do ejaculado por
156 meio de visualização direta do tubo graduado utilizado para a coleta. Em seguida o sêmen foi
157 avaliado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
158 (CBRA, 1998), para os seguintes parâmetros:

159 - Turbilhonamento (TURB): feito com uma gota sobre uma lâmina previamente
160 aquecida a 37°C, e observado em microscópio óptico em aumento de 40x, com uma escala de
161 0 a 5, sendo que 0 foi considerado a ausência de turbilhão e 5 o turbilhão máximo.

162 - Motilidade e Vigor espermáticos: feita entre lâmina e lamínula, previamente
163 aquecida à 37°C em microscópio óptico em aumento de 100x. Motilidade foi avaliada como
164 porcentagem de espermatozóides móveis e vigor espermático como escala (0 a 5) (CBRA,
165 1998).

166 As demais análises seminais foram preparadas no momento da coleta e avaliadas
167 posteriormente no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (LABRA) da
168 Universidade Federal de Mato Grosso.

169 Uma alíquota de sêmen foi diluída em solução de formol salino na proporção 1:200
170 para avaliação da concentração espermática (CONC) do ejaculado, total de espermatozóides
171 no ejaculado (TOTEJA) e avaliação da morfologia espermática. A concentração espermática
172 foi determinada através da utilização da Câmara de Neubauer, e expressa em milhões de
173 espermatozóides por mL. A análise da morfologia espermática foi feita através de preparações
174 úmidas, entre lâmina e lamínula, avaliando-se 200 células espermáticas com auxílio de
175 microscopia por contraste de fase, aumento de 1000x e imersão. As alterações espermáticas
176 foram classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) sendo divididas em defeitos maiores
177 (DEFMA), menores (DEFME) e totais (DEFTOT) (CBRA, 1998).

178 O teste hipo-osmótico (HIPO) foi realizado segundo a metodologia de Jeyendran et al.
179 (1984). As amostras foram analisadas em microscopia com contraste de fase,
180 aumento de 1000x, pelo método de câmara úmida. Avaliaram-se 200 células, sendo estas
181 classificadas em espermatozóides normais, com cauda enrolada e cauda fortemente
182 enrolada (FONSECA et al., 2005).

183 Na análise da viabilidade espermática, foi utilizada a coloração de eosina e nigrosina
184 (EOS) (WHO, 1992), onde os espermatozóides com membrana íntegra (vivos) são
185 impermeáveis ao corante, mantendo-se incolores, e os com membrana lesionada (mortos) se

186 coram de rosa. Foram contadas 200 células em microscópio óptico, sob imersão e aumento de
187 1000x.

188 Para avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se o Corante Simples de Pope
189 (POPE et al., 1991) que foi avaliada em microscópio óptico, sob imersão e aumento de 1000x.
190 Foram avaliadas 200 células classificadas em:

191• Acrossoma íntegro: região acrossomal de coloração lilás.

192• Acrossoma não íntegro: região acrossomal de coloração rosa.

193 Para observar a reação acrossômica foi realizada a técnica de Harayama et al. (1993)
194 que consiste na coloração tripla dos espermatozóides capacitados. Esta técnica possibilita a
195 visualização de quatro padrões de coloração espermática:

196 • espermatozóides vivos com acrossoma intacto (Classe 1, TRI 1);

197 • espermatozóides vivos com reação acrossomal (Classe 2, TRI 2);

198 • espermatozóides mortos com acrossoma intacto (Classe 3, TRI 3);

199 • espermatozóides mortos com reação acrossomal (Classe 4, TRI 4).

200 Foi estimado o consumo diário de vitamina E dos animais experimentais, para melhor
201 discutir os resultados encontrados, e os valores da vitamina existentes na gramínea e nos
202 ingredientes do suplemento obtidos no NRC, (2001).

203 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com medidas
204 repetidas no tempo. Os dados foram analisados através da ANOVA e do teste SNK com um
205 nível de significância de 10% com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 2001). Quando
206 necessário os dados foram transformados para serem analisados como dados paramétricos. Os
207 dados foram expressos na forma de média e erro padrão da média dos dados originais.

208

209 3.3. Resultados e Discussão

210 Para a variável consistência testicular foi observado efeito ($p=0,0367$) da
211 suplementação com vitamina E na consistência testicular. Sendo que o GC apresentou um
212 valor de $3,17\pm 0,08$ e o GE $2,95\pm 0,45$ (Tabela 3). Para a mensuração da consistência testicular
213 dos animais experimentais utilizou-se a escala 1 à 5, sendo que a consistência 1 (consistente,
214 endurecido) e 5 (flácido, mole), portanto nessa escala a consistência 3 (fibroelástica) foi
215 considerada a consistência adequada para os testículos de bovinos. A consistência testicular
216 para bovinos deve ser fibroelástica, correspondendo à consistência 3 adotado nesse trabalho.
217 A análise da consistência é uma avaliação subjetiva, porém mesmo havendo diferenças na
218 consistência entre os tratamentos, pode-se considerar que ambos os tratamentos apresentam
219 valores adequados para o parâmetro consistência testicular, de acordo com o CBRA (1998).
220 Chacur et al. (2006) também encontraram para touros da raça Canchim com 14 e 48 meses
221 uma consistência testicular fibroelástica.

222 Alterações na consistência como flacidez é indicativo de degeneração testicular, sendo
223 uma das principais causas de infertilidade em touros, pois touros com degeneração testicular
224 apresentam redução na concentração espermática, motilidade, aumento de defeitos
225 morfológicos principalmente gota proximal (GARCIA, 2004; DIAS, 2007). A degeneração
226 testicular pode ocorrer quando os testículos são submetidos a aumento de temperatura, em
227 função do aumento na taxa metabólica o que leva à hipóxia nesses tecidos, nesse caso há um
228 aumento na produção de ROS, levando a alterações espermáticas (SETCHELL, 1998).

229 Não houve diferença ($p>0,10$) de volume de sêmen ejaculado entre as suplementações
230 avaliadas (Tabela 3). Chacur et al. (2006) avaliando características seminais de touros da raça
231 canchim aos 14 e 48 meses de idade, também observaram diferença de volume de ejaculado
232 entre as coletas. Essa diferença pode ser explicada pelo método de coleta do sêmen utilizado,

233 uma vez que a eletro ejaculação produz estímulos diferentes que promovem variações no
234 volume de sêmen ejaculado (CBRA, 1998).

235 Tabela 3. Média \pm erro padrão da média das variáveis: consistência (CONS), volume (VOL),
236 motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), concentração do ejaculado
237 (CONC), total de espermatozoides do ejaculado (TOTEJA), % de defeitos menores
238 (DEFME), % de defeitos maiores (DEFMA), % de defeitos totais (DEFTOT) das
239 amostras seminais de touros Brangus não suplementados (GC) ou suplementados
240 com vitamina E (GE).

Variável	GC	GE	P
CONS (1-5)	3,17 \pm 0,78a	2,95 \pm 0,045b	0,0367
VOL (mL)	6,44 \pm 0,76	7,13 \pm 0,65	0,3580
MOT (%)	60,83 \pm 3,21	53,41 \pm 4,60	0,1855
VIG (0-5)	2,71 \pm 0,095a	2,23 \pm 0,16b	0,0183
CONC (x10 ⁶ /mL)	52,71 \pm 0,095	37,36 \pm 4,74	0,1041
TOTEJA (x10 ⁶)	377,45 \pm 73,97	295,90 \pm 62,76	0,3409
DEFMA (%)	9,46 \pm 1,60	10,13 \pm 2,10	0,8130
DEFME(%)	4,33 \pm 0,62a	5,29 \pm 0,58b	0,0617
DEFTOT(%)	13,79 \pm 1,71	15,42 \pm 2,45	0,6341

241 ^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença pela ANAVA a
242 10% de significância.
243

244 Para a variável motilidade espermática não houve diferença entre as suplementações
245 avaliadas (Tabela 3), as coletas e na interação tratamento e coleta ($p>0,10$). Esses resultados
246 foram contrários aos encontrados por Marin – Guzman et al. (2000) que avaliaram a
247 suplementação com 220 UI/vit.E/Kg de ração constataram melhoria na motilidade
248 espermática em suínos. Hatamoto (2004) observou melhoria na motilidade espermática em
249 cães estressados e suplementados com vitamina E, porém nos cães não estressados os efeitos
250 da suplementação com vitamina E sobre a motilidade espermática não foram observados.
251 Velásquez-Pereira et al. (1998) observaram que a motilidade espermática diminuiu ($p<0,10$)
252 em touros alimentados com gossipol. No entanto para o grupo de touros que receberam
253 alimentação com gossipol e suplementados com 4000 UI de vitamina E, esse efeito negativo
254 foi contraposto. O gossipol é um pigmento polifenólico presente no caroço do algodão e tem
255 efeito tóxico sobre os espermatozoides e esta associado com a redução na produção
256 espermática, aumento nas anormalidades espermáticas e diminuição na motilidade (BROCAS

257 et al.,1997; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 1998). Essa toxicidade do gossipol ocorre devido
258 ao aumento na produção de radicais livres no sêmen, levando a peroxidação lipídica
259 (BROCAS et al.,1997; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 1998).

260 Para a variável vigor espermático foi observado diferença apenas entre as
261 suplementações avaliadas ($p=0,0183$), sendo o GC ($2,71\pm 0,09$) superior ao GE ($2,23\pm 0,16$)
262 (Tabela 3). Resultados que contrariam os encontrados por Xavier et al. (2008) que observaram
263 apenas efeito de coleta para caprinos submetidos à insulação escrotal, suplementados ou não
264 com selênio e vitamina E. De acordo com o CBRA (1998) para touros destinados a monta
265 natural, o vigor ideal deve ser igual ou superior a três, em escala de zero a cinco (CBRA,
266 1998).

267 Os valores encontrados no presente trabalho são inferiores aos preconizados pelo
268 CBRA (1998) e próximos àqueles encontrados por Moraes et al. (1998) que avaliaram
269 indicadores de exame andrológico em função da condição reprodutiva de touros Aberdeen
270 angus e Brangus e encontraram médias para vigor espermático ($2,51\pm 0,08$).

271 O turbilhonamento não diferiu entre os tratamentos e as coletas ($p>0,10$), porém houve
272 efeito ($p=0,0031$) da interação entre tratamento x coleta. O turbilhonamento é uma variável
273 dependente da motilidade, vigor, concentração e volume, portanto seus valores dependem do
274 método de coleta, não sendo item considerado para descarte de um reprodutor, embora o
275 turbilhonamento desejável seja igual ou superior a 3 (CBRA,1998).

276 Não houve efeito da suplementação com vitamina E (Tabela 3) da coleta e interação
277 entre tratamento e coleta ($p>0,10$) para a variável concentração espermática. Xavier et al.
278 (2008) também não observaram efeito de tratamento para a concentração do sêmen de
279 caprinos submetidos a insulação escrotal e tratados ou não com Selênio e Vitamina E.

280 Não foi observado efeito ($p>0,10$) da suplementação com vitamina E para as variáveis
281 TOTEJA (número total de espermatozóides no ejaculado), DEFMA e DEFTOT, porém foram

282 observadas diferenças ($p=0,0617$) entre os tratamentos para a variável defeitos menores
283 (DEFME), onde o GC ($4,33\pm 0,62$) apresentou menor porcentagem de defeitos menores que o
284 GE ($5,29\pm 0,58$) (Tabela 3).

285 Esse resultado é contrário ao relatado por Velasquez –Pereira et al. (1998) que
286 verificaram diferença ($p<0,05$) para defeitos espermáticos maiores, entre touros que
287 receberam ou não 4000 UI de vitamina E. Naquele trabalho os touros que não receberam
288 vitamina E tiveram maior porcentagem de defeitos maiores ($59,1\pm 6,0$), e os que receberam
289 tiveram menor porcentagem de defeito maior ($38,4\pm 5,2$). No entanto, estes autores, não
290 observaram efeito ($p>0,10$) de tratamento na porcentagem de defeito menor.

291 Xavier et al. (2008) encontraram maior porcentagem de espermatozóides com
292 patologias após a insulação escrotal, evidenciando o efeito deletério do estresse térmico sobre
293 a espermatogênese. No entanto, o número de células normais encontradas pós-insulação nos
294 animais tratados com selênio e vitamina E (65,0%) foi superior que os animais do grupo não
295 suplementado (26,5%). Velasquez–Pereira et al. (1998) observaram que houve redução
296 ($p<0,10$) no percentual de espermatozóides normais ($29,7\pm 7,0$) de touros alimentados com
297 gossipol, no entanto para os touros que foram suplementados com gossipol e receberam 4000
298 UI de vitamina E, contrabalanceou os efeitos negativos do gossipol sobre a morfologia
299 espermática aumentando a porcentagem de espermatozóides normais ($55,1\pm 6,0$).

300 Não houve efeito ($p>0,10$) da suplementação (Tabela 4), coletas e interação entre
301 tratamento x coleta na variável viabilidade espermática (EOS) que representa a porcentagem
302 de espermatozóides vivos. Também não se observou efeito de suplementação ($p>0,10$) sobre a
303 integridade da membrana espermática (HIPO), entre os tratamentos GC ($26,71\pm 2,89$) e GE
304 ($26,81\pm 3,90$) (Tabela 4). A integridade da membrana espermática é de grande importância na
305 determinação da fertilidade dos espermatozóides, pois para que haja capacitação,
306 hiperativação, reação acrossômica e fusão com o oócito, é necessário que o espermatozóide

307 tenha sua membrana íntegra (ALVAREZ e MORAES, 2006). As principais causas da
 308 diminuição na integridade da membrana espermática é a lipoperoxidação dos lipídeos da
 309 membrana, que ocorre pela ação de espécies reativas ao oxigênio, que causam danos na
 310 membrana do espermatozóide reduzindo dessa forma a viabilidade e fertilidade de
 311 espermatozoides (AITKEN, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006).

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

Variáveis	GC	GE	P*
EOS (%)	77,13 \pm 2,03	77,70 \pm 2,89	0,6060
HIPO (%)	26,71 \pm 2,89	26,81 \pm 3,90	0,9488
POPE (%)	89,78 \pm 3,83	89,30 \pm 3,75	0,9745
TRI 1 (%)	91,64 \pm 1,29	86,57 \pm 3,42	0,1319
TRI 2 (%)	0,51 \pm 0,10	0,55 \pm 0,15	0,6788
TRI 3 (%)	5,84 \pm 0,99	8,75 \pm 2,44	0,2051
TRI 4 (%)	2,04 \pm 0,68	4,12 \pm 1,21	0,1324

320

321 Não se observou efeito da suplementação com vitamina E ($p > 0,10$) para
 322 espermatozoides com acrossoma íntegro, avaliado pela coloração POPE (Tabela 4). Marin-
 323 Guzman et al. (2000) não observaram nenhum efeito sobre a integridade acrossomal de
 324 espermatozoides de cachaaos alimentados com baixos níveis de vitamina E (menos que 4,4
 325 mg/kg de dieta) durante a desmama até a maturidade sexual.

326 Para as variáveis espermatozóide vivo com acrossoma intacto (Tripan1),
 327 espermatozoides vivos com acrossoma reagido (Tripan2), espermatozoides mortos com
 328 acrossoma intacto (Tripan 3), espermatozoides mortos com acrossoma reagido (Tripan 4),
 329 não foram observados efeitos ($p > 0,10$) suplementação, coleta e interação tratamento x coleta
 330 (Tabela 4).

331 Segundo o NRC (1996) a exigência de vitamina E para bovinos de corte nas fases de
332 crescimento e terminação varia entre 50 à 100 UI de vitamina E/dia. Considerando-se a
333 categoria animal e peso vivo médio dos animais deste experimento, estimou-se o consumo de
334 matéria seca (CMS) em 11,55 kg de MS/dia. Os animais experimentais de ambos os grupos
335 foram mantidos em sistema de pastejo recebendo 4,5 kg de concentrado diariamente. Deste
336 modo, para se obter a quantidade de vitamina E fornecida pela dieta, estimou-se a quantidade
337 da vitamina proveniente da ingestão de forragem e na ração concentrada (McDOWELL,
338 1999; NRC, 1996). O total de vitamina E fornecido na dieta dos animais experimentais foi
339 obtido pela soma dos valores estimados de vitamina E na forragem e na ração concentrada,
340 sendo que o GE além da vitamina E presente nos alimentos fornecidos durante o período
341 experimental foi adicionado 400 UI de vitamina E/animal dia.

342 Para a estimativa da vitamina E proveniente da dieta não foi considerado quantidade
343 proveniente na forragem, pois segundo o NRC (1996), não são encontrados valores
344 significativos de vitamina E na maioria das gramíneas. Baseando-se nas estimativas
345 calculadas na ração, observou-se que os animais do GC receberam diariamente 58 UI de
346 vitamina E (Tabela 5), atendendo portanto a demanda mínima de vitamina E diária dos
347 animais estudados. Já os animais do GE, além da vitamina E fornecida pelos ingredientes da
348 ração concentrada, foram também suplementados com 400 UI de vitamina E/ animal/ dia,
349 totalizando um fornecimento diário aos animais do GE de 458 UI de vitamina E/animal/dia
350 (Tabela 5).

351

352 Tabela 5 - Consumo estimado diário de vitamina E na forragem (Mombaça), no concentrado,
 353 no mombaça + concentrado (situação do grupo controle, GC) e no mombaça +
 354 concentrado + suplementação (grupo suplementado com vitamina E, GE) dos
 355 animais experimentais.

Fonte	Vitamina E (UI)
Mombaça	-----
Concentrado	58
Mombaça+ Concentrado (GC)	58
Mombaça + Concentrado + Suplementação (GE)	458

356 Fonte: NRC (1996), MCDOWELL (1999)

357 Dessa forma, pode-se constatar que os níveis diários de vitamina E fornecida aos
 358 animais do GE, foram ofertados quatro vezes e meia a mais do que o nível requerido pelos
 359 animais. Dessa forma as exigências diárias de vitamina E de todos os animais experimentais,
 360 tanto o GC quanto o GE, foram atendidas, possivelmente devido a esses fatores não foi
 361 observado efeitos de tratamentos na maioria das variáveis estudadas. Ressalta-se no entanto
 362 que o manejo nutricional adotado no presente experimento, nem sempre é visto, contrastando
 363 com a realidade da maioria das propriedades rurais brasileiras, onde o sistema de criação é
 364 extensivo suplementado somente com mistura mineral.

365 Com base nos resultados obtidos conclui-se que a suplementação oral com 400UI/dia
 366 de vitamina E para touros, com as exigências nutricionais de vitamina E atendidas, não
 367 apresentou melhoria sobre a qualidade seminal nem a integridade da membrana espermática
 368 de touros .

369

370 **3.4. REFERÊNCIAS**

- 371 AITKEN, R. J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human**
372 **Reproduction**, v.3, n.3, p.169-173, 1997.
- 373 ALVAREZ, C. A. e MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen.
374 **Sábios:Revista de Saúde e Biologia.**, Campo Mourão, v. 1, n.1, 2006.
- 375 BARTH, A.D; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1.ed. Iowa State
376 university Press, Ames, Iowa, 1989, 285p.
- 377 BROCCAS C.; RIVIERA R. M.; PAULA-LOPES F. F.; MACDOWELL L. R.; CALHOUN M.
378 C.; STAPLES C. R.; WILKINSON N. S. BONING A. J.; CHENOWETH P. J.; HANSEN P.
379 J. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. **Biology of**
380 **Reproduction**, v.57, p.901-907, 1997.
- 381 CARVALHO O. F.; FERREIRA J. D. J.; SILVEIRA N. A.; FRENEAU G. E. Efeito
382 oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e**
383 **Medicina Laboratorial** , Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002
- 384 CHACUR M. G. M.; ARAÚJO M.C.; KRONKA S. Características seminais, corpóreas e
385 anatômicas do aparelho reprodutor de reprodutores da raça canchim aos 14 e 48 meses de
386 idade. **Arquivos De Ciências Veterinárias E Zoologia Da Unipar**, v. 9, n. 1, p.21-27, 2006.
387
- 388 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) **Manual para exame andrológico e**
389 **avaliação seminal**. 2 ed., Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.
- 390 DIAS, J. C., ANDRADE, V. J. DE, VALE FILHO, V. R. DO, ALMEIDA E SILVA, M. DE.
391 Biometria testicular e aspectos andrológicos de touros nelore (*Bos taurus indicus*), de dois e
392 três anos de idade, criados extensivamente, **Revista Veterinária Notícias**, v. 13, n. 2, p. 31-
393 37, 2007.
- 394 ESKENAZI B.; KIDD S.A.; MARKS A.R.; SLOTER E.; BLOCK G.; WYROBEK
395 A.J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Human**
396 **Reproduction**, v.20,n.4 p. 1006–1012, 2005.
397

- 398 FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.;
399 RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat
400 spermatozoa **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.139-144, 2005.
- 401 GABALDI, S. H.; WOLF, A. A Importância da termorregulação testicular na qualidade do
402 sêmen em touros. **Ciências Agrárias Saúde. FEA**, Andradina, v. 2, n. 2, p 66-70, 2002.
- 403 GARCIA, A. R. Tese (doutorado) - **Efeitos do estresse térmico testicular e o uso da**
404 **somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de**
405 **membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de**
406 **touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. São Paulo, 259 f., 2004.
- 407 HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to
408 undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the eggplasma membrane.
409 **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.
- 410 HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre**
411 **parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das**
412 **enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães / Luciana Keiko Hatamoto**
413 Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
414 Zootecnia.– São Paulo :, 2004. 180f.
- 415 INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Sistema de Monitoramento
416 Agrometeorológico. Disponível em: [http://www.agritempo.gov.br/agroclima/](http://www.agritempo.gov.br/agroclima/verBoletimWeb?op=VR1&uf=MT)
417 [verBoletimWeb?op=VR1&uf=MT](http://www.agritempo.gov.br/agroclima/verBoletimWeb?op=VR1&uf=MT), Acesso em: 23 de Janeiro de 2009.
- 418 JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B.G.;
419 ZANEVELD, L. J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human
420 sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of**
421 **Reproduction and Fertility**, v.47, p.219-228, 1984.
- 422 McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition**. New York: Academic press, 486 p.,
423 1999.
- 424 MARIN-GUZMAN J.; MAHAN D. C.;WHITMOYER R. Effect of dietary selenium and
425 vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy
426 of added sodiumselenite in extended semen on sperm motility. **Journal Animal Science**.
427 v.78, p.1544-1550, 2000.
- 428 MORAES J. C. F.; HORN M. M.; ROSADO Jr A. G. Exame andrológico em touros:
429 Qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais.**Ciencia Rural**,
430 v.28, n.4, p 647-652, 1998.
- 431 NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) **Nutrient requirements of beef cattle**. 7
432 rev.ed., Washington D.C.: National Academy Press. 1996. 242 p.
- 433 PASQUALOTTO F. F.; SHARMA R. K.; KOBAYASHI H.; NELSON D. R.; THOMAS
434 JR; AGARWAL A. Oxidative Stress in Normospermic Infertile Men Undergoing Infertility
435 Evaluation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, 2001.
- 436 NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos**
437 **lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados,**
438 **MS**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
439 Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003 101p.

- 440 POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating
441 acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p.
442 87-95, 1991.
- 443 REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do sêmen e
444 Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.;
445 FREITAS, V. J. F. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed., São Paulo:
446 Editora Roca, 2008. p. 57-82.
- 447 ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características**
448 **ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. Dissertação (mestrado) –
449 Universidade de São Paulo, 2003, 192 p.
- 450 SAS. **The statistical analyze systems for windows**: version 8. Cary, 1999-2001.CD-Rom.
- 451 SMITH O. B., AKINBAMIJO O.O. Micronutrients and reproduction in farm animals.
452 **Animal Reproduction Science** p.60–61, 2000.
- 453 SETCHELL B. P. The parkes lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction an**
454 **Fertility**. v.114, p.179-194, 1998.
- 455 VELASQUEZ-PEREIRA J.; CHENOWETH P. J.; MCDOWELL L. R.; RISCO C. A.;
456 STAPLES C. A.; PRICHARD D.; MARTIN F. G.; CALHOUN M. C.; WILLIAMS S. N.;
457 WILKINSON N. S. Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls. *Journal*
458 *Animal Science* v.76, p.2894–2904, 1998.
- 459 WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of**
460 **human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of
461 the University of Cambridge, 120p. 1992.
- 462 WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Jaciara>,
463 Acesso em: 22 de Janeiro de 2009.
- 464 XAVIER G. C.; MAYMONE A. C. M.; SOARES P. C.; SILVA JUNIOR V. A.; GUERRA
465 M. M. P. Suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de
466 caprinos induzidos à insulação escrotal. **Acta Scietiarum Animal Sciences**, v. 30, n.1, p.103-
467 111, 2008.

4. Capítulo 2

**Suplementação oral com vitamina E para touros: Integridade da membrana
espermática e qualidade do sêmen pós-congelamento**

*Vitamin E oral supplementation for bulls: spermatic membrane integrity and post-freezing
semen quality*

Resumo

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno, localizado em Jaciara-MT, com o objetivo de avaliar a integridade da membrana espermática e qualidade seminal no pós-congelamento em touros jovens suplementados com 400 UI de vitamina E na dieta. Foram utilizados 16 touros Brangus com idade média de 24 meses e peso médio de 462,2 kg distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: grupo controle (GC) e grupo suplementado com vitamina E (GE- 400 UI de vitamina E/dia) adicionados ao concentrado. Cada grupo foi mantido separado em piquetes formados por gramínea de *Panicum maximum* cv. Mombaça e recebendo concentrado diariamente na quantidade de 4,5 kg/animal. A suplementação com vitamina E foi realizada por 60 dias. Durante o período experimental, foram realizadas 4 coletas de sêmen sendo: antes do início da suplementação; com 30 e com 60 dias de suplementação, e 15 dias após o término da suplementação. 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 e os dados analisados através de ANOVA e do teste SNK com nível de significância de 10%, com auxílio do programa estatístico SAS. Foi observado efeito da suplementação apenas para a coloração eosina/nigrosina, havendo melhoria na viabilidade espermática dos animais do GE. Para vigor houve interação tratamento x tempo, o sêmen dos animais do GE

28 teve menor queda de vigor que o GC pós-congelamento. Não se observou efeito da
29 suplementação ($p>0,10$) para POPE, HIPO e TRIPAN. Com base nos parâmetros avaliados e
30 os resultados obtidos de animais suplementados, conclui-se que esse nível de suplementação
31 foi benéfico para o sêmen submetido ao processo de criopreservação indicando uma melhor
32 proteção da membrana espermática ao estresse oxidativo e os danos de membrana causados
33 pelo congelamento do sêmen.

34 Palavras –chaves: criopreservação, estresse oxidativo, viabilidade espermática

35 **Summary**

36 The experiment was realized in Sereno farm, located in Jaciara-MT, with objective to
37 evaluate the spermatic membrane integrity and the post-freezing semen quality in young bulls
38 supplemented with 400 UI of vitamin E on the diet. Were used 16 Brangus bulls with 24
39 months average age and 462,2kg average weight fortuitous distributed in two treatments. The
40 treatments were: Controlled group (GC) and vitamin E supplemented group (GE- 400 UI of
41 vitamin E/day) added to the concentrate. Each group was kept separated in poles formed for
42 Panicum maximum cv. Mombaça pasture and receiving 4,5kg/animal of concentrated daily.
43 The vitamin E supplementation was accomplished for 60 days. During the experimental
44 period, 4 semen collects were realized, being: before supplementation beginning; with 30 and
45 60 days of supplementation, and 15 days after the supplementation ending. The semen was
46 collect by electroejaculation method. Later, was proceeded the freezing of seminal samples,
47 that were stored in cryogenic tank until the analyses moment. The experiment was installed in
48 casual entirely delineation with repeated measures in time and the data had been analyzed
49 through the ANOVA and SNK test with a significance level of 10% with assist of the
50 program statistical SAS. Was observed treatment effect only for eosine/negrosine coloration,
51 there was betterment in spermatic viability of GE animals. For vigor there was treatment x
52 time interaction, observed that GE had lesser vigor decrease than post-freezing GC. Based on

53 evaluated parameters and the obtained results of supplemented animals, is concluded that this
54 supplementation level was benefic for semen that was submitted to the cryopreservation
55 process showing better protection of spermatic membrane to the oxidative stress and to the
56 membrane damage caused by semen freezing.

57 **Keywords:** oxidative stress, spermatozoon freezing spermatic viability

58

59 4.1. Introdução

60 A inseminação artificial em bovinos é uma biotécnica aplicada à reprodução com
61 maior difusão e impacto no melhoramento genético do rebanho (ANDRABI et al., 2008).
62 Com o congelamento objetiva-se a obter um banco de sêmen a ser utilizado para a
63 inseminação artificial, sendo uma importante ferramenta para o melhoramento genético no
64 rebanho.

65 No entanto, várias alterações bioquímicas e anatômicas na célula espermática
66 (acrossoma, núcleo, mitocôndria, axonema e membrana plasmática) podem ocorrer durante o
67 congelamento e descongelamento. Dessa forma o principal objetivo com protocolos de
68 congelamento é minimizar os danos causados à membrana espermática pela formação de
69 cristais de gelo e também pelo estresse oxidativo causados durante a criopreservação
70 (AMIRAT et al., 2004).

71 O estresse oxidativo é apontado como responsável pela diminuição da fertilidade
72 durante a criopreservação. A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) está envolvida
73 nos danos peroxidativos causados a membrana plasmática e ao DNA dos espermatozóides,
74 durante a estocagem do sêmen criopreservado (BORGES, 2003).

75 O congelamento de sêmen resulta na diminuição da fertilidade em relação ao sêmen
76 fresco, pois há perda de viabilidade espermática e danos na capacidade funcional dos
77 espermatozóides sobreviventes (WATSON, 2000). A diminuição da viabilidade espermática
78 ocorre devido aos danos causados à membrana espermática pelo congelamento e o
79 descongelamento, pois durante esses processos ocorre aumento nos níveis de ROS produzidos
80 elevando os níveis de peroxidação lipídica da membrana espermática (SIKKA, 1996; WANG,
81 1997).

82 A membrana plasmática dos espermatozóides de mamíferos é rica em ácidos graxos
83 insaturados, tornando-os vulneráveis a ROS, ocasionando a lipoperoxidação. A

84 lipoperoxidação pode alterar a estrutura celular, prejudicando a motilidade, viabilidade e as
85 funções metabólicas dos espermatozóides (NOURI et al.,2008).

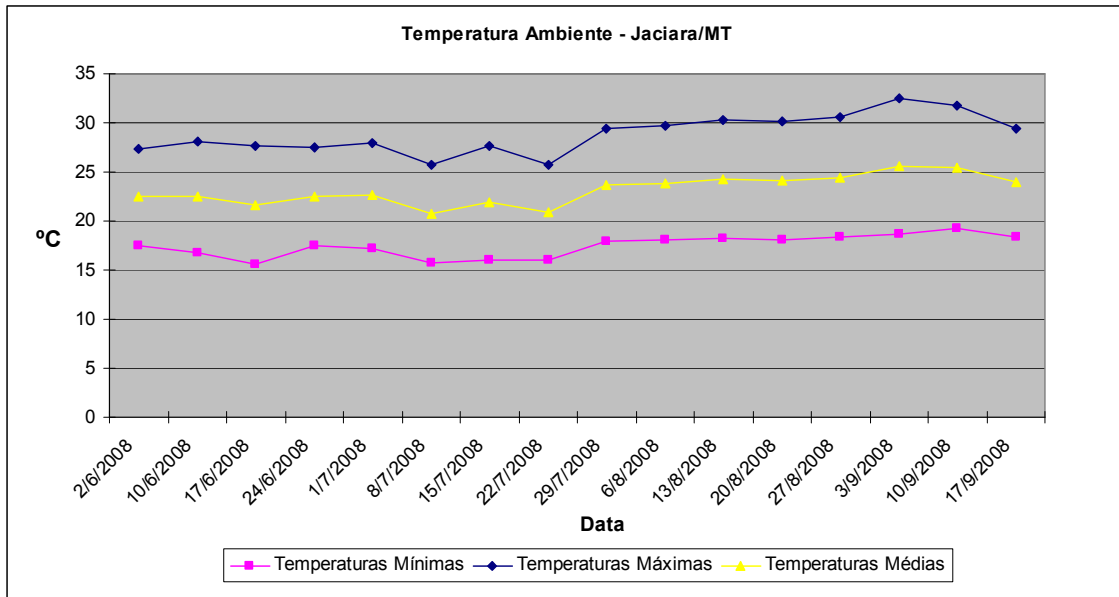
86 A vitamina E possui atividade antioxidante, sendo considerado muito eficaz no
87 controle das reações oxidativas em cadeia, diminuindo os efeitos deletérios causados pelo
88 estresse oxidativo no sêmen (KOHEN et al, 2002).

89 Tendo em vista o fato de que há uma escassez de trabalhos avaliando o uso de
90 vitamina E como antioxidante na suplementação oral de touros criados a campo e o efeito
91 sobre a viabilidade espermática, o objetivou-se com este trabalho avaliar se a suplementação
92 oral de touros com vitamina E altera características seminais e a integridade da membrana
93 espermática no pós-congelamento.

94

95 **4.2. Material e métodos**

96 O experimento foi realizado na Fazenda Sereno - GAP, localizada no município de
97 Jaciara, distante 140 km de Cuiabá, Mato Grosso, no período de junho a setembro de 2008. O
98 município de Jaciara encontra-se na altitude de 367m, latitude 15° 57' 55" sul e longitude 54°
99 58' 06" oeste. O clima da região é tropical, sazonal, com duas estações bem definidas, verão
100 chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). A temperatura média anual é
101 28°C e pluviosidade média anual de 2000 mm (Wikipédia, 2009).



102
103
104
105

Figura 1 – Dados meteorológicos (temperatura mínima, máxima e média) da região de Jaciara, MT - 02/06/2008 à 17/09/2008, Fonte: INMET, 2009.

106
107
108
109
110
111

Foram utilizados 16 touros da raça Brangus com idade média de 24 meses, e peso vivo médio inicial de 462,2 Kg. Ao início do experimento, os animais foram vermifugados (Doramectina 1% - Dectomax®, Pfizer Saúde Animal) e tratados com ectoparasiticida (Cipermetrina + Ethion - Ciperthion®, Shering-Plough), o controle de ectoparasitas foi realizado a cada coleta de dados. E em seguida foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos:

112
113

GC= Grupo controle (suplementação concentrada sem adição de vitamina E);

GE=Grupo vitamina E (suplementação concentrada com 400UI/animal/dia de vitamina E).

114
115
116

A área destinada aos animais experimentais foi constituída de dois piquetes de 7,35 ha, com *Panicum maximum* cv. Mombaça. Providos de bebedouro e cocho para fornecimento do suplemento, cujas dimensões permitiam o acesso de todos os animais simultaneamente.

117
118

Os animais foram mantidos em pastejo, sendo suplementados, com ração concentrada (Tabela 1), uma vez ao dia.

119
120

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

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

123 *Níveis de garantia por kg do produto: Fósforo – 88g; Cálcio – 154g; Cobre – 1700mg; Enxofre – 12g; Cobalto
124 – 200mg; Manganês – 1300mg; Zinco – 5000mg; Iodo – 130mg; Selênio – 20mg; Magnésio – 6mg; Sódio –
125 130mg.

126
127 Os suplementos foram formulados para ganho de peso de 1 kg/dia e conterem 21% de
128 PB na matéria natural. Foram fornecidos em quantidade equivalentes a 4,5 kg/animal/dia e,
129 sempre às 11:00h. Foram coletadas amostras de forragem e do suplemento para posteriores
130 análises no Laboratório de Nutrição Animal da FAMEV-UFMT (Tabela2).

131 Tabela 2. Composição químico-bromatológica do suplemento concentrado e da forragem
132 utilizada na alimentação dos animais experimentais com base na matéria natural

Nutriente	Suplemento (%)	Forragem (%)
Matéria seca (MS)	90,00	37,99
Proteína bruta (PB)	21,00	6,23
Fibra em detergente neutro (FDN)	29,40	67,57
Extrato etéreo (EE)	2,50	1,05
Matéria mineral (MM)	8,43	7,80

133
134 O experimento teve duração de 75 dias. Os animais foram suplementados por um
135 período de 60 dias. Ao final dos 60 dias os animais continuaram recebendo o mesmo manejo,
136 sendo fornecido concentrado sem a suplementação de vitamina E durante 15 dias, para
137 avaliação de possível efeito residual. Antes do período experimental os animais passaram por
138 um período de adaptação de 10 dias, aos piquetes e ao concentrado.

139 Durante o período de suplementação (60 dias) foram feitas 3 coletas com intervalo de
140 30 dias e a quarta e última coleta foi feita 15 dias após a coleta 3, (dias: D0, D30, D60 e D75).

141 Sendo que a coleta 1 foi realizada antes de iniciar a suplementação com vitamina E (D0 – sem
142 suplementação de vitamina E) , no dia seguinte iniciou-se a suplementação com vitamina E
143 dos touros do grupo GE, e 30 dias após realizou-se a coleta 2 (D30- com suplementação de
144 vitamina E) e 60 dias após realizou-se a coleta 3 (D60- com suplementação de vitamina E).

145 Após os 60 dias de suplementação os animais continuaram a receber o mesmo manejo,
146 porém não foi adicionado a vitamina E ao suplemento, e após 15 dias da terceira coleta
147 realizou-se então a coleta 4 (D75- sem suplementação de vitamina E) para avaliação do efeito
148 residual da suplementação vitamínica sobre os parâmetros espermáticos.

149 Para a coleta do sêmen, os animais foram contidos em tronco apropriado e submetidos
150 à higienização do pênis e prepúcio empregou-se o método da eletroejaculação (Eletrovet®,
151 Eletro Veterinária Ltda.) onde os touros foram devidamente contidos em tronco apropriado,
152 protegendo-os de possíveis lesões traumáticas. Para recepção dos ejaculados, foram utilizados
153 sacolas plásticas descartáveis acopladas a um tubo Falcon, protegido de choque térmico e
154 luminosidade. Para o congelamento do sêmen, o diluente utilizado foi o tris-citrato-frutose-
155 gema.

156 A metodologia de congelamento utilizada foi a descrita Beconi et al. (1991). O sêmen
157 foi envasado em palhetas de 0,25 mL, que foram mantidas criopreservadas e armazenadas em
158 botijão criogênico até o momento das análises. As análises foram realizadas no Laboratório de
159 Biotecnologia e Reprodução Animal (LABRA) da Faculdade de Agronomia e Medicina
160 Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) Localizado no
161 município de Cuiabá.

162 O descongelamento do sêmen foi realizado colocando a palheta em banho-maria a
163 37 °C por 30 segundos (Reichenbach et al., 2008). Logo após, o sêmen foi transferido para
164 frascos *eppendorf* de 1,5 ml, previamente aquecidos, para então serem avaliados.

165 As avaliações espermáticas foram realizadas logo após a coleta (sêmen fresco) e após
166 o descongelamento (sêmen criopreservado). Para a avaliação física do sêmen, os seguintes
167 parâmetros foram considerados: motilidade espermática progressiva retilínea e vigor
168 espermático (CBRA, 1998). Uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula
169 previamente aquecida a 37 °C para avaliação da motilidade espermática progressiva retilínea
170 (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de zero a cinco) avaliando-se a
171 velocidade e a intensidade dos movimentos dos espermatozóides que atravessavam o campo
172 microscópico, com aumento de 100 e 400x respectivamente.

173 Para avaliar a integridade da membrana espermática foram utilizados o teste hipo-
174 osmótico, a coloração de eosina/nigrosina e a coloração tripla.

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

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

183 Para observação da reação acrossômica utilizou-se a técnica de
184 Harayama et al. (1993), a qual consiste na coloração tripla dos espermatozóides capacitados.

185 Foi estimado o consumo diário de vitamina E dos animais experimentais, para melhor
186 discutir os resultados encontrados, e os valores da vitamina existentes na gramínea e nos
187 ingredientes do suplemento obtidos no NRC, (2001).

188

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

197

198 **4.3. Resultados e Discussão**

199 Não foi observado efeito ($p=0,1830$) da suplementação para o parâmetro motilidade
200 espermática (MOT) tanto no sêmen fresco quanto no sêmen congelado (Tabela 3), sendo o
201 GC ($60,83\pm 3,21$ e $16,46\pm 3,38$) e GE ($60,26\pm 3,07$ e $26,05\pm 4,40$), respectivamente, no entanto
202 mesmo não havendo diferença significativa entre os tratamentos, podemos observar que a
203 motilidade espermática do sêmen congelado dos animais suplementados com vitamina E
204 ($26,05\pm 4,40$) foi numericamente superior em relação a motilidade espermática do sêmen do
205 grupo controle ($16,46\pm 3,38$), indicando melhorias na viabilidade espermática no sêmen
206 congelado, ou seja, os animais suplementados com vitamina E, possivelmente tiveram uma
207 maior proteção contra os efeitos deletérios da criopreservação sobre a membrana espermática,
208 pois a motilidade espermática é dependente de uma membrana plasmática íntegra

209 Foi observado efeito ($p=0,0001$) do congelamento sobre a motilidade espermática
210 (Tabela 3), resultado esperado pois o processo de criopreservação causa danos na membrana
211 espermática causando redução na motilidade espermática no pós congelamento (SIKKA,
212 1996; WANG, 1997). Corroborando com esses resultados em que houve queda na motilidade
213 espermática no sêmen congelado em relação ao sêmen fresco Borges (2003) observou que

214 houve diferença ($p < 0,05$) na motilidade espermática do sêmen *in natura* ($78,05 \pm 6,64$)
 215 comparando com o sêmen pós congelamento ($56,94 \pm 10,02$).

216 A redução da motilidade espermática do sêmen criopreservado, ocorre devido aos
 217 danos causados à membrana espermática durante o processo de criopreservação, esses danos
 218 são provenientes da formação de cristais de gelo no espermatozóide lesionando as estruturas
 219 celulares e também pela peroxidação lipídica da membrana espermática, pois o processo de
 220 congelamento e descongelamento torna o espermatozóide suscetível ao estresse oxidativo
 221 devido ao aumento na produção de ROS que ocorre nessas etapas, ocorrendo dessa forma
 222 diminuição da motilidade espermática e comprometimento da capacidade de fertilização da
 223 célula espermática (SIKKA, 1996; WANG, 1997; WATSON, 2000).

224 Tabela 3 – Média \pm erro padrão da média das variáveis motilidade espermática (MOT), vigor
 225 espermático (VIG), viabilidade espermática (EOS), integridade de acrossomo
 226 (POPE); espermatozóides com membrana plasmática íntegra (HIPO),
 227 espermatozóides vivos com acrossoma intacto (TRI-1), espermatozóides vivos
 228 com reação acrossômica (TRI-2), espermatozóides mortos com acrossoma intacto
 229 (TRI 3) do sêmen fresco e do sêmen criopreservado de touros Brangus
 230 suplementados com vitamina E (GE) e não suplementados (controle- GC).

	Processamento			
	Fresco		Pós-congelamento	
	GC	GE	GC	GE
MOT (%)	60,83 \pm 3,21	60,26 \pm 3,07	16,46 \pm 3,38	26,05 \pm 4,40
VIG (0-5)	2,71 \pm 0,09	2,42 \pm 0,14	2,04 \pm 0,24	2,31 \pm 0,20
EOS (%)	77,13 \pm 2,02	81,73 \pm 1,77	76,83 \pm 2,07	81,91 \pm 2,56
POPE	93,32 \pm 2,68	91,90 \pm 3,77	98,40 \pm 0,15	98,15 \pm 0,21
HIPO (%)	26,71 \pm 2,89	28,27 \pm 4,14	9,50 \pm 1,45	9,10 \pm 1,70
TRI 1 (%)	91,64 \pm 1,29	90,48 \pm 1,70	15,00 \pm 4,09	18,74 \pm 5,02
TRI 2 (%)	0,51 \pm 0,10	0,40 \pm 0,11	0,14 \pm 0,06	0,21 \pm 0,15
TRI 3 (%)	5,85 \pm 0,99	6,32 \pm 1,15	83,48 \pm 4,08	79,62 \pm 5,23

231

232 Não houve efeito da suplementação com vitamina E para a variável vigor espermático
 233 (VIG) tanto no sêmen fresco quanto no sêmen congelado GC ($2,71 \pm 0,09$ e $2,04 \pm 0,24$) e GE
 234 ($2,42 \pm 0,14$ e $2,32 \pm 0,20$), respectivamente (Tabela 3). Observou-se diferença ($p = 0,0199$) entre
 235 o sêmen fresco e o congelado, da mesma forma como aconteceu com o parâmetro motilidade

236 espermática o vigor também é alterado pelos danos na membrana espermática causados pelo
237 estresse térmico (WATSON, 2000).

238 No entanto observou-se que houve interação ($p=0,0878$) entre tratamento e
239 tempo(fresco e congelado), no qual podemos observar que mesmo o sêmen de ambos os
240 tratamentos apresentarem diminuição no vigor pós congelamento. Entretanto, verificou-se que
241 os animais suplementados com vitamina E apresentaram uma redução torno de 4% pelo
242 processo de criopreservação, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram perda
243 em torno de 24% neste parâmetro.

244 Dessa forma constatou-se que os animais que receberam suplementação oral com
245 vitamina E, tiveram menores perdas de vigor espermático pelo processo de criopreservação,
246 demonstrando dessa forma que a vitamina E estaria atuando como protetor de membrana
247 reduzindo os danos causados à membrana pela criopreservação.

248 A variável viabilidade espermática (EOS) que avalia a porcentagem de
249 espermatozoides vivos utilizando a coloração eosina/nigrosina apresentou efeito ($p=0,0225$)
250 entre as suplementações (Tabela 3). Para o sêmen fresco do GC foi encontrado um percentual
251 de $77,13 \pm 2,03$ e o GE $81,74 \pm 1,77$ de espermatozoides vivos. O sêmen congelado também
252 observou-se efeito ($p=0,0225$) entre os tratamentos, sendo que o GC com percentual de
253 $76,83 \pm 2,07$ e o GE com $81,91 \pm 2,56$ de viabilidade espermática no pós congelamento,
254 destacando-se com esses resultados encontrados que a suplementação oral dos touros com
255 vitamina E melhorou a viabilidade espermática, ou seja, a porcentagem de espermatozoides
256 vivos tanto no sêmen fresco quanto no sêmen congelado melhorou nos animais que foram
257 suplementados com vitamina E na dieta.

258 Bilodeau et al. (2002) relataram que altas concentrações de ROS no sêmen estão
259 associadas ao declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, diminuindo a
260 viabilidade espermática e fragmentação do DNA. A vitamina E é um importante antioxidante

261 lipossolúvel que atua evitando as reações de oxidação em cadeia na membrana espermática,
262 essas reações de peroxidação dos lipídeos da membrana espermática são responsáveis pela
263 diminuição na viabilidade espermática (AGARWAL; SALEH, 2002).

264 Não houve efeito ($p>0,10$) da suplementação para integridade de acrossoma (POPE)
265 no sêmen fresco e no congelado (Tabela 3), sendo o GC ($93,32\pm 2,68$ e $98,39\pm 0,15$) e o GE
266 ($91,90\pm 3,77$ e $98,14\pm 0$).

267 Não houve efeito ($p>0,10$) de suplementação para a integridade da membrana
268 espermática (HIPO), sendo o GC ($26,71\pm 2,89$ e $9,50\pm 1,45$) e o GE ($28,27\pm 4,14$ e $9,10\pm 1,70$),
269 observou-se efeito ($p=0,0001$) de tempo (fresco, congelado), ou seja a criopreservação foi
270 deletério para a membrana espermática, devido aos danos causados pelo congelamento do
271 sêmen. Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, Borges (2003) trabalhando
272 com sêmen de bovinos, observou efeito negativo ($p<0,05$) do processo de criopreservação
273 sobre a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra.

274 Avaliando-se os resultados obtidos pela coloração tripla, não foram observados efeitos
275 ($p<0,10$) das suplementações (GC e GE) e da interação entre tratamentos e criopreservação
276 sobre o conjunto de variáveis formado pela porcentagem de espermatozóides vivos com
277 acrossoma intacto (TRI 1), vivos com reação acrossômica (TRI 2) e mortos com acrossoma
278 intacto (TRI 3). Foi demonstrado efeito negativo da criopreservação sobre este conjunto de
279 variáveis ($p<0,10$).

280 Segundo o NRC (1996), a exigência de vitamina E para bovinos de corte nas fases de
281 crescimento e terminação varia entre 50 à 100 UI de vitamina E/dia. Considerando-se a
282 categoria animal e peso vivo médio dos animais deste experimento, estimou-se o consumo de
283 matéria seca (CMS) em 11,55 kg de MS/dia. Os animais experimentais de ambos os grupos
284 foram mantidos em sistema de pastejo recebendo 4,5 kg de concentrado diariamente. Deste
285 modo, para se obter a quantidade de vitamina E fornecida pela dieta, estimou-se a quantidade

286 da vitamina proveniente na forragem e na ração concentrada (McDOWELL, 1999; NRC,
 287 1996). O total de vitamina E fornecido na dieta dos animais experimentais foi obtido pela
 288 soma dos valores estimados de vitamina E na forragem e na ração concentrada, sendo que o
 289 GE além da vitamina E presente nos alimentos fornecidos durante o período experimental foi
 290 adicionado 400 UI de vitamina E/animal dia.

291 Para a estimativa da vitamina E proveniente da dieta não foi considerado quantidade
 292 proveniente da pastagem, pois segundo o NRC (1996), não são encontrados valores
 293 significativos de vitamina E na maioria das gramíneas. Baseando-se nas estimativas
 294 calculadas na ração, observou-se que os animais do GC receberam diariamente 58 UI de
 295 vitamina E (Tabela 4), atendendo portanto a demanda de vitamina E diária dos animais
 296 estudados. Já os animais do GE, que além da vitamina E fornecido pelos nutrientes da ração
 297 concentrada, foram suplementados com 400 UI de vitamina E/ animal/ dia, totalizando um
 298 fornecimento diário aos animais do GE de 458 UI de vitamina E/animal/dia (Tabela 4).

299 Dessa forma, pode-se constatar que os níveis diários de vitamina E fornecido aos
 300 animais do GE, foram ofertados quatro vezes e meia a mais do que o nível requerido pelos
 301 animais. Dessa forma as exigências diárias de vitamina E de todos os animais experimentais,
 302 tanto o GC quanto o GE, foram atendidas.

303

304 Tabela 4 - Consumo estimado diário de vitamina E na forragem (Mombaça), no concentrado,
 305 no mombaça + concentrado (situação do grupo controle, GC) e no mombaça +
 306 concentrado + suplementação (grupo suplementado com vitamina E, GE) dos
 307 animais experimentais.

Fonte	Vitamina E (UI)
Mombaça	-----
Concentrado	58
Mombaça+ Concentrado (GC)	58
Mombaça + Concentrado + Suplementação (GE)	458

308

309 Avaliando-se parâmetros essenciais para predizer qualidade, integridade e viabilidade
310 espermática pode-se destacar os parâmetros: motilidade, vigor, viabilidade espermática pela
311 coloração de eosina/nigrosina. Desta forma observou-se que a suplementação oral com
312 vitamina E proporcionou efeitos positivos nesses parâmetros, melhorando a motilidade e o
313 vigor espermático e reduzindo perdas pós congelamento, além de proporcionar melhorias na
314 viabilidade espermática tanto no sêmen fresco quanto no sêmen congelado, com isso a
315 suplementação oral com vitamina E para touros em regime de coleta de sêmen em centrais de
316 coleta para inseminação artificial pode ser uma alternativa de minimizar os efeitos deletérios
317 da criopreservação do sêmen.

318 Com base nesses parâmetros avaliados e os resultados obtidos de animais
319 suplementados com 458 UI de vitamina E, que corresponde a quatro vezes e meia a exigência
320 de vitamina E para os animais estudados, conclui-se que esse nível de suplementação foi
321 benéfico para o sêmen submetido ao processo de criopreservação indicando uma melhor
322 proteção da membrana espermática ao estresse oxidativo e os danos de membrana causados
323 pelo congelamento do sêmen.

324

325 **4.5. REFERÊNCIAS**

- 326 AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance,
327 and treatment. **Urologic Clinics of North America** v.29 p.817–827, 2002.
- 328 AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.;
329 COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg
330 yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**,
331 v.61, p.895–907, 2004.
- 332 ANDRABI, S. M. H.; ANSARI, M. S.; ULLAH, N.; AFZAL, M. Effect Of Non-Enzymatic
333 Antioxidants In Extender On Post-Thaw Quality Of Buffalo (Bubalus Bubalis) Bull
334 Spermatozoa. **Pakistan Veterinary Journal**, v.28, n.4, p.159-162, 2008.
- 335 BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence
336 of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p.
337 545-553, 1991.
- 338 BILODEAU, J; BLANCHETTE, S; CORMIER, N; SIRARD, M. Reactive oxygen species-
339 mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender. Protection by piruvate,
340 metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-
341 1122, 2002.
- 342 BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na**
343 **criopreservação do sêmen bovino**. Dissertação (mestrado) apresentado à Universidade
344 Federal de Viçosa, 2003, Viçosa - MG , 2003.
- 345 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) **Manual para exame andrológico e**
346 **avaliação seminal**. 2 ed., Belo Horizonte: CBRA, 49p., 1998.
- 347 FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D.
348 F.; RODRIGUES, M. T.; Oliveira, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat
349 spermatozoa **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.139-144, 2005.
- 350 HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to
351 undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the eggplasma membrane.
352 **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.
- 353 JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.;
354 ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the funcional integrity of the human
355 sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of**
356 **Reproduction and Fertiltity**, v.47, p. 219-228, 1984.
- 357 KOHEN, R.; NYSKA, A. Review :Oxidation of Biological Systems: Oxidative stress
358 phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification . **Toxicologic**
359 **Pathology**, vol 30, no 6, p. 620–650, 2002.
- 360 McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition**. New York: Academic press, 486 p.,
361 1999.
- 362 NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) **Nutrient requiriments of beef cattle**. 7
363 rev.ed., Washington D.C.: National Academy Press. 1996. 242 p.
- 364 NOURI, M.; GHASEMZADEH, A.; FARZADI, L.; SHAHNAZI, V.; NOVIN, M. G.
365 Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of

- 366 asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. **Iranian Journal of Reproductive**
367 **Medicine**, v.6, n.1, p.1-5, 2008.
- 368 SAS. **The statistical analyze systems for windows**: version 8. Cary, 1999-2001.CD-Rom.
- 369 SIKKA, S. C. Oxidative stress an role of antioxidants in normal and abnormal sperm function.
370 **Frontiers in Bioscience Journal**, v.1, p.78-86, 1996.
- 371 WANG, Y.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Effect of cryopreservation and sperm
372 concentration on lipid peroxidation in human semen. **Adult Urology**, v.50, p. 409-413, 1997.
- 373 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
374 **Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- 375 WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of**
376 **human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of
377 the University of Cambridge, 120p. 1992.
- 378 WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Jaciara>,
379 Acesso em: 22 de Janeiro de 2009
380

381 **4.4. Conclusões Gerais**

382 Com base nos resultados obtidos nas condições de manejo utilizados nos animais
383 estudados, onde os animais foram suplementados com 458 UI /animal /dia de vitamina E.
384 Conclui-se que a suplementação não teve efeitos sobre a qualidade seminal e integridade da
385 membrana espermática no sêmen fresco dos touros avaliados, porém houve melhora no sêmen
386 congelado melhorando a qualidade espermática com base nos parâmetros de motilidade e
387 vigor espermático que tiveram menores perdas nos animais que receberam a suplementação
388 vitamínica. Também houve melhoria na viabilidade espermática com maior porcentagem de
389 células viáveis no sêmen congelado dos animais suplementados com vitamina E. Com isso a
390 suplementação oral com vitamina E para touros em regime de coleta de sêmen para
391 congelamento é uma boa alternativa para minimizar os danos causados à membrana
392 espermática durante a criopreservação. No entanto para o sêmen fresco a suplementação oral
393 com vitamina E para touros não houve melhoria na qualidade seminal.

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](#)