

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

NÍVEIS DE SELÊNIO NA DIETA DE COELHOS E A  
INFLUÊNCIA NA QUALIDADE E NOS MÉTODOS DE  
CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

Autora: Marcela Mataveli  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

NÍVEIS DE SELÊNIO NA DIETA DE COELHOS E A  
INFLUÊNCIA NA QUALIDADE E NOS MÉTODOS DE  
CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

Autora: Marcela Mataveli  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.”

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M291n Mataveli, Marcela  
Níveis de selênio na dieta de coelhos e a influência na qualidade e nos métodos de conservação do sêmen / Marcela Mataveli. -- Maringá : [s.n.], 2008.  
39 f.

Orientador : Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal, 2008.

1. Reprodução animal. 2. Sêmen. 3. Resfriamento de sêmen. 4. Congelamento de sêmen. 5. Nutrição animal. 6. Antioxidantes. 7. Selênio. 8. Glutathione peroxidase. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 21.ed. 636.0824



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

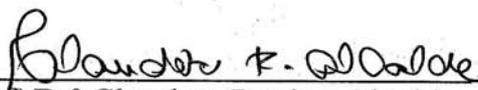
**NÍVEIS DE SELÊNIO NA DIETA DE COELHOS E A  
INFLUÊNCIA NA QUALIDADE E NOS MÉTODOS  
DE CONSERVAÇÃO DE SÊMEN**

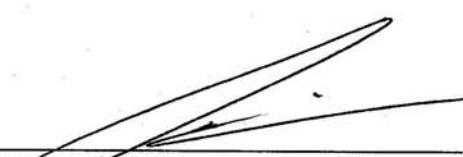
Autora: Marcela Mataveli

Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 29 de abril de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudete Regina Alcalde

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Aparecida  
Andreazzi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes  
(Orientador)

Ao meu saudoso avô, Atilio Mataveli *in memoriam*, a minha amada mãe,  
Neide Cabral, e a minha querida tia, Luzia Mara Mataveli de Araújo,

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e pela a benção da saúde.

Ao meu avô, Atílio Mataveli *in memorian*, a minha mãe, Neide Cabral, e a minha tia, Luzia Mara Mataveli de Araújo, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu prezado orientador, Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes, pelos valiosos ensinamentos, pelo profissionalismo, pelo apoio e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá e a Fazenda Experimental de Iguatemi, pela viabilização e execução do protocolo experimental deste estudo.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Scapinello, pelos ensinamentos e contribuição neste estudo.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi Ezupério Salim, Antônio Parma e Pedro Barizão, pela grande contribuição na realização deste estudo.

À laboratorista Zeni Maria Barbosa, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

Às acadêmicas, Thaís Cristina Carneiro, Cláudia Helena Ferreira Zago e Lorena Batista de Moura, do curso de graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá, pela contribuição na realização das análises laboratoriais.

Aos meus amigos Gisele Carrara da Silva, Marco Antônio Bensimon Gomes, Wallacy Barbacena, Silvana Teixeira e Paulo Levi pelo apoio e companheirismo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste estudo.

## BIOGRAFIA

MARCELA MATAVELI, filha de Atílio Rodolfo Mataveli e Neide Cabral, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 16 de abril de 1982.

No ano de 2005, concluiu o curso de graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá.

No ano de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução Animal.

No mês de abril de 2008, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de Mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
II. OBJETIVO GERAL.....	7
III. NÍVEIS DE SELÊNIO NA PRODUÇÃO DE SÊMEN DE COELHOS.....	8
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>SUMMARY</b> .....	8
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
<i>Local do experimento</i> .....	10
<i>Seleção dos animais e instalações</i> .....	10
<i>Alimentação</i> .....	11
<i>Tratamentos</i> .....	12
<i>Coleta e avaliação do sêmen</i> .....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	22
IV. INFLUÊNCIA DE SELÊNIO SUPLEMENTAR DIETÉTICO NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE COELHOS.....	25
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>SUMMARY</b> .....	25
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
<i>Local do experimento</i> .....	27
<i>Animais e instalações</i> .....	27
<i>Alimentação</i> .....	27
<i>Tratamentos</i> .....	28
<i>Coleta e avaliação do sêmen</i> .....	29
<i>Resfriamento e congelamento</i> .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	38

## LISTA DE TABELAS

	Página
NÍVEIS DE SELÊNIO NA PRODUÇÃO DE SÊMEN DE COELHOS	
<b>TABELA 1.</b> Média estimada e erro padrão dos parâmetros espermáticos, de três coletas de sêmen, de coelhos Nova Zelândia Branco, na fase pré-experimental.....	11
<b>TABELA 2.</b> Composição percentual dos ingredientes da ração de coelhos da raça Nova Zelândia Branco.....	11
<b>TABELA 3.</b> Média estimada e erro padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio (0; 0,6; 0,9; e 1,2 mg de selênio/ kg de ração), no período de 90 dias.....	17
<b>TABELA 4.</b> Média estimada, distribuição de probabilidade e intervalo de confiança das anormalidades espermáticas do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio (0; 0,6; 0,9; e 1,2 mg de selênio/ kg de ração), no período de 90 dias.....	20
INFLUÊNCIA DE SELÊNIO SUPLEMENTAR DIETÉTICO NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE COELHOS	
<b>TABELA 1.</b> Composição percentual dos ingredientes da ração de coelhos da raça Nova Zelândia Branco.....	28
<b>TABELA 2.</b> Composição do meio diluidor para conservar sêmen de coelhos a 5°C ou, para a pré-diluição, no uso de congelamento.....	31
<b>TABELA 3.</b> Composição do meio diluidor, com crioprotetor, para congelamento do sêmen de coelhos.....	31
<b>TABELA 4.</b> Morfologia espermática do sêmen resfriado, a 5°C, de coelhos suplementados com 0; 0,6; 0,9 e 1,2 mg de selênio/ kg de ração.....	35

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>NÍVEIS DE SELÊNIO NA PRODUÇÃO DE SÊMEN DE COELHOS</b>	
<b>FIGURA 1.</b> Níveis de selênio no plasma de coelhos Nova Zelândia Branco, após 90 dias de alimentação com níveis crescentes de selênio. $y = 0,120 + 0,029x$ , $P < 0,05$ .....	15
<b>FIGURA 2.</b> Volume de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias. $y = 0,9947 - 0,0401x$ , $P < 0,0184$ .....	16
<b>FIGURA 3.</b> Concentração espermática do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias. $y = 220784725,7 + 26642842,8x$ , $P < 0,0001$ . * multiplicado por $10^8$ ; spz = espermatozóide.....	18
<b>FIGURA 4.</b> Incidência de espermatozóides com anormalidades primárias, no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias. $y = 11,8213 + 0,6521x$ , $P < 0,0231$ .....	19
<b>FIGURA 5.</b> Incidência de espermatozóides com cauda enrolada, no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias. $y = e^{1,3087 + 0,1019x}$ , $P < 0,0032$ .....	21
<b>INFLUÊNCIA DE SELÊNIO SUPLEMENTAR DIETÉTICO NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE COELHOS</b>	
<b>FIGURA 1.</b> Níveis de selênio no plasma de coelhos Nova Zelândia Branco, após 90 dias de alimentação com níveis crescentes de selênio. $y = 0,120 + 0,029x$ , $P < 0,05$ .....	33
<b>FIGURA 2.</b> Motilidade espermática progressiva do sêmen resfriado a 5°C de coelhos Nova Zelândia Branco, no período de 3 dias de conservação, aos 90 dias de ingestão de níveis crescentes de selênio. $y = e^{2,9136 + 0,3357x}$ , $P < 0,0001$ .....	34

- FIGURA 3.** Motilidade espermática progressiva média, dos quatro níveis de selênio, do sêmen de coelhos em função do tempo.  $y = e^{3,8891 - 0,0214x}$ ,  $P < 0,0001$ ..... 35
- FIGURA 4.** Percentual de espermatozóides anormais no sêmen congelado de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio.  $y = e^{3,3575 - 0,2358x}$ ,  $P < 0,0343$ ..... 37
- FIGURA 5.** Percentual de anormalidades primárias no sêmen congelado de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio.  $y = e^{3,0321 - 0,5800x}$ ,  $P < 0,0031$ ..... 37

## RESUMO

Considerando as funções do selênio no combate aos radicais livres, no aumento da motilidade espermática progressiva e na manutenção da estrutura do DNA, realizou-se este estudo com objetivo de verificar, em coelhos, a influência de teores suplementares dietéticos de selênio no sêmen fresco, resfriado ou congelado. Foram utilizados 60 coelhos, com seis meses de idade, divididos em quatro tratamentos: 1) controle; 2) suplementação com 0,6 mg de selênio/kg de ração; 3) suplementação com 0,9 mg de selênio/kg de ração; 4) suplementação com 1,2 mg de selênio/kg de ração. Verificou-se que a suplementação de selênio resultou em aumento da concentração espermática no sêmen fresco de coelhos, mas o número de espermatozóides no ejaculado não foi diferente entre os grupos suplementados. Ainda, constatou-se que o aumento dos níveis de selênio resultou em aumento do percentual das anormalidades primárias e da cauda enrolada, no sêmen fresco de coelhos. Entretanto, notou-se que a inclusão de 1,2 mg de selênio/kg de ração melhorou a motilidade espermática progressiva do sêmen resfriado de coelhos, a 5°C, e reduziu o percentual de espermatozóides anormais e anormalidades primárias no sêmen congelado. Conclui-se que o suprimento das exigências nutricionais seja suficiente para produção de sêmen fresco, mas a inclusão de 1,2 mg de selênio/kg de ração é indicada para animais cujo sêmen será submetido aos processos de resfriamento e congelamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes, congelamento, radicais livres, reprodução, resfriamento.

## ABSTRACT

Considering selenium functions against free radicals, in the increase of spermatic progressive motility and in the DNA structure maintenance, this study was carried out with the objective to verify, in rabbits, the influence of supplemental dietary selenium levels in fresh, cooled and frozen semen. There were used 60 rabbits, six months old, divided in four treatments: 1) control; 2) supplementation with 0.6 mg of selenium/kg of ration; 3) supplementation with 0.9 mg of selenium/kg of ration; 4) supplementation with 1.2 mg of selenium/kg of ration. It was verified that selenium supplementation resulted in increase of spermatic concentration in fresh semen of rabbits, but the number of spermatozoa in ejaculated semen was not different among supplemented groups. Thereby, it was observed that the increase in selenium levels resulted in the increased of primary abnormalities percentage and coiled tail percentage in fresh semen. However, it was verified that the inclusion of 1.2 mg of selenium/kg of ration improved the spermatic progressive motility in cooled semen of rabbits, at 5°C, and reduced the percentage of abnormal spermatozoa and primary abnormalities in the frozen semen of rabbits. It was concluded that the supply of nutritional exigencies is enough for production of fresh semen, but the inclusion of 1.2 mg of selenium/kg of ration is indicated for animals whose semen will be submitted to cooling and freezing processes.

**KEY WORDS:** Antioxidants, cooled semen, free radicals, frozen semen, reproduction.

## I. INTRODUÇÃO GERAL

Os coelhos são utilizados em vários estudos referentes a fisiologia seminal e a fertilização, devido a facilidade na coleta de sêmen e a possibilidade de controle da inseminação artificial por meio da ovulação e por meio de tratamento com hormônio luteinizante ou hormônio liberador de gonadotropina, sendo o controle do tempo entre a ovulação e a inseminação artificial fundamental nos estudos envolvendo capacitação espermática (CHEN et al., 1989).

Os microminerais cobalto, cobre, selênio e zinco estão presentes, em pequenas quantidades e, são importantes para as diferentes funções do organismo e, assim, a produção (McDOWELL, 1992) incluindo a atividade reprodutiva (BOLAND, 2003).

O selênio apresenta número atômico de 34 e peso atômico de 78,96 daltons e pode apresentar valência de -2 até +6 (McDOWELL, 1992). É considerado um nutriente essencial para humanos e animais, visto que a deficiência causa problemas reprodutivos e a suplementação melhora o desempenho reprodutivo, sendo o selênio necessário a espermatogênese e ao desenvolvimento testicular (HAWKES & TUREK, 2001). OLSON et al. (2004) relataram que a deficiência de selênio além de reduzir o tamanho do testículo, pode gerar, em longo prazo, atrofia dos túbulos seminíferos. Segundo BECKETT & ARTHUR (2005) a deficiência, ainda, causa prejuízos na motilidade espermática e eleva a incidência de espermatozoides com anormalidades na parte intermediária do flagelo. De acordo com KOLODZIEJ & JACYNO (2004) altas concentrações de selênio no testículo e epidídimo de suínos indicaram a importância deste micromineral no processo de produção e maturação do espermatozoide.

Os espermatozoides contêm altas concentrações de selênio, sendo que a deficiência afeta a síntese da cápsula mitocondrial e pode resultar em infertilidade, devido a redução da motilidade espermática e prejuízo na espermatogênese (HOLBEN & SMITH, 1999).

HAWKES & TUREK (2001) afirmaram que o selênio compõe, na forma selenocisteína, o centro catalítico de enzimas como a glutathiona peroxidase envolvida na antioxição, a iodotironina deiodinase envolvida no metabolismo de hormônios da tireóide, a tioredoxina redutase envolvida na antioxição e na transdução de sinais, e a selenofosfatase sintetase envolvida na síntese de selenoproteínas.

De acordo com HOLBEN & SMITH (1999) existem quatro tipos de glutathiona peroxidase: a glutathiona peroxidase celular ou clássica, a glutathiona peroxidase plasmática ou extracelular, a fosfolípido hidropéroxido glutathiona peroxidase e a glutathiona peroxidase gastrointestinal. Ainda, os autores ressaltaram que apesar da distinção entre os tipos de glutathiona peroxidase, estas enzimas, geralmente, catalisam a redução de péroxidos que poderiam causar danos as células e aos tecidos. No entanto, MAIORINO et al. (2003) relataram que a enzima fosfolípido hidropéroxido glutathiona peroxidase é a principal selenoproteína do espermatozóide, sendo considerada essencial no processo de fertilização devido aos seus múltiplos papéis na espermatogênese, como a detoxificação de hidropéroxido, a formação da cápsula mitocondrial e a condensação da cromatina.

As células vivas, assim como o espermatozóide, sob condições aeróbias, produzem espécies de oxigênios reativos originários da atividade metabólica (LAMIRANDE et al., 1997). As espécies de oxigênios reativos são radicais livres que desempenham funções importantes no processo fisiológico espermático como a capacitação, a hiperativação e a fusão espermatozóide-oócito (AGARWAL et al., 2005).

Observa-se, normalmente, equilíbrio entre a produção de radicais livres e seus sistemas inibidores, porém, fatores como a radiação, a irradiação solar, a bioativação de xenobióticos, as células inflamatórias, o aumento do metabolismo celular, a ativação de oxidases e oxigenases, os distúrbios endógenos liberadores de elétrons, a descompartimentalização de íons metais de transição e a perda da capacidade antioxidante, podem determinar aumento na produção de espécies de oxigênios reativos, resultando no estresse oxidativo, que em condições extremas, afeta todos os componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e açúcares (GUERRA et al., 2004). Uma das possíveis explicações para o estresse oxidativo no espermatozóide, segundo GUERRA et al. (2004) baseia-se no fato de que, em mamíferos, as membranas plasmáticas são ricas em ácidos graxos polinsaturados, tornando-as muito fluidas e, ao mesmo tempo, muito susceptíveis aos danos peroxidativos que determinam a perda de suas funções e da integridade do DNA. Ainda,

de acordo com os autores, outra explicação para o estresse oxidativo é baseada no fato de os espermatozóides descartarem grande parte do citoplasma, nos estágios finais da espermatogênese, eliminando enzimas antioxidantes, aumentando a susceptibilidade do espermatozóide ao ataque dos radicais livres.

De acordo com AGARWAL et al. (2005) há duas principais fontes produtoras de espécies de oxigênios reativos no sêmen: os leucócitos e os espermatozóides imaturos. Ainda, segundo os autores, o espermatozóide produz espécies de oxigênios reativos, principalmente, quando ocorreram defeitos durante a espermatogênese, existindo alta correlação positiva entre os espermatozóides imaturos e a produção de espécies de oxigênios reativos. Ainda, AGARWAL et al. (2005) relataram que os principais locais de produção de espécies de oxigênios reativos, em nível celular, são a mitocôndria e a membrana plasmática.

GUERRA et al. (2004) observaram que a proteção contra a alta produção de espécies de oxigênios reativos e a prevenção de danos celulares ocorre por meio da capacidade antioxidante total, encontrada nos espermatozóides e no plasma seminal. Desta maneira, de acordo com os autores, quando as enzimas intracelulares não conferem proteção total a membrana plasmática, os espermatozóides obtêm antioxidantes do plasma seminal, que não é a única fonte extracelular de antioxidantes, visto que o epidídimo e a secreção das glândulas sexuais acessórias contribuem com inibição dos radicais livres.

TRAMER et al. (1998) relataram que no epidídimo, os espermatozóides passam por diversos estágios de maturação, nos quais, a membrana plasmática é submetida a alterações em sua composição e estabilidade, sendo os antioxidantes fundamentais na garantia de espermatozóides maduros e aptos para, posterior, reação acrossomal. Sendo assim, os autores verificaram, na cabeça do epidídimo de ratos, a atividade de enzimas como a fosfolípídeo hidroperóxido glutaciona peroxidase, a glutaciona peroxidase e a superóxido dismutase, além de grandes quantidades de vitamina E. Apesar da vitamina E e do selênio desempenharem funções similares no combate aos radicais livres, McDOWELL (1992) destacou que a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel específico de membrana e o selênio, como componente da enzima glutaciona peroxidase, destrói os peróxidos antes do ataque a membrana. WU et al. (1979) relataram que a suplementação de ratos com grandes quantidades de vitamina E não amenizou os sintomas de deficiência de selênio. FORD (2004) notou que as alterações que ocorriam na membrana plasmática, durante a maturação dos espermatozóides, são

devido as modificações de proteínas, sendo estas modificações moduladas pelo ambiente do epidídimo ou espontaneamente. Este autor ressaltou que a maturação resulta em condensação nuclear, mudanças na expressão gênica e distribuição de moléculas na superfície do espermatozóide. De acordo com LUBERDA (2005) a concentração de glutathione peroxidase diminuiu 75% durante a maturação do espermatozóide de bovinos, durante a migração entre a cabeça do epidídimo e a saída do espermatozóide no ejaculado, o que ressalta a importância da capacidade antioxidante na viabilidade do espermatozóide.

Muitos procedimentos utilizados em laboratórios podem interferir na concentração de antioxidantes espermáticos. Assim, GUERRA et al. (2004) relataram que um dos aspectos importantes da criopreservação é a remoção do plasma seminal, fonte de antioxidantes, que aumenta a susceptibilidade do espermatozóide ao ataque de radicais livres, observando-se redução irreversível na motilidade espermática, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozoides. Ainda, os autores afirmaram que o processo de descongelamento também causa peroxidação lipídica e danos na membrana, decorrentes do rápido aumento na utilização de oxigênio pelos espermatozoides, determinando maior produção de radicais livres. No entanto, BUSTAMANTE FILHO et al. (2006) mencionaram que a qualidade do sêmen armazenado depende dos procedimentos de diluição, centrifugação e adição de meio diluidor. Os autores relataram, também, que as técnicas de criopreservação reduzem a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase, mas destacaram que estas técnicas não afetam as enzimas contidas no meio diluidor, fato que permite aperfeiçoar os protocolos de criopreservação de sêmen de equinos com adição de enzimas antioxidantes.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654-660, 2005.
- BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 455-465, 2005.
- BOLAND, M. P. Trace minerals in production and reproduction in dairy cows. **Advances in Dairy Technology**, v. 15, p. 319-330. 2003.
- BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA – FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73, 2006.
- CHEN, Y.; LI, J.; SIMKIN, M. E.; YANG, X.; POOTE, R. H. Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 848-853, 1989.
- FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 387-399, 2004.
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HAWKES, W. C.; TUREK, P. J. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 764-772, 2001.
- HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 7, p. 836-843, 1999.
- KOŁODZIEJ, A.; JACYNO, E. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 7, n. 1, 2004. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl>>. Acesso em: 25 mar. 2007.
- LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

MAIORINO, M.; BOSELLO, V.; URSINI, F.; FORESTA, C.; GAROLLA, A.; SCAPIN, M.; SZTAJER, H.; FLOHÉ, L. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1134-1141, 2003.

McDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. London: Academic Press. 1992. 524 p.

OLSON, G. E.; WINFREY, V. P.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. **Reproduction Research**, v. 127, p. 335-342, 2004.

TRAMER, F.; ROCCO, F.; MICALI, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 753-758, 1998.

WU, S. H.; OLDFIELD, J. E.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. **Biology of reproduction**, v. 8, p. 625-629, 1979.

## II. OBJETIVO GERAL

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar, em coelhos, a influência de selênio suplementar dietético na qualidade do sêmen fresco, resfriado ou congelado.

### III. NÍVEIS DE SELÊNIO NA PRODUÇÃO DE SÊMEN DE COELHOS

**RESUMO:** O selênio é constituinte essencial da enzima glutathiona peroxidase que combate os radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo. Assim, avaliou-se a influência de teores suplementares dietéticos de selênio (0; 0,6; 0,9 e 1,2 mg de selênio/kg de ração) na produção do sêmen de coelhos. Entretanto, apesar da maior suplementação de selênio resultar em aumento de 12,65% da concentração espermática, em relação ao controle, não se observou influência no número de espermatozoides no ejaculado. Ainda, a suplementação de 1,2 mg de selênio/kg de ração, resultou em aumento de 6,21% nas anormalidades primárias e de 26,47% na cauda enrolada, em relação ao controle. Desta maneira, concluiu-se que o suprimento das exigências nutricionais é suficiente para coelhos reprodutores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes, glutathiona peroxidase, radicais livres, reprodução.

#### SELENIUM LEVELS IN RABBITS SEMEN PRODUCTION

**SUMMARY:** Selenium is an essential constituent of glutathione peroxidase enzyme that acts against free radicals, preventing the oxidative stress. So, it was evaluated the influence of supplemental dietary selenium levels (0; 0.6; 0.9 and 1.2 mg of selenium/kg of ration) in rabbits semen production. However, in spite of the higher selenium supplementation results in increase of 12.65% of the spermatic concentration, in relation to the control, it was not observed influence in the spermatozoa number in ejaculated semen. Thereby, the supplementation of 1.2 mg of selenium/kg of ration resulted in increase of 6.21% in the primary abnormalities and of 26.47% in the coiled tail, in relation to the control. So it was concluded that the supply of nutritional exigencies is enough for rabbits reproducers.

**KEY WORDS:** Antioxidants, free radicals, glutathione peroxidase, reproduction.

#### INTRODUÇÃO

O selênio é constituinte essencial da enzima glutathione peroxidase que ajuda na proteção das membranas de danos peroxidativos (McDOWELL, 1992).

O testículo contém altas quantidades de selênio, o que ressalta importância deste micromineral nas funções testiculares, sendo que a deficiência resulta em produção de sêmen de baixa qualidade, traduzido por prejuízos na motilidade espermática progressiva e espermatozoides com anormalidades na parte intermediária do flagelo (BECKETT & ARTHUR, 2005).

Os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem membranas contendo grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, o que induz a formação de espécies de oxigênio reativos, que são uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (AGARWAL & SAID, 2005; ALVAREZ & MORAES, 2006).

A peroxidação lipídica da membrana celular causada pelo estresse oxidativo determina substancial perda de ácidos graxos insaturados, com conseqüente redução na fluidez, responsável pela fusão espermatozoide – oócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao  $Ca^{2+}$  e na motilidade espermática (GUERRA et al., 2004).

CASTELLINI et al. (2003) afirmaram que o aumento de  $\alpha$ -tocoferol no plasma sanguíneo de coelhos se eleva com a idade devido, provavelmente, ao aumento de lipoproteínas. Para estes autores, a vitamina C e E podem reverter os processos de peroxidação lipídica, destacando-se que o coelho tem capacidade de sintetizar vitamina C em nível de ceco. Apesar da vitamina E e do selênio desempenharem funções similares no combate aos radicais livres, McDOWELL (1992) destacou que a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel específico de membrana e o selênio, como componente da enzima glutathione peroxidase, que destrói os peróxidos antes do ataque a membrana. No entanto, WU et al. (1979) verificaram que a suplementação de ratos com grandes quantidades de vitamina E não amenizou os sintomas deficiência de selênio. Ainda, de acordo com WU et al. (1979) a deficiência de selênio na dieta de ratos resultou em espermatozoides sem motilidade progressiva, mesmo quando estes animais receberam suplementação de antioxidantes, enfatizando que o selênio é essencial para a boa formação da célula espermática. Notaram, também, que a suplementação com selênio aumentou o peso testicular dos ratos.

Diante das evidências, das funções e da importância do selênio na reprodução do macho e, considerando a ausência de trabalhos que envolvem o uso deste micromineral em valores dietéticos acima daqueles recomendados pelas tabelas nutricionais na qualidade do sêmen de coelhos, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar, em coelhos, a influência de selênio suplementar dietético na qualidade do sêmen.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Local do experimento*

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, a qual se encontra a 23°25' de latitude sul, a 51°57' de longitude oeste de Greenwich e 550 m de altitude, e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, de outubro de 2007 a janeiro de 2008, sendo, neste período, a temperatura média de  $25,65 \pm 0,70^{\circ}\text{C}$ , a umidade relativa média de  $66,5 \pm 6,35\%$  e a precipitação pluviométrica total de 629,30 mm.

### *Seleção dos animais e instalações*

Foram utilizados 60 machos da raça Nova Zelândia Branco, com idade inicial de seis meses, peso médio inicial de  $3,47 \pm 0,21$  kg e final de  $3,74 \pm 0,29$  kg. Estes animais foram submetidos a três avaliações de sêmen e, posteriormente, divididos em três grupos (TABELA 1) de acordo com a qualidade inicial do sêmen, em que as coletas foram realizadas com vagina artificial a cada quatro dias. Para divisão dos grupos, utilizou-se análise de variância não paramétrica, do SAEG (1997), por meio do Teste de Kruskal-Wallis. Destaca-se que os parâmetros seminais (TABELA 1), considerados na formação dos grupos, foram aqueles que poderiam ser influenciados, diretamente, pela adição de selênio.

Os animais de cada grupo foram, aleatoriamente, distribuídos em quatro tratamentos, com 15 animais por tratamento, sendo alojados, individualmente, em gaiolas

de arame galvanizado medindo 40 cm X 60 cm X 45 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), providas de bebedouro automático e comedouro semi-automático.

**TABELA 1.** Média estimada e erro padrão dos parâmetros espermáticos, de três coletas de sêmen, de coelhos Nova Zelândia Branco, na fase pré-experimental.

Parâmetros	Grupo 1 (n <sup>*</sup> =12)	Grupo 2 (n <sup>*</sup> =16)	Grupo 3 (n <sup>*</sup> =32)
Motilidade espermática progressiva (%)	19,17 ± 4,25	40,66 ± 3,91	58,39 ± 1,96
Vigor espermático (pontos)	1,86 ± 0,20	2,81 ± 0,21	3,57 ± 0,11
Espermatozóides normais (%)	56,89 ± 2,58	66,57 ± 1,80	63,98 ± 1,50
Espermatozóides anormais (%)	50,44 ± 2,66	40,83 ± 1,79	42,29 ± 1,36
Anormalidades primárias (%)	28,11 ± 2,05	22,61 ± 1,92	21,57 ± 0,99
Anormalidades secundárias (%)	22,33 ± 1,67	18,20 ± 1,05	20,72 ± 0,93

\*n= número de animais.

### *Alimentação*

A ração (TABELA 2) foi formulada de acordo com NRC (1977) com 90,47% de matéria seca, 17,80% de proteína bruta, 13,12% de fibra bruta, 1,57% de extrato etéreo e 3792,20 Kcal de energia digestível/kg de ração. Estas análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com os procedimentos descritos por SILVA (1990).

**TABELA 2.** Composição percentual dos ingredientes da ração de coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

Ingredientes	Quantidade (%)
Milho moído	25,27
Farelo de soja	14,00
Farelo de trigo	24,00
Feno de alfafa	23,30
Feno de coast cross	10,00
Sal comum	0,40
Fosfato Bicálcico	0,80
Calcário Calcítico	1,00
DL-Metionina	0,60
Bacitracina	0,05
Cicostrat Robenidina	0,08
Premix*	0,50
TOTAL	100,00

\* Premix, composição por kg do produto: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200 mg ; Vit B12, 2.000mcg; Ac. Pantotênico, 2.000 mg; Colina, 70.000 mg; Ferro, 8.000 mg; Cobre, 1.200 mg; Cobalto, 200 mg; Manganês, 8.600 mg; Zinco, 12.000 mg; Iodo, 64 mg; Selênio, 16 mg; Metionina, 120.000 mg; Antioxidante, 20.000 mg.

O selênio foi misturado, previamente, em 1 kg de milho moído e, posteriormente, em quantidades maiores deste ingrediente, no misturador “Y”, por 15 minutos. O milho moído com os respectivos níveis de selênio e os demais ingredientes da ração foram misturados, durante 15 minutos, em um misturador vertical e processados, posteriormente, por meio da peletização, sendo que o tamanho dos péletes foi de 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento.

A água e a ração foram fornecidas a vontade aos animais, porém, semanalmente, foram pesadas as sobras de ração, para determinar a ingestão média diária, por animal, que foi de  $118,00 \pm 9,94$  gramas.

### *Tratamentos*

Foram testadas quatro concentrações de selênio: 1) controle; 2) suplementação com 0,6 mg de selênio/kg de ração; 3) suplementação com 0,9 mg de selênio/kg de ração; 4) suplementação com 1,2 mg de selênio/kg de ração. Utilizou-se como fonte de selênio, o selenito de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), com 45,6% de selênio. O total de selênio na ração foi: 0,78 mg de selênio/kg de ração, no controle; 1,20 mg de selênio/kg de ração, com suplementação de 0,6 mg de selênio/kg de ração; 0,54 mg de selênio/kg de ração, com suplementação com 0,9 mg de selênio/kg de ração; 1,41 mg de selênio/kg de ração, suplementação com 1,2 mg de selênio/kg de ração. A determinação de selênio nas rações foi realizada pelo Laboratório Greenlab, de Porto Alegre-RS, por meio de equipamento de absorção atômica SM 3500 Se, de acordo com o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-21<sup>th</sup> edition”.

### *Coleta e avaliação do sêmen*

A coleta do sêmen foi realizada uma vez por semana, durante doze semanas. A coleta foi com vagina artificial com temperatura de  $44^\circ\text{C}$ , desenvolvida pelo Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, constituída de tubo plástico com oito cm de comprimento por quatro cm de diâmetro, revestida, internamente, com membrana de preservativo não lubrificado e copo coletor graduado (SCAPINELLO et al.,

1997) utilizando uma coelha em cio para coletar o sêmen. Logo após cada coleta foi verificado o volume com e sem gel, por meio da graduação do copo coletor, a cor que foi classificada em escores de 1 a 5 pontos, sendo que um (1) representou a coloração branco cremoso, dois (2) branco leitoso, três (3) branco aquoso, quatro (4) amarelo e, cinco (5) avermelhado. O pH foi verificado por meio de papel de tornassol, colocando uma gota de sêmen sobre a fita, efetuando a leitura em escala própria de 0 a 14.

Os outros parâmetros avaliados no sêmen foram: concentração de espermatozóides ( $\text{mm}^3$ ), motilidade espermática progressiva (%), vigor espermático (pontos) e morfologia (%). Sendo os procedimentos descritos como:

Concentração espermática: o sêmen foi diluído em formol salina tamponada ( $\text{pH}=7$ ) na proporção de 1:100, utilizando pipeta de Shali (0,02 mL). Feita a diluição, preencheu-se, por capilaridade, a câmara de Neubauer e os espermatozóides foram contados em cinco quadrados maiores da referida câmara e depois, somados e divididos por 80 quadrados pequenos, multiplicando por 400 quadrados pequenos da câmara, pela diluição e pela altura da câmara, obtendo-se a quantidade de espermatozóides por  $\text{mm}^3$  de sêmen.

Com os valores dos volumes individuais e da concentração espermática foi calculado, o número espermatozóides no ejaculado.

Motilidade espermática progressiva e vigor espermático: em uma lâmina de microscopia óptica foi diluída uma gota (0,03 mL/gota) de sêmen com cinco gotas de citrato de sódio diidratado a 2,94% e, deste diluído retirou-se uma gota que foi colocada em outra lâmina, que foi levada ao microscópio de contraste de fase, em aumento de 400 X e avaliado, por método subjetivo, ambas as variáveis. A motilidade espermática progressiva foi avaliada considerando escore de 0 a 100% e o vigor espermático escore de 0 a 5 pontos, sendo que os escores maiores correspondem a espermatozóides com maior motilidade espermática progressiva e vigor espermático, respectivamente.

Morfologia: foram utilizados esfregaços corados pelo método WILLIAMS (1920), modificado por LAGERLÖF (1934), e depois de secos, foram levados ao microscópio de contraste de fase de 1000X. Foram consideradas as anormalidades primárias e secundárias, realizando a contagem de 100 espermatozóides entre as lâminas feitas de cada ejaculado. Foram consideradas anormalidades primárias, a cabeça periforme, a cabeça requetiforme, a cauda abaxial, a cauda degenerada, a cauda enrolada, a cauda enrolada na porção final, a

cauda quebrada nas porções inicial, intermediária, final e junto a cabeça, a microcefalia e a macrocefalia; como anormalidades secundárias, o acrossoma solto, a cabeça solta, a cauda dobrada, a cauda dobrada na porção final e a cauda solta (CHENOWETH, 2005), sendo as anormalidades gota distal e gota proximal, consideradas secundárias até 5% e 3%, respectivamente, do total de espermatozóides contados.

Após o período experimental, foram abatidos 16 animais, quatro de cada tratamento, para verificação dos pesos dos testículos e epidídimos. O sangue dos animais abatidos foi coletado em tubos heparinizados para posterior obtenção do plasma em centrífuga, a 1612,8 x g, por 20 minutos. Após a centrifugação, foi constituído um *pool* de plasma por tratamento, para análise dos níveis plasmáticos de selênio, realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica, SM 3500 Se, de acordo com o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-21<sup>th</sup> edition”, pelo Laboratório Greenlab, de Porto Alegre-RS.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. As variáveis respostas foram: o nível de selênio no plasma; o volume de sêmen; a cor; o pH; a concentração espermática; o número de espermatozóides no ejaculado; a motilidade espermática progressiva; o vigor espermático; o percentual de espermatozóides normais; o percentual de espermatozóides anormais; o percentual de anormalidades primárias e secundárias; o percentual de cada anormalidade espermática; o peso do testículo e o peso do epidídimo foram baseados no modelo estatístico descrito abaixo:

$$y = X \beta + \varepsilon,$$

em que,

$y$  é o vetor de observação das variáveis respostas;

$X$  corresponde a matriz de incidência do efeito fixo;

$\beta$  simboliza o vetor de efeitos fixos do tratamento;

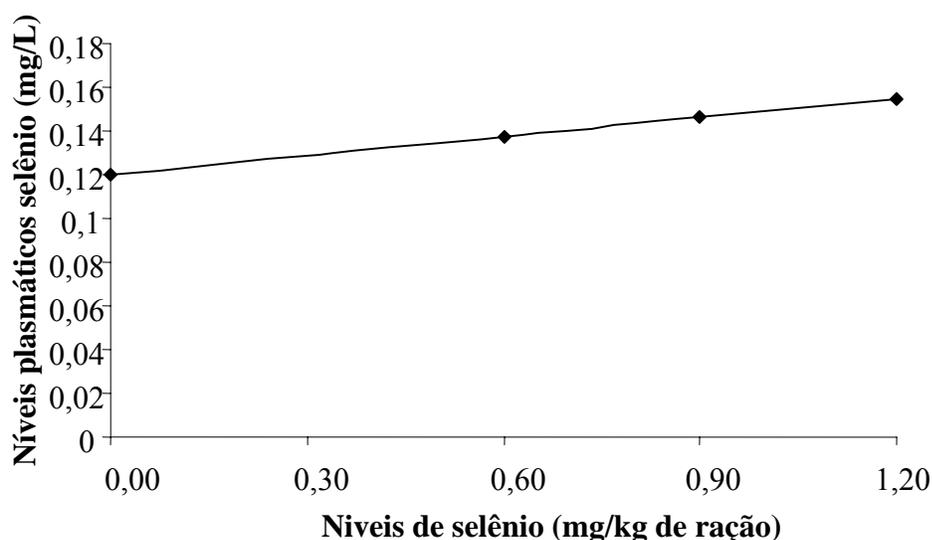
$\varepsilon$  é o vetor dos erros aleatórios.

As análises estatísticas do nível de selênio no plasma, volume de sêmen, cor, pH, concentração de espermatozóides, número de espermatozóides totais liberados no sêmen, motilidade progressiva, vigor espermático, percentual de espermatozóides normal, percentual de anormalidades primárias e secundárias, peso do testículo e epidídimos, foram realizadas pelo procedimento GLM do SAS (1992), enquanto para cada anormalidade

espermática adotou-se o procedimento dos Modelos Lineares Generalizados (DOBSON, 2002), através do procedimento GENMOD do SAS (1992), considerando que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função de ligação canônica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição dietética de selênio aumentou ( $P < 0,05$ ) os níveis plasmáticos de selênio em coelhos Nova Zelândia Branco (FIGURA 1). CASTELLINI et al. (2002) verificaram que a suplementação dietética de selênio, para coelhos Nova Zelândia Branco, aumentou a atividade da glutathiona peroxidase no eritrócito, no plasma seminal e no espermatozóide, fato que pode colaborar com a estabilidade oxidativa, melhorando as funções espermáticas.

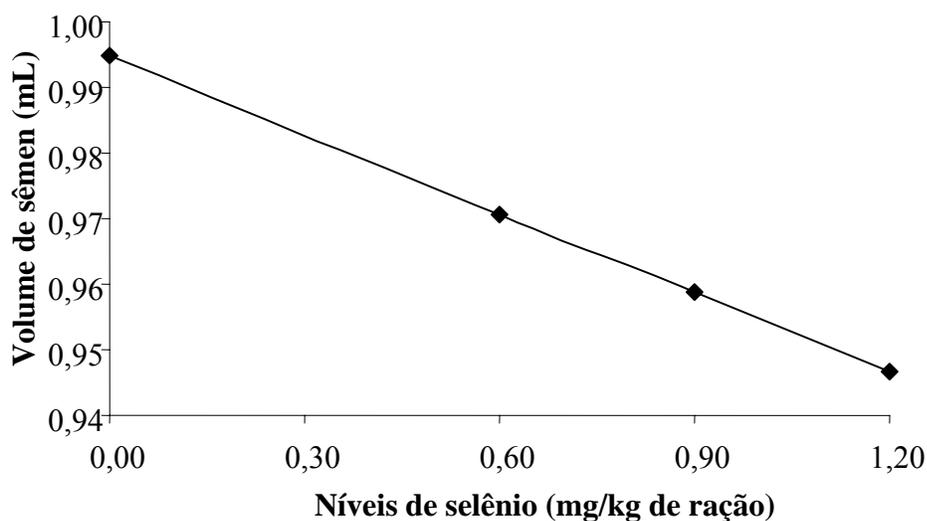


**FIGURA 1.** Níveis de selênio no plasma de coelhos Nova Zelândia Branco, após 90 dias de alimentação com níveis crescentes de selênio.  $y = 0,120 + 0,029 x$ ,  $P < 0,05$ .

A suplementação dietética de selênio não influenciou ( $P > 0,05$ ) o peso dos testículos e dos epidídimos, sendo o peso médio estimado de cada testículo de  $2,63 \pm 0,15$  g e o de cada epidídimo de  $1,30 \pm 0,09$  g. De acordo com WU et al. (1979) a deficiência de selênio reduziu o peso testicular de ratos. OLSON et al. (2004) relataram que a deficiência de selênio, além de reduzir o tamanho do testículo, pode gerar, em longo prazo, atrofia dos túbulos seminíferos. Contudo, esperava-se que a suplementação adicional de selênio pudesse aumentar o peso testicular e epididimário, com conseqüente desenvolvimento dos túbulos seminíferos. Possivelmente, a glutathiona peroxidase, como antioxidante celular

descrito por BIANCHINI & ANTUNES (1999) poderia melhorar o desenvolvimento dos referidos órgãos.

A ingestão de níveis crescentes de selênio reduziu ( $P < 0,0184$ ), linearmente, o volume de sêmen de coelhos (FIGURA 2). Segundo HAWKES & TUREK (2001), a suplementação de selênio muda o epitélio glandular das glândulas sexuais acessórias, o que, provavelmente, possa ter ocorrido neste estudo, ocasionando redução do volume de sêmen, ou talvez, tenha gerado algum grau de toxidez não observável clinicamente.



**FIGURA 2.** Volume de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias.  $y = 0,9947 - 0,0401x$ ,  $P < 0,0184$ .

O volume de gel, a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático, o número de espermatozoides no ejaculado, os espermatozoides normais, os espermatozoides anormais, as anormalidades secundárias, o pH e a cor do sêmen não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pela adição de selênio (TABELA 3).

Mesmo que a ingestão de níveis crescentes de selênio não tenha influenciado ( $P > 0,05$ ) o volume de gel (TABELA 3), no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, este estudo contribuiu com a estimação do valor médio de gel no sêmen desta espécie, visto a ausência de referências neste assunto. Ainda, baseado nas observações deste estudo, a presença de gel, no sêmen dos animais em questão, parece ser uma característica individual e relacionada a boa produção de sêmen.

**TABELA 3.** Média estimada e erro padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio (0; 0,6; 0,9; e 1,2 mg de selênio/ kg de ração), no período de 90 dias.

Parâmetros	Média estimada		Erro padrão	P >   t
Volume de gel (mL)	1,20	±	0,11	0,1391
Motilidade espermática progressiva (%)	51,35	±	2,51	0,2658
Vigor espermático (pontos)*	3,17	±	0,18	0,7158
Número de espermatozóides no ejaculado	2,29 x 10 <sup>8</sup>	±	1,81 x 10 <sup>7</sup>	0,4680
Espermatozóides normais (%)	66,34	±	1,28	0,2177
Espermatozóides anormais (%)	33,67	±	1,28	0,2177
Anormalidades secundárias (%)	21,85	±	0,98	0,8285
pH	7,98	±	0,02	0,3391
Cor**	2,01	±	0,04	0,2993

\*0 ponto indicam ausência de vigor; 5 pontos indicam vigor máximo.

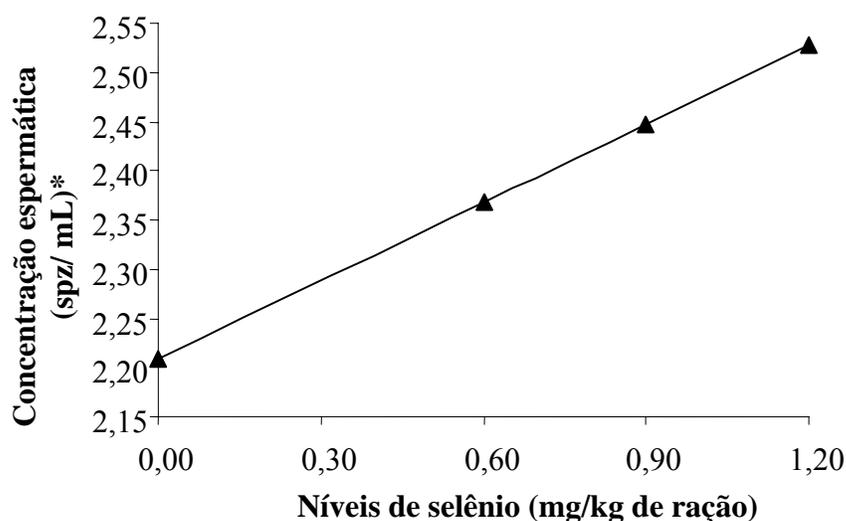
\*\* 1 ponto indica a cor branco cremoso; 2 pontos, branco leitoso; 3 pontos, branco aquoso; 4 pontos, amarelo; 5 pontos, avermelhado.

Contrariando uma das hipóteses deste estudo, a motilidade espermática progressiva (TABELA 3) não foi influenciada ( $P > 0,05$ ) pela adição de níveis de selênio. Considerava-se que a suplementação de selênio poderia aumentar a motilidade espermática progressiva, já que a função da glutathione peroxidase, descrita por LUBERDA (2005) e, conseqüentemente, do selênio, é combater os radicais livres que prejudicam a motilidade espermática. Ainda, este autor destacou que a concentração de glutathione peroxidase no espermatozóide e no plasma seminal de mamíferos apresenta diferenças específicas entre as espécies, sendo a quantidade de glutathione peroxidase insignificante nos espermatozóides de coelhos, e sua atividade indetectável, quando comparada a outras espécies. No entanto, CASTELLINI et al. (2002) verificaram que coelhos Nova Zelândia Branco suplementados com 0,5 mg de selênio/kg de ração apresentaram, em relação aos animais não suplementados com selênio, aumento da atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos, no plasma seminal e nos espermatozóides.

O vigor espermático (TABELA 3) não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os animais dos quatro tratamentos. De acordo MARIN-GUZMAN et al. (2000), existe uma selenoproteína na membrana mitocondrial externa, que sugere a importância do selênio no desenvolvimento celular. Assim, os mesmos autores relataram, diante da função da mitocôndria na produção

de energia, que a alteração da concentração de ATP pode alterar o metabolismo energético e a funções da célula espermática, como o vigor espermático.

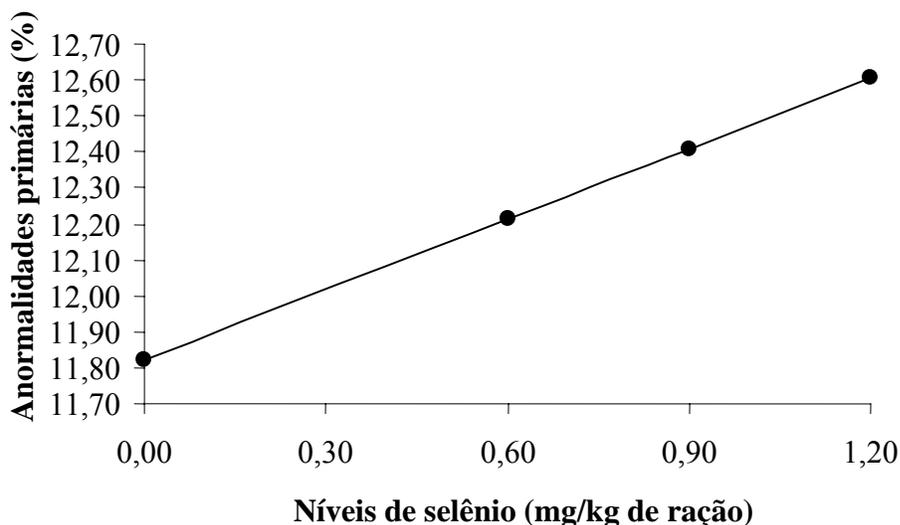
Apesar do aumento ( $P < 0,0001$ ) da concentração espermática (FIGURA 3) não se verificou influência ( $P > 0,05$ ) da ingestão de níveis de selênio no número de espermatozoides no ejaculado (TABELA 3), parâmetro que relaciona o volume de sêmen e a concentração espermática. Diferentemente dos resultados observados neste estudo, HAWKES & TUREK (2001) verificaram queda de mais de 50% na concentração espermática e no número de espermatozoides no ejaculado de humanos suplementados com selênio. Os autores atribuíram estes resultados a variação sazonal da produção de sêmen em humanos. O aumento da concentração espermática poderia estar relacionado ao provável desenvolvimento dos túbulos seminíferos descrito por OLSON et al. (2004), porém estes autores correlacionaram o desenvolvimento dos túbulos seminíferos ao peso testicular, que não foi diferente ( $P > 0,05$ ) nos animais deste estudo, alimentados com níveis de selênio.



**FIGURA 3.** Concentração espermática do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias.  $y = 220784725,7 + 26642842,8 x$ ,  $P < 0,0001$ . \*multiplicado por  $10^8$ ; spz=espermatozoides.

O percentual de espermatozoides normais, espermatozoides anormais e o percentual de anormalidades secundárias (TABELA 3) não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) nos níveis de ingestão de selênio. Entretanto, o percentual de anormalidades primárias (FIGURA 4) aumentou ( $P < 0,0231$ ) com a adição de selênio na ração. Segundo CHENOWETH (2005), as anormalidades espermáticas são classificadas de acordo com sua origem. Assim, o autor

destacou que as anormalidades que ocorrem na espermatogênese são consideradas primárias e as que se desenvolvem após a espermiacão são consideradas secundárias, sendo as anormalidades primárias mais prejudiciais a fertilidade que as secundárias, visto que as primárias são genéticas e resultantes de problemas no epitélio dos túbulos seminíferos, enquanto as secundárias estão relacionadas a fatores ambientais.



**FIGURA 4.** Incidência de espermatozoides com anormalidades primárias, no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias.  $y = 11,8213 + 0,6521x$ ,  $P < 0,0231$ .

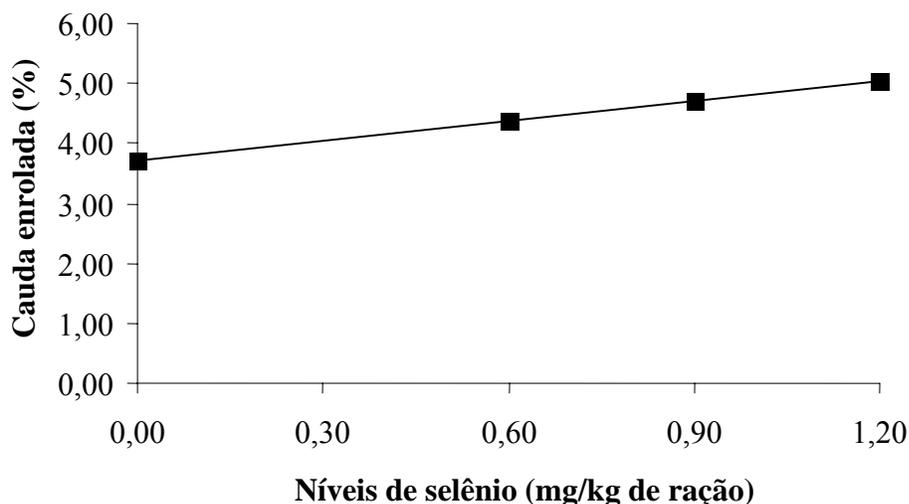
As anormalidades espermáticas verificadas ( $P > 0,05$ ) no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, nos quatro níveis de ingestão de selênio, são descritas na TABELA 4.

WU et al. (1979) relataram que estudos com selênio radioativo ( $Se^{75}$ ) indicaram maiores concentrações deste micronutriente na peça intermediária do espermatozóide de ratos e que a deficiência de selênio aumentou anormalidades na peça intermediária do espermatozóide. CHENOWETH (2005) descreveu como anormalidades da peça intermediária a cauda enrolada, as gotas citoplasmáticas irregulares e a cauda espiralada, sendo esta última devido a distribuição irregular de mitocôndrias. A anormalidade primária cauda espiralada, não foi observada neste estudo, porém esperava-se a redução da cauda enrolada e das gotas citoplasmáticas irregulares distais que não ocorreram.

**TABELA 4.** Média estimada, distribuição de probabilidade e intervalo de confiança das anormalidades espermáticas do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio (0; 0,6; 0,9; e 1,2 mg de selênio/ kg de ração), no período de 90 dias.

Parâmetros	Média estimada	Distribuição de probabilidade	Intervalo de confiança	P>ChiSq
<i>Anormalidades primárias</i>				
Cabeça periforme (%)	1,39	Poisson	1,06 - 1,82	0,2368
Cabeça requetiforme (%)	0,93	Normal	0,71 - 1,14	0,4382
Cauda abaxial (%)	0,89	Normal	0,84 - 0,94	0,1366
Cauda degenerada (%)	1,24	Normal	0,95 - 1,53	0,6193
Cauda enrolada na porção final (%)	1,24	Normal	0,89 - 1,58	0,3333
Cauda quebrada na porção inicial (%)	2,22	Poisson	1,88 - 2,62	0,8292
Cauda quebrada na porção intermediária (%)	4,28	Binomial negativa	3,62 - 5,06	0,5214
Cauda quebrada na porção final (%)	1,92	Binomial negativa	1,39 - 2,64	0,4951
Cauda quebrada junto a cabeça (%)	1,45	Poisson	1,14 - 1,84	0,6580
Microcefalia (%)	2,43	Binomial negativa	2,03 - 2,90	0,5595
Macrocefalia (%)	1,11	Normal	0,90 - 1,32	0,2123
<i>Anormalidades secundárias</i>				
Acrossoma solto (%)	0,76	Normal	0,31 - 1,21	0,2165
Cabeça solta (%)	8,24	Binomial negativa	7,44 - 9,13	0,9832
Cauda dobrada (%)	5,81	Binomial negativa	4,89 - 6,90	0,6192
Cauda dobrada na porção final (%)	1,82	Binomial negativa	1,45 - 2,27	0,2404
Cauda solta (%)	7,24	Poisson	6,76 - 7,74	0,8943
Gota distal (%)	2,19	Binomial negativa	1,62 - 2,96	0,1380
Gota proximal (%)	2,10	Poisson	1,53 - 2,89	0,5056

A anormalidade primária cauda enrolada (FIGURA 5) aumentou ( $P < 0,0032$ ) com adição de selênio na ração de coelhos, contraditoriamente a hipótese do presente estudo. Segundo GUERRA et al. (2004), espermatozoides anormais de humanos apresentam concentrações aumentadas de espécies de oxigênio reativos que podem danificar as mitocôndrias, liberando a proteína citocromo “c” para o plasma seminal que, possivelmente, danifica o DNA e acelera o processo de apoptose espermática.



**FIGURA 5.** Incidência de espermatozoides com cauda enrolada, no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio, no período de 90 dias.  $y = e^{1,3087 + 0,1019 x}$ ,  $P < 0,0032$ .

Ainda, os autores relataram que as anormalidades espermáticas mais relacionadas com a produção de espécies de oxigênios reativos são o excesso de citoplasma na peça intermediária, espermatozoides com cabeças anormais, defeitos de acrossoma, de peça intermediária, de cauda e de DNA. De acordo com a hipótese formulada, acreditava-se na redução das anormalidades primárias e secundárias devido a ação antioxidante do selênio, fato que está em desacordo com WU et al. (1979), CASTELLINI et al. (2003) e, em parte, com ALVAREZ et al. (2006), que observaram a ação antioxidante do selênio.

A coloração observada no sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco foi, predominantemente, branco leitoso (TABELA 3). De modo geral e baseado nas observações deste estudo, associa-se a coloração branco cremoso a um sêmen que apresente maior concentração espermática em relação as colorações branco leitoso e branco aquoso. Ainda, as colorações amarela e avermelhada, são consideradas anormais e relacionadas a alteração do pH seminal. O pH do sêmen observado nos animais em questão foi 8 (TABELA 3).

CASTELLINI et al. (2002) relataram que a suplementação de selênio, para coelhos, visando melhoria das características espermáticas não é tão efetiva em relação as demais espécies, visto a baixa atividade da glutathione peroxidase no espermatozoide de coelhos. Os

autores destacaram que, em coelhos, os tecidos que contêm alta atividade da glutathione peroxidase não dependem do selênio como cofator, sendo outras substâncias responsáveis pela proteção contra peroxidação lipídica, como a catalase, enzima de alta atividade no sêmen de coelhos. Portanto, apesar do aumento ( $P < 0,0001$ ) da concentração espermática (FIGURA 3), verificado neste estudo, destaca-se que o suprimento da exigência de selênio para coelhos (NRC, 1977) é suficiente, já que não se observou influência ( $P > 0,05$ ) do selênio adicional no número de espermatozóides no ejaculado e a suplementação resultou no aumento ( $P < 0,0231$ ) do percentual das anormalidades primárias e no aumento ( $P < 0,0032$ ) do percentual da cauda enrolada.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o suprimento das exigências nutricionais indicadas na literatura é suficiente para coelhos reprodutores produzirem espermatozóides normais e serem utilizados em cobertura ou inseminação artificial com sêmen recém coletado.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **British Journal of Urology**, v. 95, p. 503-507, 2005.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; CARDOZO, R. M.; MATAVELI, M.; KIOSHIMA, R. S. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 28, n. 2, p. 165-175, 2006.
- BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 455-465, 2005.
- BIANCHINI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; BEGHELLI, D. Effect of supranutricional level of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 1723-1732, 2002.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.; MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n – 3 fatty acids. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 43, p. 91-103, 2003.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, p. 457-468, 2005.

DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**. Boca Raton: CRC Press. 2002. 225 p.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

HAWKES, W. C.; TUREK, P. J. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 764- 772, 2001.

LARGELÖF, N. Morphologische unterprecheegen uber veranderugon in spermabild und in deuhoclen bei bullen mit vermindeter oder aufgehobenor fertilitat. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 1934, 254 p.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5- 17, 2005.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; WHITMOYER, R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1544-1550, 2000.

McDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. London: Academic Press. 1992. 524 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requeriments of rabbits**. 2. rev. ed. Washington: National Academic Press. 1977. 30 p.

OLSON, G. E.; WINFREY, V. P.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. **Reproduction Research**, v. 127, p. 335-342, 2004.

SAEG. **Sistema para Análise Estatística e Genética**: Versão 7,0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes. 1997. 198 p.

SAS INSTITUTE. **SAS technical report**: Release 6.07. Cary: SAS Institute Inc. 1992. 229 p.

SCAPINELLO, C.; MORAES, G. V.; SOUZA, M. L. R.; ANDREAZZI, M. A.; ANTUNES, E. B. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 923-931, 1997.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165 p.

WILLIAMS, W.W. Technique of collection semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. **Cornell Veterinarian**, v. 10, p. 87-94, 1920.

WU, S. H.; OLDFIELD, J. E.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. **Biology of reproduction**, v. 8, p. 625-629, 1979.

#### IV. INFLUÊNCIA DE SELÊNIO SUPLEMENTAR DIETÉTICO NOS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE COELHOS

**RESUMO:** Diante da função antioxidante do selênio, fundamental nos processos de conservação do sêmen, avaliou-se a influência de teores suplementares dietéticos de selênio (0; 0,6; 0,9 e 1,2 mg de selênio/ kg de ração) no sêmen resfriado e congelado de coelhos. Verificou-se que a inclusão de 1,20 mg de selênio/kg de ração melhorou a motilidade espermática progressiva do sêmen resfriado de coelhos e reduziu o percentual de espermatozoides anormais e anormalidades primárias no sêmen congelado de coelhos, analisado após descongelação a 37°C, em banho-maria, em comparações com os demais tratamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes, congelamento, radicais livres, reprodução, resfriamento.

#### INFLUENCE OF SUPPLEMENTAL DIETARY SELENIUM IN THE METHODS OF RABBITS SEMEN CONSERVATION

**SUMMARY:** Due to the selenium function as antioxidant, fundamental in the semen conservation processes, it was evaluated the influence of supplemental dietary selenium levels (0; 0.6; 0.9 and 1.2 mg of selenium/kg of ration) in cooled and frozen semen of rabbits. It was verified that inclusion of 1.20 mg of selenium/kg of ration improved the progressive spermatic motility of rabbits cooled semen and also reduce the percentage of abnormal spermatozoa and primary abnormalities in the rabbits frozen semen, analyzed after thawed, in water bath at 37°C, in comparison to the other treatments.

**KEY WORDS:** Antioxidants, cooled semen, free radicals, frozen semen, reproduction.

#### INTRODUÇÃO

O selênio, como componente da enzima antioxidante glutathiona peroxidase, atua na proteção das membranas lipídicas contra danos peroxidativos (McDOWELL, 1992). A peroxidação lipídica resulta em perda de ácidos graxos insaturados, com conseqüente redução na fluidez, responsável pela fusão espermatozóide-oócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$  e na motilidade espermática (GUERRA et al., 2004), fator que pode contribuir para a viabilidade espermática.

A viabilidade do sêmen mensurada antes, durante e depois do processo de armazenamento, tem sido base para desenvolvimento de métodos de pesquisa de preservação de sêmen (SAACKE, 1983).

O processo de criopreservação induz ao estresse térmico e ao estresse osmótico, resultando em perda da integridade da membrana plasmática, com conseqüente redução da motilidade espermática e perda da viabilidade dos espermatozoides (GIRAUD et al., 2000) sendo a utilização de crioprotetores, como o glicerol, essenciais na prevenção de danos celulares (BAMBA & ADAMS, 1990). Ainda, estes autores verificaram que a capacidade de fertilização do sêmen congelado de coelhos foi prejudicada com a redução da motilidade espermática e a redução de acrossomas intactos.

GUERRA et al. (2004) relataram que um dos aspectos importantes no procedimento de criopreservação é a remoção do plasma seminal, fonte de antioxidantes, que aumenta a susceptibilidade do espermatozóide ao ataque de radicais livres, observando-se redução irreversível na motilidade espermática, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozoides. Ainda, os autores afirmaram que o processo de descongelamento também causa peroxidação lipídica e danos na membrana, decorrentes do rápido aumento na utilização de oxigênio pelos espermatozoides, determinando maior produção de radicais livres. No entanto, BUSTAMANTE FILHO et al. (2006) mencionaram que a qualidade do sêmen armazenado depende dos procedimentos de diluição, centrifugação e adição de meio diluidor. Os autores relataram, também, que a criopreservação reduz a atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase, mas não afeta as enzimas contidas no meio diluidor, fato que pode aperfeiçoar os protocolos de criopreservação de eqüinos com adição de enzimas antioxidantes.

Diante da função antioxidante do selênio, fundamental nos processos de conservação do sêmen, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar, em coelhos, a influência de selênio suplementar dietético nos métodos de conservação do sêmen.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Local do experimento*

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, a qual se encontra a 23°25' de latitude sul, a 51°57' de longitude oeste de Greenwich e 550 m de altitude, e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, de outubro de 2007 a janeiro de 2008, sendo, neste período, a temperatura média de  $25,65 \pm 0,70^{\circ}\text{C}$ , a umidade relativa média de  $66,5 \pm 6,35\%$  e a precipitação pluviométrica total de 629,30 mm.

### *Animais e instalações*

Foram utilizados 20 machos da raça Nova Zelândia Branco, com nove meses de idade e peso médio de  $3,86 \pm 0,26$  kg. O tratamento 1 foi compreendido por 4 animais; o 2 por 6 animais; o 3 por 4 animais e o 4 por 6 animais, selecionados previamente com motilidade progressiva mínima de 60% , vigor de 4 pontos e coloração branco leitoso.

Os animais foram alojados, individualmente, em gaiolas de arame galvanizado medindo 40 cm X 60 cm X 45 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), providas de bebedouro automático e comedouro semi-automático.

### *Alimentação*

A ração (TABELA 1) foi formulada de acordo com NRC (1977), com 90,47% de matéria seca, 17,80% de proteína bruta, 13,12% de fibra bruta, 1,57% de extrato etéreo e 3792,20 Kcal de energia digestível/kg de ração. Estas análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com os procedimentos descritos por SILVA (1990).

**TABELA 1.** Composição percentual dos ingredientes da ração de coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

Ingredientes	Quantidade (%)
Milho moído	25,27
Farelo de soja	14,00
Farelo de trigo	24,00
Feno de alfafa	23,30
Feno de coast cross	10,00
Sal comum	0,40
Fosfato Bicálcico	0,80
Calcário Calcítico	1,00
DL-Metionina	0,60
Bacitracina	0,05
Cicostrat Robenidina	0,08
Premix*	0,50
TOTAL	100,00

\* Premix, composição por kg do produto: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200 mg ; Vit B12, 2.000mcg; Ac. Pantotênico, 2.000 mg; Colina, 70.000 mg; Ferro, 8.000 mg; Cobre, 1.200 mg; Cobalto, 200 mg; Manganês, 8.600 mg; Zinco, 12.000 mg; Iodo, 64 mg; Selênio, 16 mg; Metionina, 120.000 mg; Antioxidante, 20.000 mg.

O selênio foi misturado, previamente, em 1 kg de milho moído e, posteriormente, em quantidades maiores deste ingrediente, no misturador “Y”, por 15 minutos. O milho moído com os respectivos níveis de selênio e os demais ingredientes da ração foram misturados, durante 15 minutos, em um misturador vertical e processados, posteriormente, por meio da peletização, sendo que o tamanho dos péletes foi de 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento.

A água e a ração foram fornecidas à vontade aos animais, porém, semanalmente, foram pesadas as sobras de ração, para determinar a ingestão média diária, por animal, que foi de  $119,12 \pm 6,29$  gramas.

### *Tratamentos*

Foram testadas quatro concentrações de selênio: 1) controle; 2) suplementação com 0,6 mg de selênio/ kg de ração; 3) suplementação com 0,9 mg de selênio/ kg de ração; 4) suplementação com 1,2 mg de selênio/ kg de ração. Utilizou-se como fonte de selênio, o

selenito de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), com 45,6% de selênio. O total de selênio na ração foi: 0,78 mg de selênio/kg de ração, no controle; 1,20 mg de selênio/kg de ração, com suplementação de 0,6 mg de selênio/kg de ração; 0,54 mg de selênio/kg de ração, com suplementação com 0,9 mg de selênio/kg de ração; 1,41 mg de selênio/kg de ração, suplementação com 1,2 mg de selênio/kg de ração. A determinação de selênio nas rações foi realizada pelo Laboratório Greenlab, de Porto Alegre-RS, por meio de equipamento de absorção atômica SM 3500 Se, de acordo com o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-21<sup>th</sup> edition”.

### *Coleta e avaliação do sêmen*

O sêmen dos animais, destinados aos processos de conservação de sêmen, foi coletado após de 90 dias de alimentação com níveis suplementares de selênio, por meio de vagina artificial, com temperatura de 44°C, desenvolvida pelo Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, constituída de tubo plástico com oito cm de comprimento por quatro cm de diâmetro, revestida, internamente, com membrana de preservativo não lubrificado e copo coletor graduado (SCAPINELLO et al., 1997), utilizando uma coelha em cio para coletar o sêmen. Logo após cada coleta foi verificado o volume com e sem gel, por meio da graduação do copo coletor, a cor que foi classificada em escores de 1 a 5 pontos, sendo que um (1) representou a coloração branco cremoso, dois (2), branco leitoso, três (3), branco aquoso, quatro (4), amarelo e, cinco (5), avermelhado. O pH foi verificado por meio de papel de tornassol, colocando uma gota de sêmen sobre a fita, efetuando a leitura em escala própria de 0 a 14.

Os outros parâmetros avaliados no sêmen foram: concentração de espermatozoides ( $\text{mm}^3$ ), motilidade espermática progressiva (%), vigor espermático (pontos) e morfologia (%), sendo a morfologia verificada em coleta prévia realizada dois dias antes. Estes procedimentos são descritos como:

Concentração de espermatozoides: o *pool* de sêmen foi diluído em formol salina tamponada (pH=7) na proporção de 1:100, utilizando pipeta de Shali (0,02 mL). Preencheuse, por capilaridade, a câmara de Neubauer e os espermatozoides foram contados em cinco quadrados maiores da referida câmara e depois, somados e divididos por 80 quadrados

pequenos, multiplicando por 400 quadrados pequenos da câmara, pela diluição e pela altura da câmara, obtendo-se a quantidade de espermatozóides por  $\text{mm}^3$  de sêmen.

Motilidade espermática progressiva e vigor espermático: em uma lâmina de microscopia óptica foi diluída uma gota (0,03 mL/gota) de sêmen com cinco gotas de citrato de sódio diidratado a 2,94% e, deste diluído retirou-se uma gota que foi colocada em outra lâmina, que foi levada ao microscópio de contraste de fase, em aumento de 400 X e avaliado, por método subjetivo, ambas as variáveis. A motilidade espermática progressiva foi avaliada considerando escore de 0 a 100% e o vigor espermático escore de 0 a 5 pontos, sendo que os escores maiores correspondem a espermatozóides com maior motilidade espermática progressiva e vigor espermático, respectivamente.

Morfologia: foram utilizados esfregaços corados pelo método WILLIAMS (1920), modificado por LAGERLÖF (1934), e depois de secos, foram levados ao microscópio de contraste de fase de 1000X. Foram consideradas as anormalidades primárias e secundárias, realizando a contagem de 100 espermatozóides entre as lâminas feitas de cada ejaculado.

#### *Resfriamento e congelação*

Após a verificação dos parâmetros espermáticos e da constituição do *pool* de sêmen, calculou-se o volume do diluidor, sendo o mesmo dado pela multiplicação da concentração espermática do *pool* de sêmen (espermatozóides/mL) pela motilidade espermática progressiva (percentual transformado em decimal) pelo índice de normalidade (percentual transformado em decimal) e pelo volume de sêmen (mL) em razão da concentração espermática por palhete (mL).

A composição do meio diluidor, com 300 mOsm/g e pH=7,1 (CASTELLINI et al., 2002), para conservação de sêmen de coelhos a 5°C, é descrita abaixo (TABELA 2).

Posteriormente, o *pool* de sêmen diluído que foi resfriado permaneceu a temperatura ambiente por 10 minutos, com a finalidade de reduzir gradativamente a de temperatura de 37°C para 20°C, e desta, para 5°C no refrigerador (CASTELLINI et al., 2002), sendo verificados a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático, a cada 12 horas, e a morfologia espermática no final do período.

**TABELA 2.** Composição do meio diluidor para conservar sêmen de coelhos a 5°C ou, para a pré-diluição, no uso de congelação.

Componentes	Quantidade
Tris (C <sub>4</sub> HNO <sub>3</sub> )	2,42 g
Ácido Cítrico	1,34 g
D-glicose	1,00 g
Penicilina	0,50 g
Diidroestreptomicina	0,10 g
Água Destilada	80 mL
Gema de ovo	20 mL

O *pool* de sêmen destinado a congelação foi acrescido, na pré-diluição a 37°C, com a metade do diluidor descrito na TABELA 2, sendo avaliados a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático, que foram, respectivamente, 65% e 4 pontos, nos quatro tratamentos. Então, o *pool* de sêmen diluído permaneceu a temperatura ambiente por 10 minutos e foi levado, posteriormente, a geladeira a 20°C para reduzir, gradativamente, a temperatura de 37°C para 20°C e, desta, para 5°C, em caixa de isopor com água e gelo. Posteriormente, a outra metade do diluidor, composta pelo crioprotetor glicerol resfriado a 5°C (TABELA 3), foi dividida em três partes, sendo adicionadas com intervalo de 10 minutos, resultando na diluição final.

**TABELA 3.** Composição do meio diluidor, com crioprotetor, para congelação do sêmen de coelhos.

Componentes	Quantidade
Tris (C <sub>4</sub> HNO <sub>3</sub> )	2,00 g
Ácido Cítrico	1,11 g
D-glicose	0,83 g
Penicilina	0,41 g
Diidroestreptomicina	0,08 g
Água Destilada	66 mL
Glicerol	14 mL
Gema de ovo	20 mL

Após a diluição final verificou-se a motilidade espermática progressiva (MP) e o vigor espermático (VG), sendo, respectivamente: 40% de MP e 4 pontos de VG, no grupo controle e nos animais suplementados com 0,6 mg de selênio/ kg de ração; e 60% de MP e 4 pontos de VG nos animais suplementados com 0,9 e 1,2 mg de selênio/ kg de ração. Para

conservar o sêmen diluído, utilizou-se palhetes de 0,25 mL, com 50 milhões de espermatozóides por dose, sendo os mesmo lacrados com álcool polivinílico.

O congelamento foi realizado em uma câmara de congelação, preparada com uma caixa de isopor, dotada de suporte de sustentação para conter os palhetes em posição horizontal. Na câmara de congelação, foi colocado nitrogênio líquido até atingir 10 cm de altura (profundidade) e o suporte contendo os palhetes foi suspenso a 3 cm da superfície do nitrogênio, a  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta posição por 20 minutos, sendo depois imersos em nitrogênio líquido por alguns segundos a  $-196^{\circ}$ . Decorrido o tempo de imersão, os palhetes foram descongelados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, para avaliar a motilidade progressiva e o vigor espermático.

Ao final do período experimental, os animais foram abatidos e o sangue foi coletado em tubos heparinizados para posterior obtenção do plasma, em centrífuga a  $1612,8 \times g$ , por 20 minutos. Após a centrifugação, foi constituído um *pool* de plasma por tratamento, para análise dos níveis plasmáticos de selênio, realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica, SM 3500 Se, de acordo com o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-21<sup>th</sup> edition”, pelo Laboratório Greenlab, de Porto Alegre-RS.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. As variáveis respostas foram: o nível de selênio no plasma; a motilidade espermática progressiva; o vigor espermático; o percentual de espermatozóides normais; o percentual espermatozóides anormais; o percentual de anormalidades primárias e secundárias do pool de sêmen resfriado e congelado de coelhos, baseados no modelo estatístico descrito abaixo:

$$y = X \beta + \varepsilon,$$

em que,

$y$  é o vetor de observação das variáveis respostas;

$X$  corresponde a matriz de incidência do efeito fixo;

$\beta$  simboliza o vetor de efeitos fixos do tratamento;

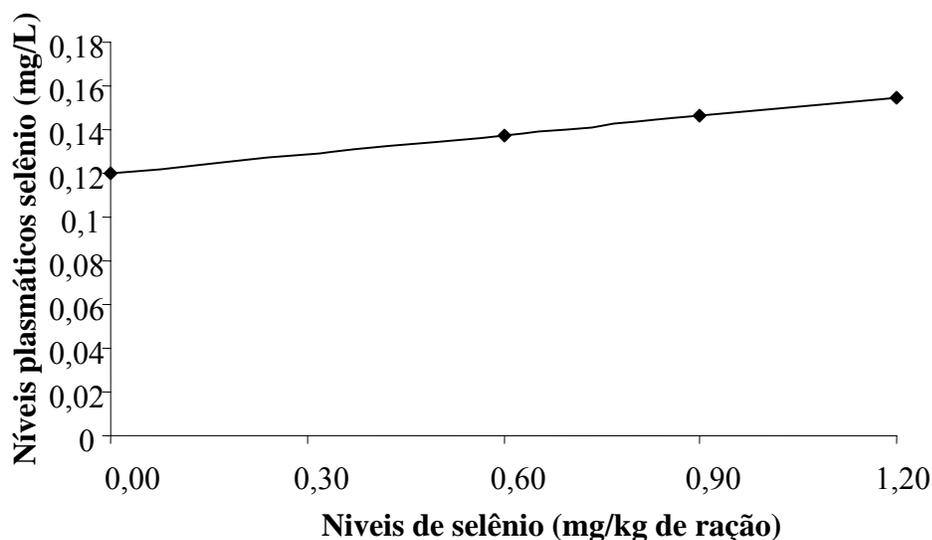
$\varepsilon$  é o vetor dos erros aleatórios.

As análises estatísticas foram realizadas pelo procedimento dos Modelos Lineares Generalizados (DOBSON, 2002), através do procedimento GENMOD do SAS (1992), considerando que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função

de ligação canônica, exceto a variável nível de selênio no plasma, que foi analisada pelo procedimento GLM do SAS (1992).

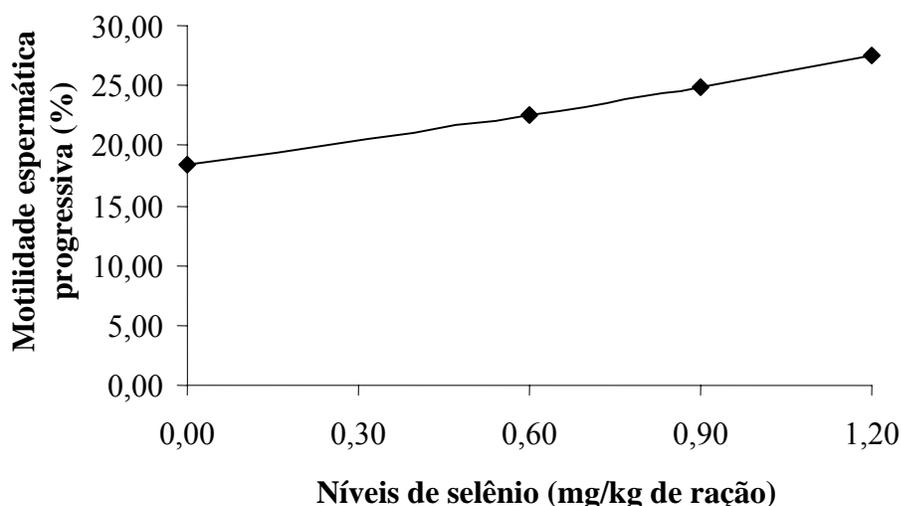
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição dietética de selênio aumentou ( $P < 0,05$ ) os níveis plasmáticos de selênio em coelhos Nova Zelândia Branco (FIGURA 1). CASTELLINI et al. (2002) verificaram que a suplementação dietética de selênio, para coelhos Nova Zelândia Branco, aumentou a atividade da glutathiona peroxidase no eritrócito, no plasma seminal e no espermatozóide do sêmen fresco e resfriado a  $5^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Ainda, os autores destacaram redução de 15% da atividade da glutathiona peroxidase no sêmen resfriado em relação ao sêmen fresco, indicando relação entre o processo de conservação de sêmen e o aumento da peroxidação lipídica.



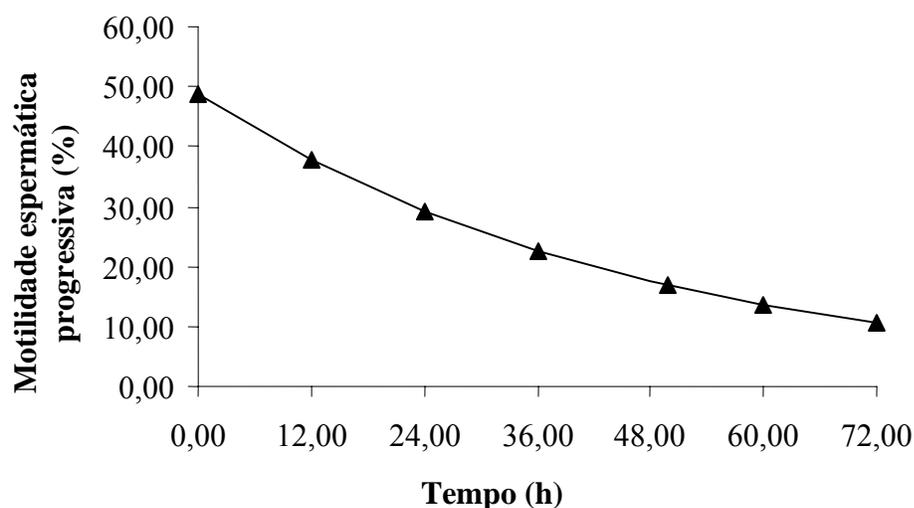
**FIGURA 1.** Níveis de selênio no plasma de coelhos Nova Zelândia Branco, após 90 dias de alimentação com níveis crescentes de selênio.  $y = 0,120 + 0,029 x$ ,  $P < 0,05$ .

A ingestão de níveis de selênio, após 90 dias de suplementação, resultou em aumento ( $P < 0,0001$ ) na motilidade espermática progressiva (FIGURA 2), do sêmen resfriado de coelhos. Entretanto, o selênio não influenciou ( $P > 0,05$ ) o vigor espermático, que foi  $3,07 \pm 1,34$  pontos.



**FIGURA 2.** Motilidade espermática progressiva do sêmen resfriado a 5°C de coelhos Nova Zelândia Branco, no período de 3 dias de conservação, aos 90 dias de ingestão de níveis crescentes de selênio.  $y = e^{2,9136 + 0,3357 x}$ ,  $P < 0,0001$ .

O aumento da motilidade espermática progressiva evidenciado na FIGURA 2, está de acordo com as verificações de BECKETT & ARTHUR (2005) e WU et al. (1979), ao destacarem que a deficiência de selênio resulta em prejuízos na motilidade espermática. Ratifica, também, as observações de FOOTE et al. (2002), ao verificarem o benefício dos antioxidantes na qualidade do sêmen armazenado a 5°C ou a temperatura ambiente. Foi observado que a motilidade espermática progressiva diminuiu ( $P < 0,0001$ ) em função do tempo de conservação a 5°C (FIGURA 3), havendo a cada 12 horas redução de 23%, fato também verificado por CASTELLINI et al. (2002), tendo conservado sêmen por 24 horas. Apesar destes autores observarem aumento do selênio e da atividade da glutathione peroxidase nos eritrócitos, no plasma seminal e nos espermatozoides com adição suplementar dietética de selênio, não verificaram influência na motilidade espermática progressiva no sêmen resfriado de coelhos Nova Zelândia Branco. Entretanto, comparando-se os resultados deste estudo com os relatos de NAIR et al. (2006) que evidenciaram a redução de 22% da motilidade espermática do sêmen de touro diluído em leite desnatado, após 24 horas de resfriamento, destaca-se a menor resistência dos espermatozoides de coelhos ao processo de resfriamento, em relação aos bovinos.



**FIGURA 3.** Motilidade espermática progressiva média, dos quatro níveis de selênio, do sêmen de coelhos em função do tempo.  $y = e^{3,8891 - 0,0214 x}$ ,  $P < 0,0001$ .

O percentual de espermatozóides normais, espermatozóides anormais, anormalidades primárias e secundárias no sêmen resfriado de coelhos não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pela ingestão selênio (TABELA 4). Entretanto, destaca-se a adição crescente de selênio reduziu 85% o percentual das anormalidades primárias ( $y = e^{2,5260 - 0,2468 x}$ ) no sêmen resfriado de coelhos, o que ressalta a importância do selênio, como antioxidante, na manutenção da estrutura do DNA (FOOTE et al., 2002).

**TABELA 4.** Morfologia espermática do sêmen resfriado, a 5°C, de coelhos suplementados com 0; 0,6; 0,9 e 1,2 mg de selênio/ kg de ração.

Parâmetros	Média estimada	Erro Padrão	P>ChiSq
Espermatozóides normais (%)	80,63	± 1,14	0,8553
Espermatozóides anormais (%)	20,38	± 1,31	0,9115
Anormalidades primárias (%)	12,50	± 1,53	0,1493
Anormalidades secundárias (%)	9,51	± 1,43	0,3552

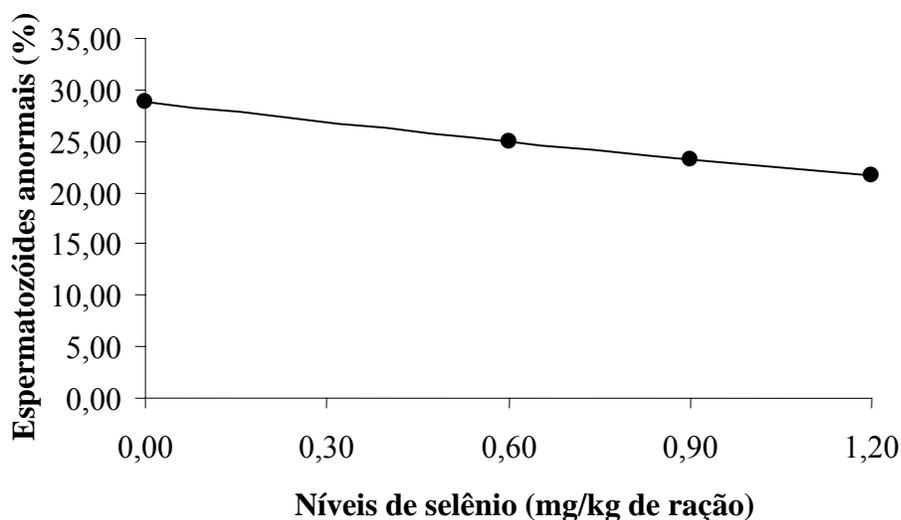
O resultado do congelamento do sêmen de coelhos alimentados com selênio não foi o esperado e as possíveis propriedades do selênio não foram evidenciadas ( $P > 0,05$ ) na motilidade espermática progressiva, com média estimada e erro padrão de  $7,83 \pm 1,85\%$ , e

no vigor espermático, com  $2,83 \pm 1,52$  pontos. Estes resultados podem ser atribuídos a temperatura de congelamento utilizada neste experimento que foi  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ , visto que MOCÉ et al. (2005) obteve bons resultados congelando sêmen de coelho em freezer, a  $-30^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, antes da imersão em nitrogênio líquido. VALENÇA & GUERRA (2007) relacionaram os efeitos envolvidos no processo de criopreservação, como a agressão da membrana plasmática e as organelas celulares, ocasionados pelo estresse oxidativo, choque térmico e formação de cristais de gelo intracelulares. Ainda, os autores destacaram que, na maioria dos mamíferos, a variação da composição dos lipídeos, da membrana plasmática do espermatozóide, é importante para a viabilidade do sêmen criopreservado, visto que, mais de 60% dos lipídeos presentes na membrana plasmática são ácidos graxos polinsaturados, que conferem fluidez a mesma, devido a quantidade de insaturações. Sendo assim, é possível que a composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides de coelhos possa ser outro fator que, aliado a temperatura de congelamento utilizada neste estudo, tenha comprometido os resultados.

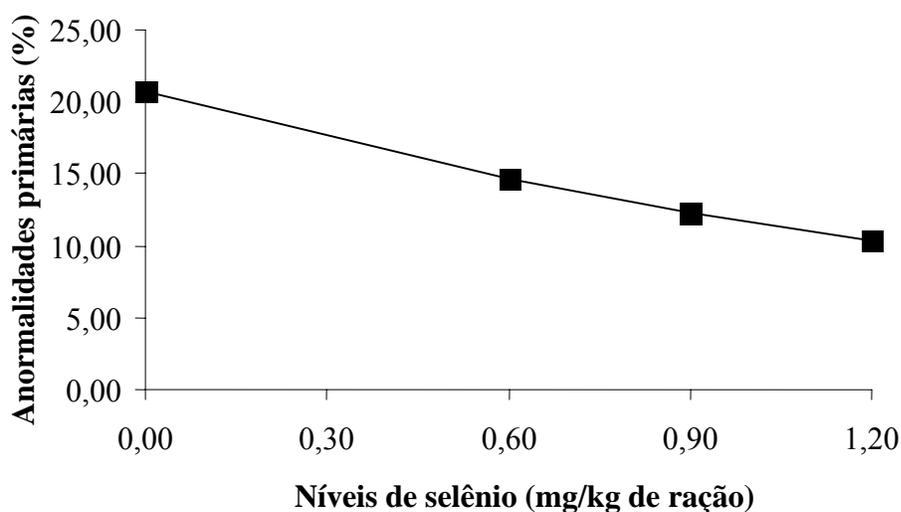
Com relação a morfologia espermática do sêmen congelado de coelhos alimentados com níveis suplementares de selênio, não se observou ( $P>0,05$ ) diferença no percentual de espermatozoides normais e no percentual de anormalidades secundárias, com média estimada e erro padrão de  $74,37 \pm 1,15\%$  e  $12,32 \pm 1,44\%$ , respectivamente. No entanto, o percentual de espermatozoides anormais (FIGURA 4) e o percentual de anormalidades primárias (FIGURA 5) foram reduzidos linearmente com a adição de selênio na dieta de coelhos.

De acordo com CASTELLINI et al. (2002), o selênio está relacionado com a morfologia espermática, com a proteção antioxidante e com a habilidade de fertilização. Assim, possivelmente, o selênio, como componente da enzima glutathiona peroxidase (McDOWELL, 1992), tenha combatido o estresse oxidativo resultante do processo de criopreservação, descrito por GIRAUD et al. (2000) e GUERRA et al. (2004) e conferindo estabilização a membrana plasmática e a estrutura do DNA, reduzindo o percentual de espermatozoides anormais e o percentual de anormalidades primárias. Ainda, segundo CASTELLINI et al. (2002) a glutathiona peroxidase sofre mudança estrutural, no final do processo de maturação espermática, para compor a cápsula mitocondrial, fato que pode

contribuir com redução de anormalidades primárias específicas, como a cauda espiralada (CHENOWETH, 2005).



**FIGURA 4.** Percentual de espermatozoides anormais no sêmen congelado de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio.  $y = e^{3,3575 - 0,2358 x}$ ,  $P < 0,0343$ .



**FIGURA 5.** Percentual de anormalidades primárias no sêmen congelado de coelhos Nova Zelândia Branco, alimentados com níveis crescentes de selênio.  $y = e^{3,0321 - 0,5800 x}$ ,  $P < 0,0031$ .

Os resultados deste estudo destacaram a importância do selênio nos processos de conservação de sêmen, com melhores resultados com a suplementação adicional de 1,20

mg de selênio/ kg de ração. Entretanto, destaca-se que novos estudos com maiores níveis de inclusão de selênio podem colaborar com os resultados deste estudo na determinação do teor selênio que maximizaria a resposta dos parâmetros espermáticos.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a inclusão de 1,20 mg de selênio/kg de ração melhorou a motilidade espermática progressiva do sêmen resfriado de coelhos e reduziu o percentual de espermatozoides anormais e anormalidades primárias no sêmen de coelhos submetido a congelamento e descongelamento.

## REFERÊNCIAS

BAMBA, K.; ADAMS, C. E. Freezing rabbit semen by use of BF5 diluent. **Laboratory Animals**, v. 24, p. 172-175, 1990.

BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 455-465, 2005.

BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73, 2006.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; BEGHELLI, D. Effect of supranutricional level of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 1723-1732, 2002.

DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**. Boca Raton: CRC Press. 2002. 225 p.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.

GIRAUD, M. N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2160-2164, 2000.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

LARGELÖF, N. Morphologische unterprecheegen uber veranderugon in spermabild und in deuhoclen bei bullen mit vermindeter oder aufgehobenor fertilitat. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 1934, 254 p.

McDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. London: Academic Press. 1992. 524 p.

MOCÉ, E.; LAVARA, R.; VICENTE, J. S. Influence of the donor male on the fertility of frozen-thawed rabbit sperm after artificial insemination of females of different genotypes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 516-521, 2005.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 21-29, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requeriments of Rabbits**. 2. rev. ed. Washington: National Academic Press. 1977. 30 p.

SAACKE, R. G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal Dairy Science**, v. 66, p. 2635-2644, 1983.

SAS INSTITUTE. **SAS technical report**: Release 6.07. Cary: SAS Institute Inc. 1992. 229 p.

SCAPINELLO, C.; MORAES, G. V.; SOUZA, M. L. R.; ANDREAZZI, M. A.; ANTUNES, E. B. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 923-931, 1997.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165 p.

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

WILLIAMS, W.W. Technique of collection semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. **Cornell Veterinarian**, v. 10, p. 87-94, 1920.

WU, S. H.; OLDFIELD, J. E.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. **Biology of reproduction**, v. 8, p. 625-629, 1979.