

1 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
2 CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
3 CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL– CMCA
4

5
6
7
8 VANESSA EDILENE DUARTE MARTINS
9

10
11
12
13
14
15 **VIABILIDADE DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO A 15 °C ADICIONADO DE**
16 **ANTIOXIDANTES**
17

18
19
20
21
22
23
24
25 São Luís – MA

26 2015

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

VANESSA EDILENE DUARTE MARTINS

**VIABILIDADE DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO A 15 °C ADICIONADO DE
ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

São Luís – MA

2015

FOLHA DE AVALIAÇÃO

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Nome: Vanessa Edilene Duarte Martins

Título: Viabilidade do sêmen suíno resfriado a 15 °C adicionado de antioxidantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em 27/03/2015 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Chaves de Macedo

1º membro

Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa

2º membro

101

102

103

104

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

105

(Filípenses: 4.13)

106

107

108

109

110

111

“A melhor de todas as coisas é aprender.

112

O dinheiro pode ser perdido ou roubado,

113

a saúde e força podem falhar,

114

mas o que você dedicou à sua mente

115

é seu para sempre”.

116

(Louis L. Amour)

117

118

119

120

121

122

“A satisfação vem quando causamos um impacto positivo e eterno

123

na vida dos outros”

124

(Janet Bly)

125

126

127

AGRADECIMENTOS

128

129

130 A Deus, meu protetor e guia, em primeiro lugar, por concretizar mais um sonho em
131 minha vida.

132 A Universidade Estadual do Maranhão, em especial ao curso de Pós-Graduação em
133 Ciência Animal pelo incentivo da realização da pesquisa científica.

134 A FAPEMA, pela concessão da Bolsa de estudo.

135 A empresa suinícola AGROLUSA, pela disponibilização dos animais e aos funcionários
136 Leticia e Genivaldo pelo apoio na execução do experimento.

137 Ao Prof. Fernando Andrade Souza, pelos ensinamentos, orientação, paciência e
138 confiança.

139 Aos membros da banca Prof. Dr. Ricardo Chaves de Macedo e Prof. Dr. Rafael Augusto
140 Satrapa, pela disponibilidade e importante contribuição para finalização desta escrita,
141 desde já agradeço.

142 Aos meus pais, Valmir e Marineide, por todo amor, educação, incentivo em todos os
143 momentos da minha vida profissional e pessoal.

144 A meu namorado Diego Lima, pelo amor, apoio, compreensão, companheirismo e por
145 me ajudar a superar todos os momentos difíceis e estressantes que o mestrado
146 proporcionou.

147 As amigas de laboratório Paula e Sâmara, que me ajudaram bastante na contagem das
148 lâminas, sem vocês não conseguiria.

149 À todos que, de uma forma ou de outra, fizeram companhia dentro do laboratório, e que
150 quando era preciso alguém me auxiliar, nunca me negaram ajuda. Meu agradecimento a
151 Naia, Ylana, Isabela, Otávio, Maria Christina, Douglas, Diego, Sérgio, Andressa, Haleff
152 e Erica.

153 À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste
154 trabalho.

155

Muito obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

156

157

158 **Figura 1:** Estrutura molecular da Vitamina E e do Trolox..... 24

159 **Figura 2:** Estrutura molecular do acido ascórbico..... 25

160 **Figura 3:** Estrutura da Glutathiona..... 27

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

LISTA DE TABELAS

183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213

Tabela 1: Média e desvio padrão do teste de motilidade dos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.....	46
Tabela 2: Média e desvio padrão do teste de vigor dos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.....	47
Tabela 3: Média e desvio padrão do teste de eosina-nigrosina dos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.....	48
Tabela 4: Média e desvio padrão do teste hiposmótico (%) das células espermáticas submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.....	49
Tabela 5: Média e desvio padrão das células espermáticas vivas com acrossoma submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.....	49
Tabela 6: Média e desvio padrão do teste de motilidade espermática após dose adicional dos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3	50
Tabela 7: Média e desvio padrão do teste de vigor espermático após dose adicional dos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3	51
Tabela 8: Média e desvio padrão do teste de motilidade dos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3.....	51
Tabela 9: Média e desvio padrão do teste de eosina-nigrosina nas doses adicionais dos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3.	52
Tabela 10: Média e desvio padrão do teste hiposmótico (%) das células espermáticas submetidas aos antioxidantes adicionais, avaliados nos dias D2 e D3.....	52
Tabela 11: Média e desvio padrão das células espermáticas vivas com acrossoma submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

214

215

216	ATP	Adenosina trifosfato
217		
218	BTS	<i>Beltsville Thawing Solution</i>
219		
220	CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
221		
222	CAT	Catalase
223	CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
224	DNA	Ácido Desoxirribonucleico
225	DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
226	EUA	Estados Unidos da América
227	EROs	Espécies reativas de oxigênio
228	GPX	Glutathione Peroxidase
229	GR	Glutathione Redutase
230	GSH	Glutathione
231	HOST	Teste Hiposmótico
232	H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
233	IA	Inseminação Artificial
234	KCl	Cloreto de Potássio
235	LPD	Leite em pó desnatado
236	mM	milimolar
237	NaCl	Cloreto de Sódio
238	OH ⁻	Radical hidroxila
239	O ₂	Radical ânion superóxido
240	pH	potencial Hidrogeniônico
241	RNS	Espécies reativas de nitrogênio
242	Sptzs	Espermatozoides
243	SH	Grupo Sulfidril

244	TTL	Teste de Termoresistência Lento
245	UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
246	μL	microlitro
247	μM	micromolar
248		
249		
250		
251		
252		
253		
254		
255		
256		
257		
258		
259		
260		
261		
262		
263		
264		
265		
266		
267		
268		
269		

SUMÁRIO

270		
271		
272	Capítulo I: Revisão de Literatura	
273	Inseminação artificial de suínos: Processamento do sêmen e ação de antioxidantes usados	
274	no diluidor	10
275	1. Introdução	11
276	2. Revisão de Literatura	12
277	2.1 Inseminação artificial na cadeia suinícola.....	12
278	2.2 Resfriamento da célula espermática suína.....	14
279	2.3 Diluidores.....	16
280	2.4 Avaliação do sêmen	17
281	2.4.1 <i>Motilidade</i>	17
282	2.4.2 <i>Volume e Concentração</i>	18
283	2.4.3 <i>Morfologia e vitalidade</i>	19
284	2.4.4 <i>Integridade da membrana plasmática</i>	19
285	2.4.5 <i>Integridade do acrosoma</i>	20
286	2.5 Efeito das Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e estresse oxidativo sobre o sêmen....	21
287	2.6 Antioxidantes	22
288	2.6.1 Trolox	23
289	2.6.2 Vitamina C	25
290	2.6.3 Glutathione.....	26
291	Considerações finais.....	28
292	Referências	28
293	Capítulo II: Viabilidade do sêmen suíno resfriado a 15 °C adicionado de antioxidantes ...	39
294	Resumo.....	39
295	Abstract	40
296	1. Introdução	41
297	2. Material e Métodos.....	42
298	2.1 Local.....	42
299	2.2 Animais e Coleta	42
300	2.3 Diluição	43
301	2.4 Análise do sêmen	44
302	2.5 Análise Estatística	45
303	3. Resultados e Discussão	45
304	Conclusão.....	53
305	Referências.....	53

306
307

Capítulo I REVISÃO DE LITERATURA

308 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE SUÍNOS: PROCESSAMENTO DO SÊMEN E
309 AÇÃO DE ANTIOXIDANTES USADOS NO DILUIDOR
310

311

Resumo

312 A qualidade do sêmen é crucial para resultados aceitáveis durante o uso de
313 biotecnologias como a inseminação artificial. Na busca em predizer a capacidade
314 fecundante dos espermatozoides, pesquisadores têm buscado os melhores testes
315 laboratoriais e métodos de conservação. No tocante, a adição de substâncias
316 antioxidante ao diluidor, de acordo com vários estudos, tem demonstrado a finalidade
317 destas em proteger a célula espermática contra o estresse oxidativo. A presente revisão
318 de literatura teve como objetivo abordar alguns pontos sobre a inseminação artificial de
319 suínos, incluindo os aspectos de manipulação, análise e conservação do sêmen, além das
320 vantagens que substâncias antioxidantes, como o Trolox, Vitamina C e Glutathione,
321 podem oferecer durante o armazenamento do sêmen.

322

323 **Palavras-chave:** análise, armazenamento, antioxidantes, espermatozoides, suínos.

324

325

Abstract

326 Semen quality is crucial for acceptable results for the use of biotechnologies such as
327 artificial insemination. In the quest to predict the fertilizing capacity of sperm,
328 researchers have sought the best laboratory tests and conservation methods. Regarding
329 the addition of antioxidant substances to thinner, according to several studies, has
330 shown the purpose of these to protect sperm cells against oxidative stress. This literature
331 review aimed to address some points on the artificial insemination of pigs, including
332 aspects of manipulation, analysis and storage of semen and the benefits that
333 antioxidants, such as Trolox, Vitamin C and Glutathione can offer during the sperm
334 storage.

335

336 **Keywords:** analysis, storage, antioxidants, sperm, pigs.

337 1. Introdução

338 A previsão da capacidade fecundante do sêmen tem grande importância
339 econômica para reprodução quando a inseminação artificial é usada, uma vez que
340 possibilita a seleção de machos com bom desempenho reprodutivo. A técnica tem se
341 mostrado eficiente na difusão do material genético e garantia do sêmen de boa
342 qualidade em relação à monta natural (Bortolozzo et al., 2005). No entanto, vários são
343 os procedimentos que devem ser realizados para obtenção de resultados satisfatórios,
344 dentre eles, destaca-se a escolha adequada do método de resfriamento a ser utilizado.

345 A diluição e conservação do sêmen sob refrigeração a 15 °C é uma alternativa
346 que oferece maximizar a capacidade de reprodução em suínos por diminuir o uso do
347 mesmo reprodutor, repetidas vezes, dentro de um menor período tempo. Para isto, existe
348 uma grande variedade de diluentes comerciais que são utilizados nesta espécie, sendo o
349 BTS, o Androhep[®] e o MR-A[®] os mais comercializados no mundo (Johnson, 1998).

350 Conjuntamente ao resfriamento, outro procedimento que auxilia na melhora da
351 qualidade do sêmen manipulado é a adição de antioxidantes, tais como: o trolox, a
352 vitamina C e a glutatona. Várias pesquisas com adição destas substâncias têm sido
353 realizadas com resultados positivos na melhora do índice reprodutivo (Mortimer, 2000).

354 Neste contexto, o trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E), atua como
355 excelente protetor contra lipoperoxidação (Barclay et al., 1995). A vitamina C ou ácido
356 ascórbico apresenta funções básicas para reprodução, sendo necessária para síntese de
357 colágeno, síntese de hormônios e para prevenir ou reduzir a oxidação de biomoléculas
358 (Sebrell et al., 1967). Já a Glutatona desempenha um papel fundamental em muitos
359 processos biológicos, incluindo a síntese de proteínas e DNA, transporte de
360 aminoácidos, e está envolvida na proteção contra danos oxidativos nos gametas
361 masculino e feminino (Luberda, 2005).

362 As células espermáticas são particularmente sensíveis a danos induzidos pelo
363 excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), no qual afeta sua qualidade, incluindo
364 perda irreversível da motilidade, inibição da respiração, lesões ao DNA espermático e
365 mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante
366 (Valença; Guerra, 2007). Desta forma, a presença de substâncias antioxidantes no
367 plasma seminal ou a adição ao diluente utilizados no armazenamento do sêmen poderia
368 diminuir os efeitos negativos ocasionados pelas EROs.

369 Outro fator importante é a escolha do macho para reprodução, especialmente
370 para inseminação artificial, a qual requer a avaliação do potencial de sua fertilidade
371 através da realização de exames clínicos e laboratoriais. Diversos são os testes de
372 avaliação seminal, como análise da motilidade e longevidade, concentração, morfologia,
373 viabilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal. Diante disto, objetivou-
374 se com essa revisão de literatura ressaltar alguns pontos sobre a inseminação artificial
375 de suínos, incluindo os aspectos de manipulação, análise e conservação do sêmen, além
376 das vantagens que substâncias antioxidantes, como o Trolox, Vitamina C e Glutathione,
377 podem oferecer durante o armazenamento do sêmen.

378

379 **2. Revisão de Literatura**

380 **2.1 Inseminação artificial na cadeia suinícola**

381 A inseminação artificial (IA) na espécie suína foi realizada pela primeira vez por
382 Ivanow na Rússia no início do século XX (Ivanow, 1907; 1922). Na década de 1930, o
383 procedimento foi desenvolvido em granjas da Rússia e nos anos seguintes, a prática da
384 IA se espalhou para outros países (EUA e Japão). Na sequência dos estudos realizados
385 por Chris Polge (1956), a IA foi reintroduzida para a produção de suínos no Reino
386 Unido. Somente a partir de 1975 a IA em suínos desenvolveu-se no Brasil, quando
387 houve um desenvolvimento efetivo com a criação de centrais de inseminação na região
388 sul do país (Rodin e Lipatov 1935; McKenzie, 1931; Ito et al., 1948).

389 A inseminação artificial é amplamente praticada em países com produção
390 intensiva de suínos. Na Europa Ocidental, mais de 90% das fêmeas foram inseminadas
391 durante mais de duas décadas (Gerrits et al., 2005; Vyt, 2007). O plantel mundial utiliza
392 a IA como ferramenta de reprodução com percentual do rebanho inseminado na
393 América do Norte com 60 a 70%, na América Latina com 30% e a Ásia-Pacífica, na
394 região da China, com 30 a 35% (Weitze, 2000).

395 Quando comparado com a monta natural, a IA é uma ferramenta muito útil para
396 introduzir genes superiores em rebanhos produtivos, com menor risco de doenças (Maes
397 et al., 2008). Os ganhos advindos da melhoria genética são de extrema importância, por
398 adquirir, por exemplo, maior rendimento de carne e, conseqüentemente, o aumento na
399 bonificação da carcaça, melhoria na eficiência alimentar, maior ganho de peso e
400 otimização do uso das instalações, aumento na eficiência reprodutiva da granja,
401 manutenção de um menor número de machos, além de permitir que machos
402 geneticamente superiores produzam descendentes com até 200 matrizes por ano, em vez

403 de apenas 20, normalmente servidas via monta natural (Castagna et al., 2001; Fávero e
404 Figueiredo, 2009).

405 O resultado da IA depende muito da qualidade do sêmen e do procedimento da
406 inseminação. O sêmen é obtido a partir de reprodutores em granjas ou em centros
407 especializados em IA. Este último oferece uma diversidade de raças e linhagens
408 genéticas e distribui sêmen pronto para uso e doses de qualidade constante de diferentes
409 rebanhos. Há três aspectos importantes que devem ser considerados. Em primeiro lugar,
410 apenas sêmen de reprodutores saudáveis devem ser usados, animais doentes podem
411 ejacular sêmen contaminados com patógenos, que poderia, portanto, levar a uma rápida
412 transmissão e surtos de doenças em muitos rebanhos comerciais diferentes. O segundo
413 aspecto importante é a capacidade fecundante das doses de sêmen produzidas. O
414 potencial fecundante de uma dose de sêmen é inerentemente ligado à qualidade do
415 próprio espermatozoide (Tsakmakidis et al., 2010). O exame dos ejaculados é, portanto,
416 necessário. Um terceiro aspecto importante das centrais de inseminação é o processo de
417 tratamento do sêmen (Waberski et al., 2008). Isto não só é importante para garantir uma
418 presença microbiana baixa, mais ainda para obter alta qualidade do sêmen. O processo
419 de diluição e manuseio, as propriedades do extensor e o microambiente para as células
420 espermáticas podem influenciar a sobrevivência e longevidade dos espermatozoides
421 (Maes et al., 2011).

422 De acordo com a maioria das estimativas, cerca de 19 milhões de inseminações
423 por ano são realizadas em todo mundo, dos quais quase a totalidade (99%) é realizada
424 utilizando sêmen suíno preservado a uma temperatura de 15-20 °C (Johnson et al.,
425 2000), mais de 85% destas inseminações são realizadas no dia seguinte ou no dia da
426 coleta do sêmen. A manutenção do sêmen suíno refrigerado tem se mostrado eficiente
427 para propagação do material genético, quando o sêmen é adequadamente processado, é
428 possível a obtenção de altos resultados de prenhez e de prolificidade (Bortolozzo et al.,
429 2005). A maioria dos diluidores, no entanto, permite o armazenamento por no máximo
430 72 horas após a coleta do sêmen. Assim, linhas de pesquisa com diluidores têm sido
431 desenvolvidas, objetivando o prolongamento do tempo de estoque de sêmen resfriado
432 de três dias para cinco ou sete dias (Murgas et al., 2001).

433 Como a IA tem apresentado diversos benefícios para reprodução de suínos, é
434 fundamental que pesquisas voltadas para essa biotecnologia em relação a diluentes que
435 possam garantir a conservação dos espermatozoides em condições adequadas durante o
436 tempo de estocagem do sêmen, e também a manutenção da capacidade fecundante do

437 mesmo após sua utilização, favorecendo uma fonte de energia, pH adequado e uma
438 pressão osmótica ideal, além de prevenir o choque térmico e inibir o crescimento
439 bacteriano, poderá favorecer o êxito na utilização da técnica (Vyt et al., 2004).

440

441 **2.2 Resfriamento da célula espermática suína**

442 Atualmente cerca de 99% das inseminações são realizadas no mundo
443 empregando um método de conservação. O resfriamento, por exemplo, mantém o sêmen
444 armazenado por um determinado período e as temperaturas de manutenção variam de
445 acordo com a espécie estudada. O tempo em que o sêmen deverá ser utilizado após a
446 refrigeração depende da qualidade espermática inicial, da temperatura de conservação
447 adequada para cada espécie e do diluente empregado (Silva et al., 2002; Severo, 2009).

448 O sêmen resfriado permite maior flexibilidade de uso e mantém um número de
449 espermatozoides viáveis por um período de tempo maior quando comparado com o
450 sêmen fresco, porém o tempo de processamento é menor, comparado ao sêmen
451 congelado, devido à viabilidade espermática que começa a diminuir após 72 horas de
452 armazenamento, independentemente do diluente utilizado (Severo, 2009).

453 A temperatura de armazenamento do sêmen suíno é um fator crítico para
454 conseguir manter a qualidade do sêmen ideal até sua utilização. O espermatozoide suíno
455 é uma das células mais sensíveis a flutuações de temperatura quando comparado aos de
456 outras espécies (Corrêa et al., 2001). Vários fatores podem estar envolvidos na
457 susceptibilidade desses espermatozoides ao choque térmico, merecendo ênfase a forma
458 da cabeça, a composição química da membrana e a temperatura de fase de transição
459 (Watson e Plummer, 1985; Darin-Bennett et al., 1975; De Leeuw et al., 1990; Gadella,
460 1996).

461 Para manutenção das doses inseminantes, a temperatura ideal para o sêmen
462 suíno varia entre 15° e 18 °C, sendo que queda de temperatura abaixo de 15 °C
463 normalmente causa choque térmico, que resulta em perda irreversível da motilidade
464 espermática e lesões na estrutura das células, conseqüentemente causa impacto no poder
465 fecundante do mesmo (Watson, 1996).

466 Por outro lado, temperatura acima dos 18 °C são deletérias por não reduzirem de
467 forma eficiente o metabolismo dos espermatozoides, facilitando a multiplicação de
468 bactérias, que tem uma ação negativa sobre a qualidade do sêmen (Scheid, 2003). O
469 armazenamento a 15 °C é o mais utilizado tanto em Centros de Inseminação Artificial e

470 em granjas de suínos. No Instituto de Investigação Zootécnica experimentos têm sido
471 bem sucedidos usando o diluidor BTS, mantendo assim, espermatozoides viáveis a 17
472 °C durante 5 dias, com uma taxa de prenhez, em muitos casos superiores a 80%
473 (Fuentes, 2000).

474 Os principais danos celulares induzidos pela refrigeração incluem alterações
475 morfológicas como ruptura da membrana plasmática (principal estrutura afetada durante
476 a refrigeração), lesões nas mitocôndrias e degeneração acrossomal (De Leeuw et al.,
477 1990). Desta forma, qualquer dano ocorrido no acrossoma pode inibir a capacidade
478 fecundante da célula espermática (Woelders, 1991), uma vez que, ejaculados suínos
479 com elevado percentual de acrossomas anormais têm mostrado reduzida fertilidade
480 (Pursel et al., 1972).

481 A perda das propriedades de seletividade da membrana permeável é um dos
482 fatores que ocorre mais precocemente durante o processo de refrigeração (Quinn et al.,
483 1980), e está associada com as fases de transição de lipídeos da membrana devido ao
484 choque térmico (Watson, 1995; 1981a; Drobnis et al., 1993). Esta perda de seletividade
485 pode ser observada por coloração intracelular, incapaz de atravessar a membrana
486 quando está intacta (Medeiros et al., 2002). No suíno, os danos da membrana plasmática
487 dos espermatozoides estão associados à criopreservação, atribuídas para o resfriamento
488 da célula para 5 °C, em vez do processo de congelação-descongelação (Maxwell e
489 Johnson, 1997). No touro, a diluição e resfriamento a 5 °C causa edema no acrossoma
490 em 50% dos espermatozoides (Jones e Stewart, 1979). A atividade respiratória do
491 espermatozoide diminui, assim como a glicólise, o que provoca uma redução nos níveis
492 de ATP e, portanto, a perda de motilidade. Além disso, o DNA é submetido à
493 degeneração. As alterações bioquímicas das células espermáticas são causadas,
494 principalmente, pela perda de seletividade da membrana e a perda de enzimas e
495 fosfolipídios (De Leeuw et al., 1990).

496 Hoje criadores de suínos devem ser eficientes para permanecer em um mercado
497 altamente competitivo. O sucesso depende da convergência entre dedicação,
498 treinamento e observação rigorosa de todos os detalhes. O sucesso da aplicação da
499 inseminação artificial requer um elevado processamento do sêmen de alto padrão, além
500 de determinar o momento adequado para a inseminação e um bom treinamento do
501 técnico. O sêmen deve ser obtido, classificado, diluído e cuidadosamente armazenado.
502 A manipulação do sêmen é crucial, desde sua coleta até a inseminação (Simm et al.,
503 1993).

2.3 Diluidores

Os espermatozoides não sobrevivem por muito tempo no sêmen *in natura*, mesmo se conservados em temperaturas mais baixas. Por essa razão adicionam-se os diluidores, onde são definidos como uma solução aquosa utilizada para aumentar o volume do ejaculado de modo a produzir o número de doses desejado. Tal procedimento precisa ser realizado enquanto as características funcionais das células espermáticas estão preservadas, de modo a garantir adequada taxa de fertilidade das fêmeas que serão inseminadas (Gadea, 2003).

A diluição e conservação do sêmen em refrigeração é uma alternativa que oferece maximizar a capacidade de reprodução, sendo obtido desta forma um maior número de leitões por reprodutor durante a vida produtiva. Para isso, o diluente deve fornecer os nutrientes necessários para a manutenção da célula espermática em relação à condição metabólica (glicose), a proteção contra o choque térmico (BSA), controlar o pH do meio (bicarbonato, Tris, HEPES), pressão osmótica (NaCl, KCl), inibição do crescimento microbiano (antibióticos), bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática (Rueda et al., 2009; Picket e Amann 1987).

Existe uma grande variedade de diluentes comerciais para sêmen suíno. Atualmente existem no mercado duas categorias de diluidores: os de longa duração, que prolongam a vida dos espermatozoides por cinco ou mais dias e os de curta duração, que preservam a viabilidade espermática por até três dias (Bortolozzo et al., 2005). O BTS, o Androhep[®] e o MR-A[®] são os diluentes mais utilizados no mundo (Johnson, 1998).

Diluentes comerciais utilizados foram modificados a fim de obter alta capacidade fecundante do sêmen em processos de inseminação artificial. Características como volume total, concentração e motilidade são indicadores utilizados para avaliar a qualidade do sêmen e a sua resposta à manipulação (Acosta et al., 2008), em particular a motilidade devido à sua associação com o número total de leitões nascidos (Gadea et al., 2004).

Hernandez e Cruz (2004) e Paulenz et al., (2000) relataram perdas elevadas na motilidade do ejaculado suíno em resposta ao tempo de conservação em diluentes Beltsville Thawing Solution (BTS) às 72 horas (19%). Del Toro et al (1996), encontraram percentuais de parição de 75 e 80% em suínos que receberam a dose de sêmen preparado com diluente Kiev preservado por até 72 h. De acordo com Ochoa et al (2008), a motilidade dos ejaculados suínos diluído com Androhep[®], Bütschwiler,

538 MRA[®] e Reading (Modena[®]) foi significativamente maior para os ejaculados
539 preservados no diluente Reading com relação ao tempo de conservação de 120 h.

540

541 **2.4 Avaliação do sêmen**

542 Ao escolher um macho para reprodução, especialmente para IA, é imperativo
543 avaliar o potencial de sua fertilidade através da realização de exames clínicos e
544 laboratoriais. A avaliação *in vitro* do sêmen, complementar ao exame clínico, é de alto
545 valor diagnóstico para avaliação testicular e função do epidídimo, e/ou do trato genital
546 do macho, permitindo a eliminação de casos óbvios de infertilidade, ou potencial de
547 subfertilidade (Martin Rillo et al., 1996; Rodriguez-Martinez 2003; Saacke 2008).

548 Da mesma forma, o grau de normalidade do sêmen, antes de ser processado para
549 a IA pode ser analisado. A análise do sêmen rotineiramente inclui uma avaliação
550 imediata do volume, aparência (isto é, cor, contaminação, etc.), concentração e
551 motilidade espermática, bem como a determinação posterior da morfologia espermática
552 e a presença de células estranhas. Além da viabilidade, integridade da membrana
553 plasmática e acrossomal (Januskauskas et al., 1996; Martin Rillo et al., 1996; Correa et
554 al., 1997; Rodriguez-Martinez 2003).

555

556 *2.4.1 Motilidade*

557 A motilidade é considerada o critério mais importante na avaliação da fertilidade
558 do reprodutor, o objeto de sua estimativa é determinar a proporção de espermatozoides
559 móveis em relação ao total de células de um determinado campo do microscópio
560 (Bortolozzo et al., 2005). A motilidade dos espermatozoides é um fator crítico no
561 processo de interação dos gametas, uma diminuição na velocidade e na proporção de
562 células móveis progressiva reflete dano à célula, que pode reduzir as possibilidades de
563 fecundação. Motilidade e velocidade espermática mostram dois aspectos distintos na
564 atividade flagelar, mas ambos dependem da função do axonema, portanto, se espera
565 uma correlação entre estes parâmetros (Kjaestad et al., 1993).

566 A avaliação visual da motilidade com microscópio de luz continua sendo um
567 método aceitável e é preferido nos centros de IA em relação a outros métodos,
568 principalmente por razões econômicas. No entanto, a avaliação visual, embora
569 consistente, realizada pelo mesmo técnico (Vyt et al., 2004b), requer treinamento
570 especial e há uma grande variabilidade entre técnicos (Rijsselaere et al., 2003; Vyt et al.,
571 2004b; Tejerina et al., 2008).

572 Como espermatozoides de suínos mostram uma percentagem mais elevada de
573 movimento circular do que as de outras espécies, exceto garanhões, recomenda-se
574 estimar as diferentes formas de motilidade, incluindo proporções de espermatozoides
575 progressivos. Estimativas realizadas por microscopia de contraste de fase dentro de 20-
576 30 min de diluição não pode ser integrado facilmente em processos de produção. O
577 sêmen suíno armazenado deve ser examinado regularmente e valores de motilidade
578 acima de 60% devem ser considerados satisfatórios (Johnson et al., 2000).

579

580 *2.4.2 Volume e Concentração*

581 O volume é medido por pesagem rotineiramente após a ejaculação considerando
582 1 grama igual a 1 mL. Doses prontas para usar na IA são fornecidas em tubos de 80-100
583 mL contendo aproximadamente 3×10^9 espermatozoides (Martin-Rillo et al., 1996; Alm
584 et al., 2006). A variação na concentração entre raças e indivíduos é evidente e deve ser
585 considerado quando se prepara doses de sêmen (Johnson et al., 2000; Kommisrud et al.,
586 2002).

587 O número de espermatozoides deve ser adaptado de acordo com as
588 características morfológicas ou motilidade e admite-se geralmente que uma dose fértil
589 deve conter, pelo menos, $2-3 \times 10^9$ espermatozoides (Martin-Rillo et al., 1996, Alm et
590 al., 2006) . No entanto, para maximizar a produção de doses de sêmen, centrais de IA
591 tendem a diluir os ejaculados, tanto quanto possível para fins econômicos evidentes
592 (Vyt et al., 2007a). Pesquisas efetuadas durante os últimos anos têm centrado na
593 redução do número de espermatozoides por dose, sem comprometer os resultados de
594 fertilidade. Usando inseminação intrauterina, os resultados aceitáveis de fertilidade
595 foram obtidos com doses de 1×10^9 espermatozoides (Roca et al., 2003; Roca et al.,
596 2011).

597 O hemocitômetro tem sido referido como o "padrão ouro" para avaliar o número
598 de espermatozoides (Christensen et al., 2005; Kuster 2005; Prathalingam et al., 2006).
599 No entanto, o equipamento é lento, e várias medidas de cada amostra são necessárias
600 para obter-se um resultado exato (Evenson et al., 1993; Prathalingam et al., 2006). A
601 utilização de um espectrofotômetro é provavelmente o método mais comum usado pelas
602 estações de IA para a avaliação da concentração de espermatozoides (Woelders 1991;
603 Evenson et al., 1993).

604

605

2.4.3 *Morfologia e vitalidade*

Anormalidades morfológicas dos espermatozoides podem ter um impacto negativo sobre a fecundação e desenvolvimento embrionário (Walters et al., 2005a; Saacke 2008). Sêmen de suínos com baixa incidência de espermatozoides morfológicamente anormais resultará em menores taxas de prenhez e redução da ninhada quando utilizado para inseminação (Almet al., 2006; Tsakmakidis et al., 2010) e a morfologia deve, portanto, ser analisada para identificar subfertilidade do reprodutor.

Defeitos morfológicos espermáticos são normalmente classificados como maiores ou menores. O primeiro grupo compreende as anormalidades na forma da cabeça as quais danificam o material genético ou anormalidades da mitocôndria que prejudica a função dos flagelos, sendo relacionado com a infertilidade. As gotas citoplasmáticas distais, anomalias morfológicas adquiridas por manuseio inadequado de sêmen (por exemplo, caudas enroladas) são consideradas como defeitos menores, também pode causar infertilidade, mas é menos provável, pode haver fertilização. Defeitos menores podem ser compensados com o aumento do número de espermatozoides por dose (Donadeu, 2004).

Um exame morfológico completo é recomendado quando suínos são introduzidos na estação de IA e durante exames de rotina regulares subsequentes (Johnson et al., 2000; Al-Makhzoomi et al., 2008). A percentagem de gotículas citoplasmáticas em ejaculados suínos utilizadas para IA não deve exceder 15%, especialmente quando o sêmen armazenado é usado. Além da incidência de gotículas citoplasmática, a percentagem de outras alterações morfológicas não deve exceder 20% (Johnson et al., 2000).

A integridade da membrana é um indicador da vitalidade do sêmen e é necessária para manter a função espermática. Muitos procedimentos de manuseio, como diluição ou armazenamento em baixas temperaturas, tanto para armazenamento do fluido e para criopreservação, pode danificar a membrana espermática prejudicando a fertilidade. Portanto, é imperativo avaliar este parâmetro para estimar os efeitos na fertilidade e armazenamento do sêmen suíno (Leahy e Gadella, 2011; Waberski et al., 2011a).

2.4.4 *Integridade da membrana plasmática*

639 A membrana espermática é uma estrutura dinâmica e participa do
640 reconhecimento e transporte de moléculas. Estas funções permitem o espermatozoide
641 adaptar o seu metabolismo para o meio circundante, fornecendo, assim, um sistema
642 molecular para o reconhecimento do oócito (Hammerstedt et al., 1990). A avaliação da
643 integridade da membrana é uma importante informação da fertilidade do macho. Além
644 disso, esta integridade não é só essencial para o metabolismo do espermatozoide, mas
645 também para adequada capacitação e reação acrossômica (Jeyendran et al., 1984;
646 Yanagimachi, 1993).

647 O teste hiposmótico (HOST) foi desenvolvido para avaliar a funcionalidade da
648 membrana de espermatozoides e é recomendado como um indicador adicional de
649 fertilidade por ser econômico e de fácil manejo (Correa et al., 1994). O teste
650 hiposmótico consiste em submeter o espermatozoide a uma pressão osmótica inferior à
651 fisiológica, fazendo com que uma entrada de água na célula, numa tentativa de
652 equilibrar a pressão osmótica interna para o ambiente externo. Para que essa resposta
653 ocorra, a membrana plasmática deve estar íntegra e os mecanismos de troca de fluidos
654 funcionando corretamente. A entrada de água para estas células provoca inchaço e
655 enrolamento da cauda. As células com a membrana física ou funcionalmente danificada
656 não ocorrem mudanças na forma da cauda (Perez-Llano et al., 1999). Este teste foi
657 aplicado no sêmen de homens (Zaneveld e Jeyendran 1990), touros (Correa et al.,
658 1997), cães (Caiza et al., 1997), equinos (Perez-Llano et al., 1998) e suínos (Correa et
659 al., 1994). Em suínos, se a pressão osmótica é demasiadamente baixa, a membrana
660 plasmática se rompe e a cauda reaparece reta, o que seria confundido com um
661 espermatozoide ainda não reagido (Correa et al., 1994).

662

663 *2.4.5 Integridade do acrossoma*

664 Um acrossoma intacto é necessário para a penetração do oócito e, por
665 conseguinte, a sua integridade é considerado essencial para uma boa capacidade
666 fecundante. Durante o processo de diluição, resfriamento e congelamento a membrana
667 plasmática da cabeça dos espermatozoides é particularmente afetada, e também a
668 membrana das mitocôndrias, do flagelo e do acrossoma (Hammerstedt et al., 1990).
669 Estes dados são significativos, considerando que acrossoma contém enzimas que
670 desenvolvem um papel crucial na penetração da zona pelúcida e nos mecanismos
671 celulares (Bedford, 1970). A desintegração do acrossoma derivado da refrigeração e do
672 congelamento provavelmente é capaz de afetar a capacidade de fecundação do

673 espermatozoide (Watson, 1975b). A reação do acrossoma ocorre após a exposição a
674 condições ambientais do local da fecundação ou após a ligação específica do
675 espermatozoide a zona pelúcida (DenDaas, 1992) de modo que a percentagem de
676 células com acrossoma intacto estejam aptas para exibir a reação acrossomal após
677 estimulação adequada, sendo uma importante característica seminal (De Leeuw et al.,
678 1991). Portanto, é necessário avaliar corretamente o estado acrossomal.

679 A integridade do acrossoma pode ser avaliada utilizando corantes vitais, como
680 Giemsa- Azul de Tripán e por meio de sondas fluorescentes, avaliado pelo padrão de
681 coloração das células espermáticas observadas por microscopia de fluorescência ou por
682 meio de citometria de fluxo. Uma técnica de marcação tripla que permite avaliar a
683 integridade da membrana e do acrossoma em conjunto com a função mitocondrial foi
684 testado em sêmen de suíno com bons resultados (de Andrade et al., 2007). A
685 combinação com a coloração vital e citometria de fluxo permite contar um grande
686 número de partículas, porém está propenso a perder estimativas (Petrunkina e Harrison,
687 2010).

688

689 **2.5 Efeito das Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e estresse oxidativo sobre** 690 **o sêmen**

691 As espécies reativas ao oxigênio (EROs), também conhecidos como oxidantes,
692 são radicais produzidos por sistemas biológicos aeróbicos. O oxigênio é o elemento
693 fundamental para sobrevivência das células em condições aeróbicas, mas seus
694 metabólitos como as EROs, podem modificar as funções celulares. Por isso, a EROs
695 deve ser continuamente inativada para que apenas uma pequena quantidade necessária
696 mantenha a função normal da célula (Jordão Junior et al., 1998).

697 O estresse oxidativo surge como consequência do desequilíbrio entre os
698 processos bioquímicos que conduzem a produção excessiva de EROs e mecanismos de
699 defesa antioxidante com deficiência (Sayre et al., 2008). Propõe-se que o estresse
700 oxidativo ocasiona uma série de patologias que, atualmente, possam afligir a função
701 reprodutiva (Sharma e Agarwal, 1996). A geração de EROs tornou-se uma preocupação
702 real por causa de seus potenciais efeitos tóxicos em níveis elevados de qualidade e
703 função espermática.

704 A ideia de que quantidades limitadas de EROs pode intervir de uma forma
705 fisiológica na regulação de algumas funções do sêmen foi evocada pela primeira vez em

706 um estudo realizado por Aitken et al., (1994). Esses pesquisadores descobriram que
707 baixos níveis de EROs pode melhorar a capacidade dos espermatozoides humanos se
708 ligarem a zona pelúcida, um efeito que foi revertido pelo uso da vitamina E. Outros
709 estudos relataram que a incubação de espermatozoides com baixa concentração de
710 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estimula a capacitação espermática, hiperativação,
711 reação acrossomal e fusão com oócito (de Lamirande, 1993). Outras espécies reativas
712 de oxigênio, exceto o H_2O_2 , tais como o radical hidroxila (OH^\cdot) e radical ânion
713 superóxido (O_2^\cdot) também mostrou promover a capacitação do espermatozoide e reação
714 acrossomal (Zine et al., 1996).

715 As células espermáticas são particularmente sensíveis a danos induzidos pelo
716 estresse oxidativo devido as suas membranas plasmáticas conterem grandes quantidades
717 de ácidos graxos polinsaturados e o seu citoplasma contém baixas concentrações de
718 enzimas de defesa (Cerolini et al., 2000; Sikka, 2004). Isto tem sido relatado no
719 congelamento de espermatozoide humano (Alvarez e Storey, 1995), touro (O'Flaherty et
720 al., 1997) e do rato (Mazur et al., 2000) que está associado ao nível de EROs e estresse
721 oxidativo. Além disso, no processo de congelamento e descongelamento de sêmen
722 bovino a formação de EROs pode gerar danos no DNA, alterações do citoesqueleto,
723 inibição da fusão espermatozoide-oócito, além de afetar o axonema, o qual influencia na
724 motilidade dos espermatozoides (Chatterjee et al., 2001; Lopes 1998; Hinshaw et al.,
725 1986; Aitken et al., 1989).

726 Estudos relatados por Macleod (1943) resultou em toxicidade ao sêmen humano
727 após exposição à elevada concentração de oxigênio, com perda da motilidade devido à
728 ocorrência da peroxidação lipídica. Os efeitos desta reação incluem perda irreversível da
729 motilidade, inibição da respiração e lesões no DNA espermático, e perda de enzimas
730 intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (White, 1993;
731 Valença; Guerra, 2007).

732

733 **2.6 Antioxidantes**

734 Com objetivo de contrariar um possível dano significativo à célula devido a
735 produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), os antioxidantes regulam a
736 formação ou controlam a ação das EROs, permitindo atingir um equilíbrio entre
737 formação de oxidantes benéficos e estresse oxidativo prejudicial (Kefer et al., 2009).

738 Por definição, os antioxidantes são substâncias formadas por vitaminas,
739 minerais, enzimas, pigmentos naturais e outros compostos vegetais, cuja principal
740 função é inibir a oxidação de outras substâncias (Stedman, 2003). Existem dois sistemas
741 de defesa, os antioxidantes enzimáticos, conhecidos como os naturais, que agem na
742 prevenção dos danos as estruturas celulares constituídos por superóxido dismutase
743 (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione reductase
744 (GR) e glutathione peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos, conhecidos
745 como sintéticos ou suplementos da dieta, participam bloqueando a ação dos radicais
746 livres. Faz parte do sistema um grande número de compostos de baixo peso molecular,
747 incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas
748 (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico, albumina, taurinas, hipotaurinas, (Maia,
749 2006; Nordberg e Arnér, 2001; Lima-Verde et al., 2007; Tatone et al., 2010).

750 O espermatozoide apresenta naturalmente um sistema de antioxidante intra e
751 extracelulares, responsáveis por combater o estresse oxidativo e a lipoperoxidação,
752 importantes em preservar a motilidade e a habilidade dos espermatozoides de sofrerem
753 capacitação e reação do acrossoma (Guerra et al., 2004). Durante o período de
754 maturação, o espermatozoide perde a maior parte de seu citoplasma, sendo desta forma
755 privado de uma fração de antioxidantes endógenos, tornando-o vulnerável à ação das
756 EROs, assim ficam dependendo da proteção do plasma seminal, o qual contém também
757 antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que confere a forma de proteção mais
758 utilizada pelos espermatozoides contra as EROs (Carvalho et al., 2002; Saleh e
759 Agarwal, 2002; Sikka, 2004).

760 Contudo, durante o processamento do sêmen destinado ao armazenamento,
761 ocorre um comprometimento da capacidade protetora a partir da redução da
762 concentração de antioxidantes presentes no ejaculado após a diluição ou remoção do
763 plasma seminal (Sarlós et al., 2002; Guerra et al., 2004). A fim de melhorar a qualidade
764 do sêmen, diversas pesquisas com adição de antioxidantes aos diluidores de preparação,
765 manutenção e criopreservação têm sido desenvolvidas em diferentes espécies com
766 objetivo de amenizar o estresse oxidativo do sêmen (Mortimer, 2000).

767

768 **2.6.1 Trolox**

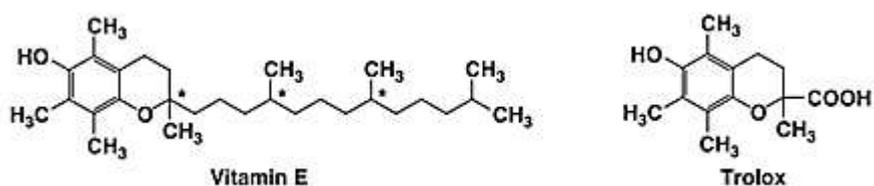
769 As vitaminas foram classificadas de acordo com a solubilidade, sendo
770 lipossolúveis (vitaminas A, D, E, K) e hidrossolúveis (vitaminas presentes no complexo
771 B e vitamina C) (Feltre, 2005). A vitamina E é um grupo de tocoferóis e tocotrienóis
772 derivados de componentes presentes nos vegetais, sendo que apenas oito moléculas
773 naturais revelam atividade antioxidante, quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro
774 tocotrienóis (α , β , γ , δ) (Brigelius-flohé & Traber, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999).

775 A vitamina E atua em lipídios e proteínas de baixa densidade presentes na
776 membrana plasmática, conferindo proteção estrutural à membrana da ação dos
777 oxidantes (Kagan et al., 1992). Considerando a localização do α -tocoferol nas
778 membranas subcelulares, acredita-se que ela remova principalmente o ânion superóxido,
779 gerado por enzimas ligadoras de membrana que participam na oxidação biológica
780 (Nishikimi e Machlin, 1975). Conhecida também como principal antioxidante lipofílico
781 que protege os ácidos graxos polissaturados dos tecidos contra a peroxidação (Halliwell
782 & Gutteridge, 1999).

783 Diversos estudos com adição de vitamina E na alimentação de humanos e
784 animais tem sido realizados com resultados positivos na melhora do índice reprodutivo.
785 Devido aos efeitos benéficos da suplementação com esta vitamina, surge o interesse em
786 adicionar tal composto ao diluente na preservação de espermatozoides, porém a
787 natureza lipídica deste antioxidante dificultava sua dissolução em meios aquosos
788 comumente utilizados. Assim foi desenvolvido o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil
789 croman-2-acido carboxílico), análogo hidrossolúvel da Vitamina E, sintetizado por
790 Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e
791 gorduras tanto animal quanto vegetal, apresentando sua ação antioxidante mais elevada
792 que a do α e γ -tocoferol (Scott et al., 1974; Cort et al., 1975).

793 Sua estrutura é composta por um núcleo “croman”, semelhante ao do α -
794 tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (figura 1).

795



796

797 Figura 1: Estrutura molecular da Vitamina E e do Trolox. Fonte: Rezk et al., (2004)

798

799 Segundo Barclay et al., (1995) o Trolox apresenta vantagem em relação a outros
800 antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como α - tocoferol. Devido a sua estrutura
801 cromanol que lhe dá atividade antioxidante e ao grupo carboxila, que tem moderado
802 efeito hidrossolúvel, o Trolox é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios
803 das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Apesar
804 disso, o trolox pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (sistema intacto)
805 sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração. Isto o torna conveniente
806 para estudos em sistemas biológicos naturais.

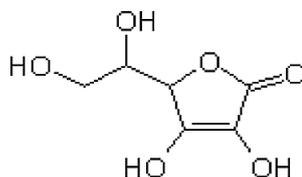
807 Portanto, a ação desse antioxidante sobre a qualidade espermática vem sendo
808 analisado em varias pesquisas. Experimentos realizados por Peña et al. (2003) avaliando
809 a adição de Trolox a frações rica e pobre de ejaculados de reprodutores suínos, obteve
810 aumento significativo na motilidade e velocidade espermática, redução de células com
811 movimento circular e desvio lateral de cabeça, aumento no número de espermatozoides
812 com elevada atividade mitocondrial e efeitos preventivos maiores nas frações pobres em
813 espermatozoides. Isto pode ter ocorrido tanto pela variação da composição do plasma
814 seminal entre as duas frações quanto pela variação da população espermática.

815

816 2.6.2 Vitamina C

817 A vitamina C, também denominada de ácido ascórbico ou ascorbato é uma
818 vitamina hidrossolúvel encontrado no líquido extracelular com ação antioxidante
819 (Eichner, 1994). Possui fórmula química $C_6H_8O_6$ (Figura 2).

820



821

822 Figura 2: Estrutura molecular do ácido ascórbico. Fonte: Fiorucci, (2003).

823

824 O ácido ascórbico é um componente essencial na dieta dos seres humanos e de
825 uma pequena gama de outros mamíferos. Tem sido associado com a fertilidade durante
826 muitos anos e pode ter significado evolutivo (Millar, 1992), mas o seu papel fisiológico
827 preciso na reprodução tem sido incerto. Dados recentes sugerem que o ácido ascórbico

828 tem funções definidas na secreção do hormônio, proteção de gametas e remodelação do
829 tecido gonadal. Seus efeitos podem ser, portanto, explicados por mecanismos celulares
830 e bioquímicos análogos aos aplicáveis em outros tecidos. Esta análise sugere que o
831 ácido ascórbico deve ser considerado como um bioquímico essencial no processo de
832 reprodução e como um fator potencialmente importante na fertilidade (Davis et al.,
833 1991; Franceschi et al., 1992).

834 O ácido ascórbico tem três ações biológicas de particular relevância para a
835 reprodução, cada uma dependente de seu papel como agente redutor: é necessário para a
836 biossíntese de colágeno, para a biossíntese de esteroides e hormônios peptídicos, e para
837 prevenir ou reduzir a oxidação de biomoléculas. As propriedades antioxidantes do ácido
838 ascórbico que protegem os tecidos de espécies reativas de oxigênio são O_2^- , OH , H_2O_2 ,
839 O_2 , OCl , NO , e complexos metálicos de oxigênio. Estes radicais podem ser prejudiciais
840 para DNA, proteínas, carboidratos, lipídios, membranas biológicas e, por vezes, com
841 consequências patológicas (Sebrell et al., 1967).

842 Os primeiros estudos relataram efeitos diretos da deficiência de ácido ascórbico
843 na fertilidade masculina, em animais de laboratório e em espécies domésticas. Baixos
844 níveis de ácido ascórbico no sêmen bovino foram associados com o mau desempenho
845 reprodutivo, enquanto cobaias sofreram degeneração do epitélio germinativo testicular
846 (Luck, 1994). Em coelhos, verificaram que este antioxidante reduziu significativamente
847 as concentrações de radicais livres e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes
848 (GST, SOD e CAT) em comparação com animais não tratados. Estes estudos sugerem
849 que o ácido ascórbico afeta tanto a integridade da estrutura quanto a funcionalidade
850 espermática (Yousef et al., 2007).

851 Concentrações baixas ou deficientes de ascorbato têm sido associadas com baixa
852 contagem espermática, aumento do número de espermatozoides anormais, redução da
853 motilidade e aglutinação (Dawson et al., 1990). A adição de ácido ascórbico para o
854 meio crioprotetor reduz o estresse oxidativo e aumenta a motilidade dos
855 espermatozoides (Hua et al., 2010).

856

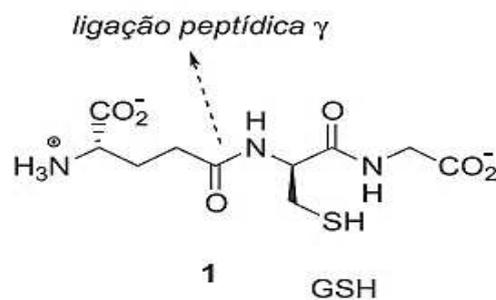
857 **2.6.3 Glutathione**

858 A Glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) é o mais abundante tiol não proteico
859 distribuído nas células, conferindo proteção contra as toxinas exógenas e endógenas,

860 incluindo as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio
861 (ERNs). O núcleo do resíduo cistenilglicina da Glutathiona está envolvido na sua função
862 como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz,
863 por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre. Esta substância
864 é hábil em inativar diretamente EROs como O_2^- e OH^- (Jordão Júnior et al., 1998),
865 exercendo um importante papel na desintoxicação e antioxidação dos compostos
866 endógenos, bem como na manutenção do status redox intracelular (Luberda, 2005).

867 Por ser um tripeptídeo linear, a Glutathiona (Figura 3) é constituída por
868 aminoácidos como o ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o
869 local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. A GSH é a forma reduzida
870 da glutathiona, sendo o grupo sulfidril (SH), um nucleófilo forte, responsável pela
871 proteção da célula contra o estresse oxidativo (Luberda, 2005).

872



873

874

Figura 3: Estrutura da Glutathiona

875

876 A GSH está distribuída em todo organismo animal, presente na maioria das
877 células em concentrações de 1 a 8 mM, geralmente, em sua maior quantidade no fígado.
878 Desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos, incluindo a síntese
879 de proteínas e DNA e o transporte de aminoácidos, exerce proteção das células contra a
880 oxidação. Nas células germinativas participa dos eventos de maturação do oócito,
881 fertilização e pré-implantação do embrião. A Glutathiona está envolvida na proteção
882 contra danos oxidativos nos gametas masculino e feminino (Luberda, 2005).

883

884 A distribuição da glutathiona no sistema reprodutor masculino é diferenciada de
885 acordo com a espécie estudada. No espermatozoide, é encontrada em maiores
886 concentrações na peça intermediária e pouca quantidade no plasma seminal (Knapen et
887 al., 1999). No entanto, o processo de criopreservação estabelece significativa redução da
888 Glutathiona no sêmen de diversas espécies (Gadea et al., 2007). Segundo Raijmakers et

888 al., (2003), a concentração da Glutathione no plasma seminal é determinante para a
889 fertilidade, uma vez que a diminuição das concentrações deste tiol está associada à
890 subfertilidade ou mesmo à infertilidade masculina.

891

892 **3. Considerações finais**

893 A escolha do macho, um manejo adequado, diluentes de boa qualidade e
894 métodos eficazes de análise da viabilidade de células espermáticas são de fundamental
895 importância para oferecer doses de sêmen viáveis para o uso posterior na inseminação
896 artificial em granjas suínolas e melhorar a rentabilidade. Por conseguinte, torna-se
897 necessária a realização de estudos aprofundados com a adição de substâncias
898 antioxidantes ao meio diluidor, para que haja consenso no tipo e dosagem a ser utilizado
899 a fim de oferecer proteção à célula e prolongar a capacidade fecundante do
900 espermatozoide durante os dias de conservação, fator este limitante para aplicação da
901 técnica em maior escala.

902

903 **4. Referências Bibliográficas**

904

905 ACOSTA, M.; PERDIGÓN, R.; RUEDA, M. Valoración de indicadores de calidad
906 seminal porcina, utilizando lafracción rica deleyaculado. **Rev. Unell. Cienc. Tec.** 26:49-
907 53. 2008

908

909 AITKEN RJ, CLARKSON JS, FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid
910 peroxidation, and human sperm function. **Biol Reprod** 1989; 41: 183-197.

911

912 AITKEN RJ. A free radical theory of male infertility. **Reprod Fertil Dev** 1994;6:19-24.
913 ALM K, PELTONIEMI OA, KOSKINEN E, ANDERSSON M, 2006: Porcine field
914 fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology.
915 **Reprod.Domest.Anim.** 41 210-213.

916

917 AL-MAKHZOOMI A, LUNDEHEIM N, HÅÅRD M, RODRIGUEZ-MARTINEZ H,
918 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden.
919 **Theriogenology** 70 682-691.

920

921 ALVAREZ JG, STOREY BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and
922 loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethalcryodamage to human
923 sperm during cryopreservation. **J Androl** 1992;13: 232-241.

924

925 BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of
926 the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of
927 phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies.
928 **BiochimicaetBiophysicaActa**, v.1237, p. 77-85, 1995.

929

- 930 BEDFORD, J.M. (1970) - Sperm capacitation and fertilization in mammals.
931 **BiolReprod Supplement2**: 128-158.
932
- 933 BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E et al. **Processamento e**
934 **armazenamento das doses inseminantes**. In: Inseminação artificial na suinocultura
935 tecnificada. Porto Alegre: Palloti, 2005a.185p.
936
- 937 BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The**
938 **FASEB Journal**, v.13, p. 1145-1155, 1999.
939
- 940 CAIZA DE LACUEVA FI; RIGAU T.; BONET S; MIRO J; BRIZ M.; RODRIGUEZ
941 J. 1997. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of
942 ouabain.**Theriogenology**, 47: 765-784.
943
- 944 CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; et al. Efeito oxidativo do
945 óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**
946 **Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.
947
- 948 CASTAGNA, C. D., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Estratégias de inseminação
949 artificial na suinocultura moderna. In: Congresso Brasileiro de Veterinários
950 Especialistas em Suínos, 10, Porto Alegre, 2001. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, v.
951 1, 2001, p.143-150.
952
- 953 CEROLINI S, MALDJIAN A, SURAI P, NOBLE R. Viability, susceptibility to
954 peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage.
955 **AnimReprodSci** 2000;58: 99-111.
956
- 957 CHATTERJEE S, GAGNON C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa
958 undergoing cooling, freezing, and thawing. **MolReprod Dev** 2001;59: 451-458.
959
- 960 CHRISTENSEN P, STRYHN H, HANSEN C, 2005. Discrepancies in the
961 determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting
962 chambers.**Theriogenology** 63 992-1003.
963
- 964 CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM, 1997. Relationships among frozen-thawed
965 sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and
966 fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology** 48 721-731.
967
- 968 CORREA JR; HEERSCHÉ G; ZAVOS PM. 1997. Sperm membrane functional
969 integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic
970 swelling test incubation at varying temperatures.**Theriogenology**; 47: 715-721.
971
- 972 CORRÊA MN, MEINCKE W, LUCIA JR T, DESCHAMPS JC. Inseminação artificial
973 em suínos. Pelotas: **Printpar Gráfica e Editora**, 2001. 181p.
974
- 975 CORREA, J.R. ZAVOS, P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as
976 an assay to evaluate the functional integrity of the frozen –thawed bovine sperm
977 membrane. **Theriogenology**, 42: 361-370.
978
- 979 CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; MERGENS, W.J.;
CANNALONGA, M.A.; OSCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R.

980 Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic
981 acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.52, n.6, p.174-178, 1975.
982

983 DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Cholesterol and phospholipid content of
984 mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold-shock.
985 **Australian Journal of Biological Sciences**, v.26, n.6, p.383-384, 1975.
986

987 DAVIS MB, AUSTIN J, PARTRIDGE DA VITAMIN C: **Its Chemistry and**
988 **Biochemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1991.
989

990 DAWSON EB, HARRIS WA, POWELL LC. Relationship between ascorbic acid and
991 male fertility. **World Rev Nutr Diet**, v.62, p.1-26, 1990.
992

993 DE ANDRADE AF, DE ARRUDA RP, CELEGHINI EC, NASCIMENTO J,
994 MARTINS SM, RAPHAEL CF, MORETTI AS, 2007: Fluorescent stain method for the
995 simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and
996 acrosomal membranes in boar sperm. **Reprod.Domest.Anim.** 42 190-194.
997

998 DELAMIRANDE E, GAGNON C. Human sperm hyperactivation and capacitation as
999 parts of an oxidative process. **Free Radic Biol Med** 1993;14:255-65.
1000

1001 DELAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I.
1002 Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **J Androl**
1003 1992;13: 368-378.
1004

1005 DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. (1991) - The fix vital stain
1006 method simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine
1007 spermatozoa. **J Androl** 12: 112-118.
1008

1009 DE LEEUW, F.E.; CHING CHEN, H.; COLENBRANDER, B.E.M.; VERKLEIJ, A.J.
1010 Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes.
1011 **Cryobiology**, v.27.p.171-183, 1990.
1012

1013 DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. (1990) - The role
1014 membrane plays in cold shock and freezing injury. **Reprod Dom Anim Supp** 11: 95-
1015 104.
1016

1017 DEL TORO, Y.; ARIAS, T.; DIÉGUEZ, F.J.; MORALES, G.; MARTÍNEZ, M.
1018 Nuevodiluyente conservador de sêmen porcino en estado fresco. **Rev. Comput.**
1019 **Prod.Porc.** 3(1): 57-61. 1996
1020

1021 DEN DAAS, N. (1992) - Laboratory assessment of semen characteristics.
1022 **AnimReprodSci** 28: 87- 94.
1023

1024 DONADEU M, 2004: Advances in male swine artificial insemination (AI) techniques.
1025 **The Pig Journal** 54 110-122.
1026

1027 DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.;
1028 OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. (1993) - Cold shock damage is due to lipid phase

1029 transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **The Journal**
1030 **ExpZool** 265: 432-437
1031

1032 EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), Physical
1033 Activity, Fitness and Health. **Humankinetics**. Champaign: Illinois, 1994. pp.35-42.
1034

1035 EVENSON DP, PARKS JE, KAPROTH MT, JOST LK, 1993: Rapid determination of
1036 sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. **J. DairySci.** 76 86-94.
1037

1038 FÁVERO, J. A.; FIGUEIREDO, E. A. P. Evolução do melhoramento genético de
1039 suínos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 4, p. 420-427, 2009.
1040

1041 FELTRE, R. Fundamentos da química. 4ª Ed. São Paulo: **Moderna**, 2005. 700p.
1042

1043 FIORUCCI, A. R. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos.
1044 **Química Nova na Escola**, São Paulo, v.17, maio. 2003.
1045

1046 FRANCESCHI RT. The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. **NutrRev**
1047 1992; 50:65-70.
1048

1049 FUENTES, A. 2000. **Inseminación Artificial Porcina en Venezuela**. Instituto de
1050 Investigaciones Zootécnicas. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
1051 Maracay, Venezuela. Serie C N° 47. 71 p.
1052

1053 GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine.
1054 **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.2, p.17-27, 2003.
1055

1056 GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GRULLÓN,
1057 L.A.; GARDÓN, C. Supplementation of the dilution medium after thawing with
1058 reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of
1059 frozenthawed bull spermatozoa. **International Journal of Andrology**, p. 31, p. 40-49,
1060 2007.
1061

1062 GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.The predictive value of porcine seminal
1063 parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reprod. Domest. Anim.**
1064 39: 303–308. 2004
1065

1066 GADELLA, B.M. Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar
1067 spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals.**, v.31, p.63-73,1996.
1068

1069 GERRITS, R.; LANGENDIJK, P.; SOEDE, N.M. & KEMP, B. (2005).Effects of
1070 (artificial) boar stimuli on uterine activity in estrous sows. **Theriogenology**, Vol.64, pp.
1071 1518-1525., ISSN 0093-691X
1072

1073 GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e
1074 antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução**
1075 **Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.
1076

1077 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and**
1078 **Medicine**.3ed., Oxford University Press: New York, 1999, 936p.

1079
1080 HAMMERSTEDT RH; GRAHAM JK; NOLAN JP. 1990. Cryopreservation of
1081 mammalian sperm: what we ask them to survive. **J Androl**; 11: 73-88.
1082
1083 HERNÁNDEZ, J.; CRUZ, R. Influencia del tiempo de conservación, raza, volumen y
1084 concentración sobre la motilidad del semen fresco porcino almacenado por 96 horas.
1085 **Rev. Reprod. Anim.** 30: 75-80. 2004.
1086
1087 HINSHAW DB, SKLAR LA, BOHL B, SCHRAUFSTATTER IU, HYSLOP PA,
1088 ROSSI MW, SPRAGG RG, COCHRANE CG. Cytoskeletal and morphologic impact of
1089 cellular oxidant injury. **Am J Pathol** 1986;123: 454-464.
1090
1091 HUA J., TIANB W., ZHAOC X., ZANA L., WANGA H., LI Q., XINA Y., 2010 – The
1092 cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality.
1093 **Animal Reproduction Science** 121, 72-77.
1094
1095 ITO T., NIWA T., KUDO A., 1948. Studies on artificial insemination in swine.
1096 **ZootechExpSta Res Bull** 55, 1-74.
1097
1098 IVANOW E.I., 1907. De la fécondation artificielle chez les mammifères. **Arch SciBiol**
1099 12, 377-511. IVANOW E.I., 1922. On the use of artificial insemination for zootechnical
1100 purposes in Russia. **J AgricSci** 12, 244-256.
1101
1102 JANUSKAUSKAS A, SÖDERQUIST L, HÅÅRD M G, HÅÅRD MC, LUNDEHEIM
1103 N, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, 1996: Influence of sperm number per straw on the
1104 post-thaw sperm viability and fertility of Swedish red and white A.I. bulls. **Acta Vet.**
1105 **Scand.** 37 461-470.
1106
1107 JEYENDRAN RS; VAN DER VEN HH; PEREZ-PELAEZ M; CRABO BJ;
1108 ZANEVELD LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of
1109 the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J**
1110 **ReprodFertil**; 70:219-228
1111
1112 JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P, MAXWELL WM, 2000: Storage of boar
1113 semen. **Anim. Reprod. Sci.** 62 143-172.
1114
1115 JOHNSON, L.A. Current developments in swine semen: preservation, artificial
1116 insemination and sperm sexing. In: Congress International Pig Veterinary Society.
1117 15th., 1998, Birmingham, England, **Proceedings...Birmingham**, v.1, p.225-229. 1998.
1118
1119 JONES, R.C.; STEWART, D.L. (1979) - The effects of cooling to 5°C and freezing and
1120 thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. **J Reprod Fertil** 56: 233-238.
1121
1122 JORDÃO JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M; VANNUCCHI,
1123 H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathiona reduzida e da Vitamina E.
1124 **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.
1125
1126 KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T.; et al. Recycling of vitamin E in
1127 human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992.
1128

- 1129 KEFER, J., AGARWAL, A. AND SABANEH, E. (2009) Role of antioxidants in the
1130 treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, 16, 449-457.
1131
- 1132 KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. (1993) - Evaluation of spermatological
1133 parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet Scand** 34: 299-
1134 303.
1135
- 1136 KNAPEN, M.F.C.M; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; et al. Glutathione
1137 and glutathione-related enzymes in reproduction - A review. **European Journal of**
1138 **Obstetrics & Gynecology**, v. 82, p. 171-184, 1999.
1139
- 1140 KOMMISRUDE, PAULENZ H, SEHESTED E, GREVLE IS, 2002: Influence of boar
1141 and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored
1142 for five days. **Acta Vet.Scand.**43 49-55.
1143
- 1144 KUSTER C, 2005: Sperm concentration determination between hemacytometric and
1145 CASA systems: why they can be different. **Theriogenology** 64 614-617.
1146
- 1147 LEAHY T, GADELLA BM, 2011: Capacitation and capacitation-like sperm surface
1148 changes induced by handling boar semen. **Reprod.Domest.Anim.** 46 7-13.
1149
- 1150 LIMA-VERDE, I.B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e ao embrião
1151 mamífero. **Medicine Veterinaria Recife**, v.1, n.1, p. 81-88, 2007.
1152
- 1153 LOPES S, JURISICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: potential
1154 cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Hum Reprod** 1998;13: 896-900.
1155
- 1156 LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes.**Biology**
1157 **Reproductive**,5, p. 5-17, 2005.
1158
- 1159 LUCK MR.The gonadal extra-cellular matrix. **Oxf Rev Rep Biol**, v.16, p.33-85, 1994
1160
- 1161 M.A.; OSCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R. Antioxidant activity
1162 and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of**
1163 **the American Oil Chemist's Society**, v.52, n.6, p.174-178, 1975.
1164
- 1165 MACLEOD J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human
1166 spermatozoa.**Am J Physiol**, v.138, p.512-518, 1943.
1167
- 1168 MAES D, LOPEZ R.A, RIJSSELAERE T, VYT P AND VAN S.A (2011). Artificial
1169 Insemination in Pigs, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr. MiladManafi (Ed.),
1170 ISBN: 978-953-307-312-5,**InTec**.
1171
- 1172 MAES, D.; NAUWYNCK, H.; RIJSSELAERE, T.; MATEUSEN, B.; VYT, PH.; DE
1173 KRUIF, A. & VAN SOOM, A. (2008). AI transmitted diseases in swine: an overview.
1174 **Theriogenology**, Vol.70, pp. 1337-1345, ISSN 0093-691X
1175
- 1176 MAIA MS. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio
1177 (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio

1178 (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
1179 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
1180
1181 MARTIN RILLO S, MARTINEZ E, GARCIA-ARTIGA C, DE ALBA C, 1996: Boar
1182 semen evaluation in practice. **Reprod. Dom. Anim.** 31 519-526.
1183
1184 MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1997) - Membrane status of boar spermatozoa
1185 after cooling or cryopreservation. **Therio** 48: 209-219.
1186
1187 MAZUR P, KATKOV, II, KATKOVA N, CRITSER JK. The enhancement of the
1188 ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high
1189 concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane
1190 preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. **Cryobiology** 2000;40: 187-
1191 209.
1192
1193 MCKENZIE E.E., 1931.A method for collection boar semen. **J Am Vet Assoc** 78
1194 (News series 31), 244-246.
1195
1196 MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, AT.D.; RODRIGUES, J.L. (2002) -
1197 Current status of cryopreservation: why isn't it better? **Therio** 57: 327-344.
1198
1199 MILLAR J. Vitamin C-the primate fertility factor? **Med Hypotheses** 1992; 38:292-
1200 295.
1201
1202 MORTIMER, D. Sperm preparations methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p.
1203 357-366, 2000.
1204
1205 MURGAS, L. D. S. et al. Crioconservación espermática en la especie porcina: estudio de
1206 dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: Congresso Brasileiro da
1207 Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 10., Porto Alegre, 2001.
1208 **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001.
1209
1210 NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L.J. Oxidation of α -tocopherol model compound by
1211 superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.
1212
1213 NORDBERG J, ÁRNER ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the
1214 mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.
1215
1216 OCHOA, G.; ACOSTA, M.J.; RUEDA, M.; ORTEGA, R. Evaluación de sêmen
1217 porcino conservado endiluyentes de larga duración. Pruebas in vitro. **Rev. Comput. De**
1218 **Prod. Porc.** 13: 239-245. 2008.
1219
1220 O'FLAHERTY C, BECONI M, BEORLEGUI N. Effect of natural antioxidants,
1221 superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull
1222 spermatozoa. **Andrologia** 1997;29: 269-275.
1223
1224 PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at
1225 different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reprod. Domest. Anim.** 35:
1226 83- 87. 2000.
1227

1228 PEÑA, F. J. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility
1229 and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of
1230 the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 85–98, 2003.
1231

1232 PEREZ-LLANO B, GONZALEZ JL, CLEMENTE MJ, GARCIA-CASADO P. 1999.
1233 El test de endosmosis (HOST) en semen de ganado porcino. **Albeitar**; 30:16-17
1234

1235 PEREZ-LLANO B; GARCIA-CASADO P; LORENZO JL; SANCHEZ-SANCHEZ R.
1236 1998. Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and
1237 ORT results. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9/Julio, Abstr. 69
1238

1239 PETRUNKINA AM, HARRISON RA, 2010: Systematic misestimation of cell
1240 subpopulations by flow cytometry: a mathematical analysis. **Theriogenology** 73 839-
1241 847.
1242

1243 PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a
1244 review. **J Eq Vet Sci, Wildomar - California**, v. 7, n. 5, p. 289-302, 1987.
1245

1246 POLGE C., 1956. Artificial insemination of pigs. **Vet Rec** 68, 62-76.
1247

1248 PRATHALINGAM NS, HOLT WW, REVELL SG, JONES S, WATSON PF, 2006:
1249 The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration.
1250 **J. Androl.** 27 257 262.
1251

1252 PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar
1253 spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, n.2, p.278-
1254 283. 1972.
1255

1256 QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. (1980) - Evidence that phospholipid
1257 protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **J ReprodFertil**
1258 60: 403-407.
1259

1260 RAIJMAKERS, M.T.M.; ROELOFS, H.M.J.; STEEGERS, E.A.P.; et al. Glutathione
1261 and glutathione s-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in
1262 protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1,
1263 p. 169-172, 2003.
1264

1265 REZK, B. M.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER VIJGHA, W.J.F.; BAST, A. The
1266 extraordinary antioxidant activity of vitamin E
1267 phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1683, p. 16– 21, 2004.
1268

1269 RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, MAES D, DE KRUIF A, 2003: Effect of technical
1270 settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne
1271 analyzer. **Theriogenology** 60 1553-1568.
1272

1273 ROCA J, CARVAJAL G, LUCAS X, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, 2003: Fertility
1274 of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-
1275 thawed spermatozoa. **Theriogenology** 60 77-87.
1276

1277 ROCA J, PARRILLA I, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, GIL MA, CUELLO C,
1278 VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, 2011: Approaches towards efficient use of boar
1279 semen in the pig industry.
1280
1281 RODIN I.M., LIPATOV V.I., 1935. Artificial insemination of pigs. **Anim Breed Abstr**
1282 4, 205.
1283
1284 RODRIGUEZ-MARTINEZ H, 2003: Laboratory semen assessment and prediction of
1285 fertility: still utopia. **Reprod. Domest. Anim.** 38 312-318.
1286
1287 RUEDA, M.; PERDIGÓN, T.; MENDOZA, D.; BENÍTEZ, J.A.; LEMUS, C.; TOSAR,
1288 M. Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano Dicip.
1289 **Rev. Comput. Prod. Porc.** 16: 26-30. 2009
1290
1291 SAACKE RG, 2008: Sperm morphology: Its relevance to compensable and
1292 un-compensable traits in semen. **Theriogenology** 70 473-478.
1293
1294 SALEH, R. AND AGARWAL, A. (2002) Oxidative stress and male infertility: From
1295 research bench to clinical practice. **J Androl**, 23, 737-752.
1296
1297 SARLOS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative
1298 evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen.
1299 **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
1300
1301 SAYRE LM, PERRY G, SMITH MA. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem Res**
1302 **Toxicol**, v.21, p.172-188, 2008.
1303
1304 SCHEID, I.R. Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen.
1305 **Suíno&Cia**, v.2, p. 25-31, 2003.
1306
1307 SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; PARRISH, D.R.; SAUCY, G. 6-
1308 Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil**
1309 **Chemist's Society**, v.51, p.200-203, 1974.
1310 SEBRELL WH, HARRIS RS. The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology and
1311 Methods, Vol. 1. New York: Academic Press; 1967: 305-320.
1312
1313 SEVERO, C. K. Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para a inseminação
1314 em suínos. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade
1315 Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul
1316
1317 SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility
1318 [review]. **Urology** 1996;48:835–50.
1319
1320 SIKKA SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted
1321 reproductive technology. **J Androl**, v.25, p.5-18, 2004.
1322
1323 SILVA, L. D. M. DA.; SILVA. A. R.; CARDOSO, R. DE C. S. EM: GONSALVES, P.
1324 B. D.; FIGUEREDO. J. R. DE.; FREITAS, V. J. DE. F. (Eds). Biotécnicas aplicadas à
1325 reprodução animal. São Paulo: Varela, 2002.
1326

1327 SIMMET, C. Kältephysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in
1328 ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate. Hannover,
1329 1993. (Dissertation). Tierärztliche Hochschule, Hannover
1330

1331 STEDMAN, T.L. Stedman: dicionário médico. 27^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara
1332 Koogan, 2003. 2196p.
1333

1334 TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells.
1335 **Gynecological Endocrinology**, v.26, n.8, p. 563–567, 2010.
1336

1337 TEJERINA F, BURANAAMNUAY K, SARAVIA F, WALLGREN M, RODRIGUEZ-
1338 MARTINEZ H, 2008: Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar
1339 spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology** 69 1129-1138.
1340

1341 TSAKMAKIDIS, I.; LYMBEROPOULOS, A. & KHALIFA, T. (2010). Relationship
1342 between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. **Journal of Veterinary**
1343 **Science**, Vol.11, pp. 151-154, ISSN 1229-845X
1344

1345 VALENÇA, R.M.B e GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a
1346 utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de**
1347 **Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.47-53, 2007.
1348

1349 VYT P, MAES D, DEJONCKHEERE E, CASTRYCK F, VAN SOOM A, 2004b:
1350 Comparative study on five different commercial extenders for boar semen.
1351 **Reprod.Domest.Anim.** 39 8-12.
1352

1353 VYT P, MAES D, RIJSSELAERE T, DEWULF J, DE KRUIF A, VAN SOOM A,
1354 2007a: Semen handling in porcine artificial insemination centres: the Belgian situation.
1355 **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift** 76 195-200.
1356

1357 VYT, P. et al. Comparative study on five different commercial extenders for boar
1358 semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2004.
1359

1360 VYT, PH. (2007). Examination and storage of liquid porcine semen. PhD thesis, Ghent
1361 University, pp. 156, ISBN 978-90-586-4121-2
1362

1363 WABERSKI D, HENNING H, PETRUNKINA AM, 2011a: Assessment of storage
1364 effects in liquid preserved boar semen. **Reprod.Domest.Anim.** 46 45-48.
1365

1366 WABERSKI, D.; PETRUNKINA A. & TÖPFER-PETERSEN E. (2008). Can external
1367 quality control improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, Vol.70, pp. 1346-1351,
1368 ISSN 0093-691X
1369

1370 WALTERS AH, EYESTONE WE, SAACKE RG, PEARSON RE, GWAZDAUSKAS
1371 FC, 2005a: Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal
1372 morphology. **Theriogenology** 63 1925-1937.
1373

1374 WATSON, P.F. (1975b) - Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen
1375 ram spermatozoa. **Vet Rec** 97: 12-15.
1376

1377 WATSON, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of
1378 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **ReprodFert Dev** 7:
1379 871-891.
1380
1381 WATSON, P.F.. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: RATH, D.,
1382 JOHNSON, L.A., , K.F. Eds., Boar Semen Preservation III. Proceeding of 3rd
1383 International Conference in Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August,
1384 1995. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.135-140, 1996.
1385
1386 WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M.The response of boar sperm membranes to cold
1387 shock and cooling. In: International Conference On Deep Freezing Of Boar Semen 1,
1388 1985, Uppsala. Proceedings... Uppsala, Swedish University of Agriculture Sciences v.
1389 1, 1985, p.113-127.
1390
1391 WEITZE, K.F. Update on the worldwide application of swine AI. In: International
1392 Conference On Boar Semen Preservation. 4., 2000, Beltsville, Maryland USA.
1393 Proceedings... Beltsville, p.141-145. 2000.
1394
1395 WHITE IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shok and
1396 preservation:a review. **ReprodFertil Dev**, v.5, p.639-658, 1993.
1397
1398 WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality.
1399 **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 1.p.145-164. 1991.
1400
1401 YANAGIMACHI R. 1993. Mammalian Fertilization. In: Knobil E (Eds) Phisiology of
1402 Reproduction. Raven Press, NY; pp. 189-317.
1403
1404 YOUSEF MI, AWAD TI, ELHAG FA, KHALED FA. Study of the protective effect of
1405 ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant
1406 enzymes and biochemical parameters in rabbits.**Toxicology**, v.235, p.194-202, 2007.
1407
1408 ZANEVELD LJD; JEYENDRAN RS; 1990. Hypoosmotic swelling test. In: Handbook
1409 of the laboratory Diagnosis and treatment of infertility. Keel, BA; Webster BW (eds.).
1410 CRC Press, Boca Raton, pp. 91-110.
1411
1412 ZINI A, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Low levels of nitric oxide promote human
1413 sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1996;16:424– 31.
1414

1415

1416

1417

1418

1419

1420

1421

Capítulo II

1422 VIABILIDADE DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO A 15 °C ADICIONADO DE
1423 ANTIOXIDANTES

1424

Resumo

1425

1426 Os antioxidantes são importantes para preservar as células contra danos oxidativos.
1427 Diante disto, objetivou-se avaliar as características do sêmen suíno resfriado a 15°C
1428 adicionado de antioxidantes: Vitamina C, Trolox e Glutationa ao diluente. O sêmen de
1429 seis reprodutores foi coletado por meio da técnica da mão enluvada utilizando
1430 manequim fixo. Foi acrescentado ao diluidor MR- A[®]: 200 µM/mL de Vitamina C, 200
1431 µM/mL de Trolox e 2,5 mM/mL de Glutationa e um grupo controle, totalizando quatro
1432 tratamentos iniciais. No laboratório as amostras foram submetidas aos testes de
1433 motilidade e vigor, teste de eosina-nigrosina, teste de reação acrossomal Giemsa-Azul
1434 de tripan e teste hiposmótico (HOST) durante o período de conservação (D0 a D3).
1435 Após 30 h de armazenamento, cada tratamento foi dividido, sendo adicionado mais uma
1436 concentração de Vitamina C, Trolox e Glutationa, no respectivo tratamento, totalizando
1437 sete tratamentos finais. Dos antioxidantes testados observou-se que a Glutationa
1438 apresentou melhor resposta a partir das primeiras 24 h em relação ao grupo controle
1439 sobre a motilidade espermática, porém não houve diferença ($p>0,05$) entre os
1440 tratamentos quanto ao vigor espermático. Para o teste eosina-nigrosina, não houve
1441 diferença ($p>0,05$) entre tratamentos dentro de tempo. Sobre o teste HOST, a adição de
1442 antioxidantes ao diluidor não influenciou a integridade da membrana plasmática.
1443 Quanto ao teste Giemsa/Azul de trypan, o tratamento com a Glutationa apresentou
1444 maior número de espermatozoides vivos com a preservação do acrossoma em relação ao
1445 grupo controle. Após receberem a segunda dose de antioxidante a Vitamina C, o Trolox
1446 e a Glutationa foram comparados aos tratamentos que não receberam a dose adicional,
1447 em relação à motilidade houve diferença ($p<0,05$) no terceiro dia (D2), a não adição
1448 apresentou melhor resposta. Aos demais testes, não houve efeito de adicionar ou não
1449 uma segunda dose de antioxidantes. Desta forma, a adição dos antioxidantes ao diluente
1450 não apresentou resultados significativos sobre os parâmetros analisados, exceto sobre a
1451 motilidade espermática e integridade do acrossoma, em que o tratamento utilizando a

1452 Glutathione apresentou melhor resposta. A adição da segunda dose de antioxidantes
1453 mostrou-se inviável em todos os parâmetros avaliados.

1454 **Palavras-chave:** resfriamento, antioxidantes, espermatozoides, varrão.

1455
1456

Abstract

1457 Antioxidants are important to protect cells against oxidative damage. Given this, aimed
1458 to evaluate the semen characteristics swine cooled to 15 ° C by adding antioxidants
1459 Vitamin C, Trolox and Glutathione the diluent. Semen was collected six players from the
1460 gloved hand technique and use of fixed dummy. Was added to the extender MR-A®:
1461 200 µM/mL of vitamin C, 200 µM/mL of Trolox and 2.5 mM/ml of Glutathione and a
1462 control group, a total of four initial treatments. In the laboratory the samples were
1463 submitted to motility and vigor tests, eosin-nigrosine test, acrosome reaction test
1464 Giemsa- trypan blue and hiposmotic test (HOST) during the retention period (D0 to
1465 D3). After 30 h storage was added over a concentration of vitamin C, Trolox and
1466 Glutathione final total of seven treatments. Antioxidants tested was observed that
1467 glutathione showed better response from the first 24 h in the control group on sperm
1468 motility, however there was no difference ($p > 0.05$) between treatments on the sperm
1469 vigor. For the eosin-nigrosine test, there was no difference ($p > 0.05$) between treatments
1470 in time. On the HOST test, the addition of antioxidants to the extender did not affect the
1471 integrity of the plasma membrane. As the Giemsa/trypan blue test was no effect in
1472 treatment of stroke, treatment with glutathione had a higher number of live sperm with
1473 the preservation of the acrosome in the control group. After receiving the second dose
1474 of antioxidant vitamin C, glutathione, and Trolox were compared to treatments without
1475 additional dose motility relative difference ($p < 0.05$) on the third day (D2), adding the
1476 non-had a better response. The other tests, no effect of adding or not a second dose of
1477 antioxidants. Thus, the addition of antioxidants to the diluent showed no significant
1478 results on the analyzed parameters, except on sperm motility and acrosome integrity,
1479 wherein the treatment using glutathione showed a better response. The addition of the
1480 second dose of antioxidants was not viable in all parameters.

1481 **Keywords:** cooling, antioxidants, sperm, boar.

1482

1483 **1. Introdução**

1484 A inseminação artificial é a técnica da reprodução mais utilizada na suinocultura
1485 moderna por trazer diversas vantagens, entre elas, os ganhos advindos da melhoria
1486 genética como sendo a de maior relevância. A manutenção do sêmen suíno refrigerado
1487 tem se mostrado eficiente para propagação do material genético, porém seu uso fica
1488 normalmente restrito por um período médio de 3 dias de armazenamento (Castagna et
1489 al., 2001; Bortolozzo et al., 2005).

1490 O tempo de armazenamento e as baixas temperaturas em que os espermatozoides
1491 ficam submetidos causam alterações às células que determinam a redução da fertilidade.
1492 Durante a manipulação, o sêmen é exposto ao oxigênio e pode promover o aumento da
1493 produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) que quando em excesso induzem a
1494 peroxidação lipídica, causando queda irreversível na motilidade espermática e
1495 alterações de proteínas e ácidos nucleicos destas células, além de estimular a morte
1496 celular (Maia, 2003; Mahadevan et al., 1997; Erenpreiss et al., 2006).

1497 O sêmen suíno é um dos mais sensíveis a flutuações de temperatura,
1498 principalmente quando o sêmen *in natura* é resfriado rapidamente. O ideal para o
1499 armazenamento das doses inseminantes é em torno de 15° a 18° C, sendo que
1500 temperaturas inferiores a 15 °C causam choque térmico, havendo significativa redução
1501 da motilidade, e temperaturas superiores a 18 °C reduzem o metabolismo dos
1502 espermatozoides favorecendo a multiplicação de bactérias, que afeta negativamente na
1503 qualidade do sêmen. (Corrêa et al., 2001; Scheid, 2003).

1504 A possibilidade de usar o sêmen por tempo superior a 48 h e manter sua
1505 qualidade é fundamental para o sistema produtivo. Por essa razão, pesquisas com
1506 diversas substâncias adicionadas aos diluidores têm sido desenvolvidas, com o objetivo
1507 de amenizar o efeito negativo da temperatura durante o resfriamento do sêmen e
1508 prolongar o tempo de estoque de três dias para cinco ou sete dias (Murgas et al., 2001).

1509 Dentre essas substâncias estão os antioxidantes, formados por enzimas,
1510 vitaminas, minerais e outros compostos vegetais, capazes de proteger os sistemas
1511 biológicos, retardando a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. A adição
1512 dessas substâncias ao diluidor objetiva auxiliar na capacidade de atuar como inibidores
1513 de radicais livres protegendo os espermatozoides contra os efeitos das EROs (Stedman,
1514 2003; Pietta, 2000; Jordão Júnior et al., 1998; Agarwal e Prabakaran, 2005).

1515 O espermatozoide apresenta naturalmente um sistema antioxidante, intra e
1516 extracelular, constituído de um sistema de defesa enzimático e não enzimático
1517 responsável por combater o estresse oxidativo e a lipoperoxidação. Pertencendo ao
1518 grupo dos enzimáticos estão o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e
1519 glutathione peroxidase (GPX). Em adição, o sêmen contém uma variedade de
1520 antioxidantes não enzimáticos como a vitamina E, vitamina C, urato, piruvato, taurina e
1521 hipotaurina. (Sanocka e Kurpisz, 2004; Silva et al., 2011; Aitken,1995; Agarwal e Saleh
1522 2002).

1523 Contudo, durante o processamento do sêmen destinado ao armazenamento,
1524 ocorre um comprometimento da capacidade protetora a partir da redução da
1525 concentração de antioxidantes presentes no ejaculado após a diluição ou remoção do
1526 plasma seminal (Sarlós et al., 2002; Guerra et al., 2004). Desta maneira, a fim de
1527 melhorar a qualidade seminal, objetivou-se avaliar características do sêmen suíno
1528 resfriado a 15° C adicionado dos antioxidantes Vitamina C, Trolox e Glutathione ao
1529 diluente.

1530 **2. Material e Métodos**

1531 **2.1 Local**

1532 O experimento foi realizado, primeiramente, na suinocultura comercial–
1533 AGROLUSA, localizada no município de São Luís – MA (2°35'S; 44°12'W) para coleta
1534 e análises iniciais. Após execução da primeira etapa, o sêmen foi levado ao laboratório
1535 de Reprodução Animal do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do
1536 Maranhão - UEMA para a realização dos testes funcionais.

1537

1538 **2.2 Animais e Coleta**

1539 O sêmen de seis reprodutores mestiços (Landrace x Large White), com idades
1540 entre 2 e 4 anos, mantidos em sistema de confinamento, foi coletado em um período de
1541 10 semanas alternadas por meio da técnica da mão enluvada e utilização de manequim.
1542 A colheita foi realizada em um recipiente plástico com capacidade de 500 mL,
1543 previamente aquecido a 37 °C, a fim de evitar choque-térmico e alterações das
1544 características do sêmen. Após separação da fração gelatinosa do ejaculado e para
1545 controle efetivo do sêmen utilizado, foram avaliados o aspecto físico (volume – mL, em

1546 balança) e microscópico (concentração – espermiodensímetro, motilidade espermática -
1547 %, e vigor – 0 a 5), segundo CBRA (1998).

1548 A motilidade e vigor foram avaliados subjetivamente, na qual se observou a
1549 porcentagem de espermatozoides em movimento. Esta avaliação foi realizada em
1550 microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Para tal, colocou-se uma gota de sêmen
1551 (10µL) entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas, avaliando-se o percentual de
1552 células móveis, enquanto que o vigor, o qual determina a velocidade que as células
1553 atravessam o campo, foi classificado em escalas 0 a 5, sendo 0 a intensidade fraca e 5 a
1554 intensidade máxima.

1555 A morfologia espermática foi realizada através da amostra diluída, conservada em
1556 solução de formol-salina. Estimou-se o percentual de células normais e patológicas sob
1557 microscopia de contraste de fase (Microscópio Nikon Eclipse 50i), com aumento de
1558 1000x, contando-se 100 células.

1559

1560 **2.3 Diluição**

1561 A diluição foi realizada no laboratório da empresa suinícola em banho-maria à
1562 temperatura de 37° C, utilizando o diluidor comercial MR-A[®], atingindo uma
1563 concentração de 30×10^6 sptzs/mL, para que tanto o sêmen quanto os diluidores
1564 estivessem na mesma temperatura. Foi obtida uma amostra de 40 mL de sêmen diluído,
1565 dividido em quatro tubos de ensaio, identificados quanto ao tipo de antioxidante a ser
1566 adicionado e o animal coletado, totalizando quatro tratamentos iniciais.

1567 Após avaliação da motilidade espermática, o sêmen foi transportado até o
1568 Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão em
1569 embalagem isotérmica. No laboratório, foram adicionados aos tubos 200 µM/mL de
1570 Vitamina C, 200 µM/mL de Trolox e 2,5 mM/mL de Glutathione, e um tubo sem
1571 antioxidante (controle). As amostras foram mantidas a 15 °C em uma caixa térmica
1572 dentro do refrigerador, com um termômetro digital acoplado para melhor controle da
1573 temperatura. As amostras foram avaliadas nos dias D0, D1, D2 e D3, sendo o primeiro
1574 dia da coleta considerado o dia zero (D0) e o último, D3.

1575 Após 30 horas de armazenamento, foram adicionados mais uma concentração de
1576 Vitamina C, Trolox e Glutathione aos tubos de cada tratamento, totalizando sete
1577 tratamentos finais, apresentando o seguinte desenho experimental:

D0			
T1 Controle	T2 200 µM/mL de Vitamina C	T3 200 µM/mL de Trolox	T4 2,5 mM/mL de Glutaciona
	D2		
	T5 400 µM/mL de Vitamina C	T6 400 µM/mL de Trolox	T7 5 mM/mL de Glutaciona

1578

1579 **2.4 Análise do sêmen**

1580 Todos os animais passaram pelo teste de motilidade e vigor, teste de eosina
1581 nigrosina, teste de reação acrossomal (Giemsa-Azul de tripan), teste da integridade da
1582 membrana plasmática - teste hiposmótico (HOST).

1583 O teste de motilidade e vigor consistiu em avaliar o sêmen no momento da
1584 diluição e após o período de estabilização no tempo zero de cada dia de avaliação (D0 a
1585 D3). Para tal, seguiu-se os critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de
1586 Reprodução Animal (1998).

1587 A quantidade de vivos e mortos foi determinada através da combinação dos
1588 corantes eosina-nigrosina em esfregaço com o sêmen (10 µL) na proporção 1:1. Por se
1589 tratar de um corante vital, apenas as células mortas são coradas, sendo tingidas de rosa
1590 enquanto as células vivas ficam sem coloração, brancas. A nigrosina é responsável pelo
1591 contraste mais escuro de fundo da lâmina, permitindo a visualização dos
1592 espermatozoides não corados. Para a realização do teste, uma contagem de 100
1593 espermatozoides foi realizada em microscópio de luz, sob aumento de 100x de forma a
1594 diferenciar as células vivas (não coradas) das mortas (coradas).

1595 O teste de integridade do acrossoma e diferenciação de espermatozoides viáveis
1596 foram feitos por meio de uma coloração dupla (Giemsa e Azul de Tripan). A avaliação
1597 consistiu em adicionar 200µL de sêmen diluído de cada tratamento em 200µL de azul
1598 de tripan (0,2%) ficando em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, após esse período
1599 adicionaram-se aos tubos 2mL de DPBS (Dulbecco'sPhosphate-Buffered Saline), os
1600 quais foram levados à centrifuga em uma rotação de 600g por 6 minutos. A cada
1601 centrifugação descartou-se o sobrenadante e homogeneizou-se o pelete com a solução
1602 tampão a fim de obter uma solução com coloração azul claro para realizar o esfregaço.

1603 Feito o esfregaço, o mesmo foi fixado com metanol e incubado por 6 horas em
1604 uma solução de Giemsa a 4%. Após esse período lavaram-se as lâminas com água
1605 corrente, deixando-as secar para realizar as leituras. Usou-se microscopia de contraste

1606 de fase (Microscópio Nikon Eclipse 50i), com aumento de 100x, contando-se 100
1607 células e classificando-as em: vivo com acrossoma (VC); morto com acrossoma (MC);
1608 vivo sem acrossoma (VS) e morto sem acrossoma (MS).

1609 O teste hiposmótico consistiu da adição de 100 µL de sêmen diluído em 2mL de
1610 solução hiposmótica (citrato de sódio + frutose a 150mOsm) e mantidos por 15 minutos
1611 em banho-maria a 37 °C. Após o período de incubação, em 1mL da solução, foram
1612 adicionado 1 mL de formol salino. Dessa nova solução, retirou-se uma alíquota de
1613 10µL, colocando-a em uma lâmina, recoberta por uma lamínula, para realização da
1614 contagem total de 100 células sob microscopia de contraste de fase com aumento de
1615 100x. Os espermatozoides com caudas retas indicavam ruptura de membrana, os que
1616 permaneceram com membrana íntegra apresentaram cauda dobrada e/ou enrolada. O
1617 resultado foi determinado em porcentagem, após a diferença entre a porcentagem de
1618 espermatozoides reativos ao HOST e porcentagem de espermatozoides que
1619 apresentaram patologias de cauda, durante o exame de morfologia espermática, segundo
1620 Melo e Henry (1999).

1621

1622 **2.5 Análise Estatística**

1623 O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas,
1624 onde cada animal representou um bloco e cada dia de análise uma parcela. Utilizou-se o
1625 programa BioEstat 5.0 para comparação das médias encontradas. As variáveis
1626 paramétricas foram avaliadas pela ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de
1627 Tukey, e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Friedman com
1628 significância de 5%. Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de
1629 Shapiro-Wilk e Lilliefors.

1630 **3. Resultados e Discussão**

1631 A concentração média e o volume do ejaculado entre os reprodutores foram de
1632 485×10^6 sptz/mL e 304 mL, respectivamente. O sêmen *in natura* apresentou uma
1633 motilidade média de $88\% \pm 4,47$ e vigor $4,1 \pm 0,22$. Estes valores se mantiveram dentro
1634 dos parâmetros estipulados pela metodologia para utilização do ejaculado.

1635 A motilidade espermática é um dos critérios utilizados para seleção de
1636 reprodutores para os processos de preservação do sêmen, em que segundo Roca et

1637 al.(2006), o percentual de motilidade espermática para criopreservação do sêmen suíno
 1638 deve estar entre 70% e 90%, em seus experimentos estes autores trabalharam com uma
 1639 média de 76% da motilidade dos espermatozoides, conseguindo bons resultados.
 1640 Contudo, outros autores preferem selecionar apenas aquelas amostras que estão acima
 1641 de 80% de motilidade do sêmen fresco (Cordova et al, 2004). O mesmo ocorreu com o
 1642 presente estudo, utilizando sêmen de reprodutores com média de 88% de motilidade.

1643 Em relação a morfologia espermática, os principais defeitos encontrados foram
 1644 de cauda fortemente dobrada ou enrolada, patologia de peça intermediária e gota
 1645 citoplasmática proximal. A média geral de defeitos maiores, menores e totais não
 1646 ultrapassou os valores normais para suínos preconizados pelo CBRA (1998),
 1647 classificados como aptos à reprodução.

1648 Quanto à avaliação da motilidade e vigor espermáticos, não houve diferença
 1649 dentro de tratamento por tempo do teste de termo resistência lento (TTL) (0, 10, 20 e
 1650 30') ($p>0,05$). Desta maneira, os dados foram agrupados por tratamento para serem
 1651 comparados entre os dias (D0, D1, D2 e D3) de avaliação e entre cada um dos
 1652 tratamentos (Controle, Vitamina C, Trolox e Glutaciona). Houve diferença ($p<0,05$)
 1653 dentro dos dias de avaliação dentro de tratamento. No entanto, tal resposta já era
 1654 esperada, uma vez que o tempo de armazenamento tem ação direta sobre tal variável.

1655 Houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos dentre os dias, mas não
 1656 dentro de dia ($p>0,05$) quanto a variável motilidade (Tabela 1). O vigor espermático não
 1657 apresentou diferença estatística ($p>0,05$) (Tabela 2). A partir das primeiras 24 horas de
 1658 observação a glutaciona se destacou apresentando diferença estatística ($p<0,05$) frente
 1659 ao grupo controle.

1660

1661 Tabela 1: Média e desvio padrão do teste de motilidade dos antioxidantes, avaliados nos
 1662 dias D0 a D3.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D0	60±13,35	61,66±12,99	57,92±17,06	63,45±16,69
D1	23,08±17,66 ^b	23,87±17,07 ^{ab}	28,16±19,71 ^{ab}	32,41±17,5 ^a
D2	17,16±13,14 ^b	13,70±14,01 ^{ab}	15,79±14,88 ^{ab}	25,75±16,61 ^a
D3	11,70±11,19 ^b	8,16±8,92 ^{ab}	10,62±10,83 ^{ab}	18,75±12,99 ^a

1663 Letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste Friedman ($p<0,05$).

1664 Tabela 2: Média e desvio padrão do teste de vigor dos antioxidantes, avaliados nos dias
1665 D0 a D3.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D0	2,41±0,58	2,45±0,65	2,41±0,65	2,5±0,64
D1	0,95±0,95	0,83±0,96	1,08±1,10	1,37±0,87
D2	0,75±0,73	0,5±0,72	0,70±0,75	1,04±0,69
D3	0,70±0,80	0,33±0,56	0,58±0,71	0,87±0,79

1666 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Friedman.

1667

1668

1669 Por ser extremamente sensível a redução de temperatura, o sêmen suíno sofre
1670 queda drástica e rápida na motilidade, normalmente é armazenado em temperaturas
1671 entre 15 e 18 °C após a diluição. Neste estudo foi avaliado o sêmen armazenado em
1672 temperatura a 15 °C, ocorrendo oscilações de temperatura (15– 12 °C), assim observou-
1673 se uma elevada redução da motilidade e vigor espermáticos ao longo dos dias de
1674 conservação.

1675 A adição de Vitamina C e Trolox em todos os experimentos não melhoraram a
1676 motilidade progressiva e vigor em relação ao grupo controle (sem adição de
1677 antioxidantes) discordando dos resultados de Peña et al (2003), ao sugerirem que a
1678 adição de trolox (100 a 200 μ M) na congelação de sêmen suíno houve um aumento
1679 significativo na motilidade e velocidade espermática. Da mesma forma, Grossfeld
1680 (2007) relatou que a adição de antioxidantes ao diluidor do sêmen suíno melhora
1681 significativamente a motilidade espermática.

1682 A glutaciona também não apresentou melhora sobre o vigor em todos os
1683 experimentos, porém a partir das primeiras 24h apresentou melhor resposta em relação
1684 ao grupo controle sobre a motilidade espermática, ainda sim não se enquadrando as
1685 exigências mínimas recomendada pelo CBRA(1998). Por ser o principal composto de
1686 tiol não proteico, a glutaciona participa de inúmeras funções celulares, incluindo
1687 transporte de aminoácidos, DNA e síntese de proteínas, a redução de pontes dissulfetos
1688 e proteção contra o estresse oxidativo. Os grupos sulfidrílicos de GSH conferem
1689 proteção contra danos celulares por oxidantes e radicais livres (Irvine,1996).

1690 Segundo os estudos de Gadea (2004) a criopreservação do sêmen suíno está
1691 associada com redução na motilidade e viabilidade espermática. Em contraste, o autor
1692 observando a adição 5mM de GSH na preservação do sêmen suíno a 15° C observou
1693 que não resultou na diminuição da viabilidade espermática. O mesmo não foi

1694 apresentado nos resultados de Whitaker et al., (2008) os quais afirmaram que
 1695 completando 5,0 mM de glutathione (GSH) para descongelamento nos meios de cultura
 1696 diminuiu significativamente a motilidade progressiva do espermatozoide suíno. No
 1697 entanto, os resultados obtidos sobre os antioxidantes devem ser confirmados em estudos
 1698 futuros onde a motilidade espermática devem ser monitoradas por análise assistida por
 1699 computador (CASA).

1700 A quantidade de células espermáticas vivas e mortas determinadas pelo corante
 1701 vital, Eosina-Nigrosina, foi comparada entre si dentro e entre os períodos de tempo. Não
 1702 houve diferença ($p>0,05$) entre tratamentos dentro de tempo comparando-se as médias
 1703 pelo teste de Tukey (Tabela 3).

1704 Para o grupo controle houve diferença ($p<0,05$) entre o momento do Dia 0 e o
 1705 Dia 3. Resultados similares foram apresentados pelos tratamentos com Vitamina C e
 1706 glutathione. Contudo, o Trolox apresentou diferença entre os dias D0, D2 e D3. Isto
 1707 demonstrou que este reagente não conseguiu manter a viabilidade até o último dia sem
 1708 perda significativa. Os dados apresentados divergiram dos encontrados por Peña et al.,
 1709 (2003), que concluíram que o Trolox tem um efeito protetor no espermatozoide e que
 1710 isso influencia a fração do ejaculado. Estes autores relataram que este efeito pode ser
 1711 relacionado com as diferentes composições de plasma seminal entre frações, que pode
 1712 determinar uma sensibilidade inferior a danos oxidativos no teor do sêmen na primeira
 1713 fração do ejaculado. No entanto, no presente experimento segue-se que o antioxidante
 1714 por si só não exerceu efeitos protetores necessários.

1715

1716 Tabela 3: Média e desvio padrão do teste de eosina-nigrosina dos antioxidantes,
 1717 avaliados nos dias D0 a D3.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Trolox	Glutathione
D0	84±13,92 ^a	84,83±11,06 ^a	84±10,73 ^a	84,83±9,86 ^a
D1	63,16±16,90 ^{ab}	67,66±15,06 ^{ab}	62,83±20,36 ^{abc}	65,83±20,70 ^{ab}
D2	54,83±31,33 ^{ab}	59,83±31,95 ^{ab}	56,5±21,65 ^b	57,16±30,82 ^{ab}
D3	46,16±14,95 ^b	49,66±11,41 ^b	49,33±7,25 ^c	51,66±19,49 ^b

1718 Letras distintas na mesma coluna diferem ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

1719

1720 Na tabela 4 estão apresentados os resultados da integridade da membrana
 1721 espermática avaliada pelo teste hiposmótico (HOST).

1722 Tabela 4: Média e desvio padrão do teste hiposmótico (%) das células espermáticas
 1723 submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D0	34,16±9,28	30±11,64	34±15,28	29,33±11,29
D1	23,5±12,80	17,66±11,03	26,33±10,93	22,5±11,92
D2	22,66±3,93	23,16±12,54	24,5±7,09	36,16±25,43
D3	29,83±21,23	26,16±11,19	26±13,02	29,5±16,59

1724 Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre tratamentos e nem dentro de tempo, médias
 1725 comparadas pelo teste de Tukey.

1726

1727 A adição de antioxidantes ao diluidor não influenciou a integridade da
 1728 membrana plasmática, não havendo diferença nem dentro de tempo nem entre
 1729 tratamentos ($p>0,05$), apenas entre animais (Tabela 4). Estes resultados são reafirmados
 1730 pelas declarações feitas por Boe-Hansen (2004), o qual informa que alguns reprodutores
 1731 podem ter melhores características em seu plasma seminal que outros, mesmo com
 1732 variação entre raças.

1733 Estes resultados são muito importantes para o estudo, uma vez que a
 1734 funcionalidade da membrana está correlacionada com a capacidade fecundante dos
 1735 espermatozoides, quando dado a reação do acrossoma, fenômeno de grande importância
 1736 biológica, com consequências importantes em conformidade com o desnudamento do
 1737 oócito e penetração da zona pelúcida (Esteves et al., 2000)

1738 Quanto ao teste Giemsa/Azul de trypan não houve efeito de tratamento dentro de
 1739 tempo, mas houve efeito dentro de tratamento entre tempos, em que o tratamento com a
 1740 Glutaciona apresentou maior número de espermatozoides vivos com a preservação do
 1741 acrossoma no D0, D2 e D3 em relação ao grupo controle (Tabela 5).

1742

1743 Tabela 5: Média e desvio padrão das células espermáticas vivas com acrossoma
 1744 submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D0 a D3.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D0	45,5±17,54 ^c	58±17,81 ^b	51,5±23,27 ^b	67,5±19,27 ^a
D1	42,16±18,01	39,16±24,59	42,33±17,13	48,66±25,03
D2	22,5±14,12 ^b	36±23,13 ^a	36,16±21,93 ^a	39,33±30,34 ^a
D3	19±12,83 ^b	34,33±18,88 ^a	26,66±14,14 ^b	34,33±19,07 ^a

1745 Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

1746

1747 Além da glutathione, os tratamentos com Vitamina C e Trolox apresentaram
 1748 diferenças significativas ao grupo controle, mostrando maior porcentagem de
 1749 espermatozoides não corados pelo corante vital. Diferente dos resultados encontrados
 1750 neste estudo, Araújo et al. (2012) encontraram que a adição de trolox (1000, 2000 e
 1751 3000 μM) ao diluente LPD, não produziu efeito sobre o percentual de espermatozoides
 1752 com acrossoma intacto, apresentando-se semelhante entre os tratamentos durante cinco
 1753 dias de conservação do sêmen suíno. O mesmo ocorreu com a adição de vitamina C
 1754 (2,5, 5 e 10 mM) ao diluidor BTS, em que não apresentou diferença significativa na
 1755 viabilidade e nos parâmetros de integridade acrossômica do sêmen suíno (Breininger et
 1756 al., 2014).

1757 Frente as variáveis analisadas: vivo com acrossoma, vivo sem acrossoma, morto
 1758 com acrossoma e morto sem acrossoma, destacou-se apenas os vivos com acrossoma,
 1759 uma vez que esses espermatozoides vivos com acrossoma intacto são os únicos
 1760 potencialmente aptos ao processo de fecundação (Parrish et al., 1988; Hossepian de
 1761 Lima, 2005). A reação acrossomal segue a capacitação do espermatozoide, processo
 1762 complexo que modifica a composição da membrana plasmática, sensibilizando as
 1763 células espermáticas para induzir fisiologicamente a reação acrossomal, evento
 1764 necessário para a fecundação de óvulos (Siciliano et al., 2008). Desta maneira,
 1765 esperando-se aumentar o número de células não reativas adicionou-se uma segunda
 1766 dose de antioxidante a cada tratamento com o intuito de sobrepor o período de oxidação
 1767 que tais reagentes pudessem ser expostos.

1768 Assim, a Vitamina C, o Trolox e a Glutathione após receberem a segunda dose de
 1769 antioxidante no terceiro dia (D2) foram observadas por mais 48 horas, sendo
 1770 comparadas com as amostras que não receberam a dose adicional. Estes tratamentos não
 1771 apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) dentro de tempo, quanto à motilidade e
 1772 vigor (Tabela 6 e 7).

1773

1774 Tabela 6: Média e desvio padrão do teste de motilidade espermática após dose adicional
 1775 dos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3

Dias	Tratamento com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutathione
D2	4,45±4,10	8,08±6,49	16,29±9,07
D3	5,33±8,74	8,79±11,47	18,5±12,3

1776 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Friedman.

1777

1778 Tabela 7: Média e desvio padrão do teste de vigor espermático após dose adicional dos
 1779 antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3

Dias	Tratamento com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	0,37±0,76	0,62±0,76	0,87±0,74
D3	0,2±0,5	0,5±0,65	1±0,72

1780 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Friedman.

1781

1782 O uso de antioxidantes adicionado após 30 h de armazenamento mostrou-se
 1783 inviável no experimento, uma vez que resultou em baixos ou quase nulos valores nos
 1784 parâmetros de motilidade e vigor espermáticos.

1785 Como não houve diferença entre os tratamentos que receberam a segunda adição
 1786 de antioxidantes, realizou-se a comparação entre os tratamentos que não receberam
 1787 adição dos antioxidantes. Quanto a variável motilidade, houve diferença ($p<0,05$) no
 1788 terceiro dia (D2), a não adição apresentou melhor resposta, sendo a glutaciona sem
 1789 adição o melhor dentre os tratamentos. No quarto dia (D3) houve diferença ($p<0,05$) em
 1790 relação a Vitamina C, sendo que a não adição também apresentou melhor resposta. Não
 1791 houve diferença ($p>0,05$) entre os que receberam e os que não receberam a
 1792 complementação do Trolox e da Glutaciona (Tabela 8).

1793

1794 Tabela 8: Média e desvio padrão do teste de motilidade dos antioxidantes, avaliados nos
 1795 dias D2 e D3.

Dias	Tratamentos sem adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	13,70±14,01 ^a	15,79±14,88 ^a	25,75±16,6 ^a
D3	8,16±8,92 ^b	10,62±10,83 ^b	18,75±12,99 ^b

Dias	Tratamentos com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	4,45±4,10 ^c	8,08±6,49 ^b	16,29±9,07 ^b
D3	5,33±8,74 ^c	8,79±11,47 ^b	18,5±12,3 ^b

1796 Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p<0,05$) pelo teste de
 1797 Friedman.

1798

1799 Quanto ao teste Eosina-nigrosina compararam-se os tratamentos entre os dias de
 1800 avaliação, os quais não apresentaram efeito do tratamento de dose adicional nos dias D2
 1801 e D3 (Tabela 9).

1802

1803

1804 Tabela 9: Média e desvio padrão do teste de eosina-nigrosina nas doses adicionais dos
 1805 antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3.

Dias	Tratamentos sem adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	59,83±31,95	56,5±21,65	57,16±30,82
D3	49,66±11,41	49,33±7,25	51,66±19,49
Dias	Tratamentos com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	55,5±28,87	46±25,41	50,83±30,3
D3	46±13,22	41,83±19,5	52±20,57

1806 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

1807

1808 Na tabela 10 estão apresentados os resultados da integridade da membrana
 1809 espermática avaliada pelo HOST. Não houve efeito de adicionar ou não o antioxidante
 1810 no terceiro e quarto dia de avaliação em cima da integridade da membrana plasmática.

1811

1812 Tabela 10: Média e desvio padrão do teste hiposmótico (%) das células espermáticas
 1813 submetidas aos antioxidantes adicionais, avaliados nos dias D2 e D3

Dias	Tratamentos sem adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	30±11,64	34±15,28	29,33±11,29
D3	17,66±11,03	26,33±10,93	22,5±11,92
Dias	Tratamentos com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	28,16±19,38	24±8,87	25,83±14,07
D3	26,83±25,26	20,83±18,55	23,5±14,37

1814 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

1815 Em relação ao teste Giemsa/Azul de trypan, não houve diferença estatística entre
 1816 os tratamentos sem e com adição de antioxidante no D2 e D3 (Tabela 11).

1817

1818 Tabela 11: Média e desvio padrão das células espermáticas vivas com acrossoma
 1819 submetidas aos antioxidantes, avaliados nos dias D2 e D3.

Dias	Tratamentos sem adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	30±11,64	34±15,28	29,33±11,29
D3	17,66±11,03	26,33±10,93	22,5±11,92
Dias	Tratamentos com adição		
	Vitamina C	Trolox	Glutaciona
D2	28,16±19,38	24±8,87	25,83±14,07
D3	26,83±25,26	20,83±18,55	23,5±14,37

1820 Não houve diferença ($p>0,05$) pelo teste de Friedman.

1821

1822 Esperava-se que a adição das substâncias antioxidantes após 30h de
1823 armazenamento melhorassem a qualidade de alguns parâmetros seminais das amostras
1824 resfriadas, levando-se em consideração o tempo de incubação, uma vez que, durante o
1825 processo de maturação, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma,
1826 limitando a defesa contra o estresse oxidativo e tornando-se dependentes dos
1827 antioxidantes presentes no plasma seminal (Baumber et al., 2005), evidenciando a
1828 importância da utilização dessas substâncias ao meio diluidor.

1829 Não há consenso na literatura para o efeito preventivo de substâncias
1830 antioxidantes adicionados aos diluentes. Alguns estudos citam efeitos positivos,
1831 enquanto outros afirmam que não há nenhum benefício em adicionar tais substâncias
1832 (Ball et al., 2001; Baumber et al., 2005; Gadea et al., 2007; Maia e Bicudo, 2009; Silva
1833 et al., 2009; Oliveira et al., 2013). Divergências dentro da espécie pode ser devido a
1834 variações na idade, raça animal, componentes diluentes, procedimentos de conservação
1835 de sêmen, e combinações de doses dos antioxidantes. No entanto, estudos adicionais são
1836 necessários para avaliar e determinar uma concentração ideal, bem como mais
1837 experiências são necessárias para provar o efeito benéfico destes antioxidantes na
1838 melhoria das taxas de fertilidade de fêmeas inseminadas artificialmente com o sêmen
1839 resfriado.

1840 **Conclusão**

1841 Neste experimento a adição dos antioxidantes ao diluente não apresentou
1842 resultados significativos sobre os parâmetros analisados, exceto sobre a motilidade
1843 espermática e integridade do acrossoma, em que o tratamento utilizando a Glutathione
1844 apresentou melhor resposta.

1845 A adição da segunda dose de antioxidantes mostrou-se inviável em todos os
1846 parâmetros avaliados.

1847 **Referências Bibliográficas**

1848

1849 AGARWAL A, AND SALEH RA. Role of oxidants in male infertility: rationale,
1850 significance, and treatment. **UrolClin North Am** 2002; 29: 817-827.

1851

1852 AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of
1853 oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental**
1854 **Biology**, New Delhi, v. 43, n. 11, p. 963-974, 2005.

- 1855 AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction**
1856 **Fertility and Development**, v. 7, p. 659-68, 1995.
- 1857
- 1858 ARAÚJO, L. R. S; BARROS, T. B.; GUIMARÃES, D.B.; Efeito da adição de trolox ao
1859 diluente leite em pó desnatado durante a conservação do sêmen suíno a 10 °C. 2014,
1860 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará,
1861 Fortaleza, 2012
- 1862
- 1863 BALL BA, MEDINA V, GRAVANCE CG, BAUMBER J. 2001. Effect of antioxidants
1864 on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa
1865 during storage at 5oC. **Theriogenology**, 56:577-589.
- 1866
- 1867 BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of
1868 equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American**
1869 **Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, p. 772–779, 2005.
- 1870
- 1871 BOE-HANSEN, GRY et al. Increasing storage time of extended boar semen reduces
1872 sperm DNA integrity. **Theriogenology**. 2004
- 1873
- 1874 BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.;
1875 WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Inseminação Artificial na
1876 Suinocultura Tecnificada. Suinocultura em Ação. Porto Alegre, RS: Pallotti, 2005. 185p
- 1877
- 1878 BREININGER, E.; BECONI M.T; Ascorbic acid or pyruvate counteracts peroxidative
1879 damage in boar sperm cryopreserved with or without α -tocopherol. **Animal Science**
1880 **Papers and Reports** vol. 32 (2014) no. 1, 15-23
- 1881
- 1882 CASTAGNA, C. D., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Estratégias de inseminação
1883 artificial na suinocultura moderna. In: Congresso Brasileiro de Veterinários
1884 Especialistas em Suínos, 10, Porto Alegre, 2001. Anais... Porto Alegre: EMBRAPA, v.
1885 1, 2001, p.143-150.
- 1886
- 1887 CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e
1888 avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 1996. 65p
- 1889
- 1890 CORDOVA IZQUIERDO, A; PEREZ GUTIERREZ, JF Y MARTIN RILLO S.
1891 Previous phases and after freezing of boar semen in 5 ml straws and fertilizing capacity
1892 of the spermatozoa. Departamento de Produccion Agricola y Animal. Universidad
1893 Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Mexico, 2004.
- 1894
- 1895 CORRÊA MN, MEINCKE W, LUCIA JR T, DESCHAMPS JC. Inseminação artificial
1896 em suínos. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.
- 1897
- 1898 ERENPREISS, J. et al. A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and
1899 clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.
- 1900
- 1901 ESTEVES, S. SHARMA, R.K. THOMAS, A.J. AGARWAL, A. 2000. Effect of swim-
1902 up sperm washing and subsequent capacitation on acrosome status and functional
1903 membrane integrity of normal sperm. *Intfertile*, 45(5): 335-341.

- 1904 GADEA J, GUMBAO D, CÁNOVAS S, GÁRCIA-VÁZQUEZ FA, GRULLÓN LA,
1905 GARDÓN JC. 2007. Supplementation of the dilution medium after thawing with
1906 reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-
1907 thawed bull spermatozoa. **Int J Androl**, 31:40-49.
- 1908
1909 GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. et al. Decrease in glutathione content in boar
1910 sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the
1911 freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 690–701, 2004.
- 1912
1913 GROSSFELD, R. Experiments to improve the quality of sex-sorted fresh and frozen
1914 porcine spermatozoa. 2007. 185p. Tese (Ph.D degree) – Faculty of Agricultural
1915 Sciences – University Göttingen, Germany.
- 1916
1917 GUERRA MMP, EVANS G, MAXWELL WHC (2004). Papel de oxidantes e
1918 antioxidantes na andrologia: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução**
1919 **Animal**, 28, 187-195.
- 1920
1921 HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Controle de qualidade na seleção de espermatozoides
1922 de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica
1923 coloidalmodificada (Percoll®) e iodixanol (Optiprep™). 2005, 214f. Tese (Livre
1924 docência)– Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual
1925 Paulista, Jaboticabal, 2005.
- 1926
1927 Irvine DS. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev Reprod** 1996;1:6–12.
- 1928
1929 JORDÃO JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M; VANNUCCHI,
1930 H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathione reduzida e da Vitamina E.
1931 *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.
- 1932
1933 MAHADEVAN, M. M.; MILLER, M. M.; MOUTOS, D. M. Absence of glucose
1934 decreases human fertilization and sperm movement characteristic in vitro. **Human**
1935 **Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 119–123, 1997.
- 1936
1937 MAIA MS, BICUDO SD. 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
1938 mamíferos: uma revisão. **Rev Bras Reprod Anim**, 33:183-193.
- 1939
1940 MAIA, M. S. Espécies reativas do metabolismo do oxigênio, antioxidantes e função
1941 espermática. 2003. 23p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de
1942 Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP– Botucatu, 2003.
- 1943
1944 MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino.
1945 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- 1946
1947 MURGAS, L. D. S. et al. Crioconservación espermática en la espécie porcina: Estudio
1948 de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: Congresso Brasileiro da
1949 Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 10., Porto Alegre,
1950 2001. Anais... Porto Alegre: ABRAVES, 2001.
- 1951
1952 OLIVEIRA RA, WOLF CA, VIU MAO, GAMBARINI, ML. 2013. Addition of
1953 glutathione to an extender for frozen equine semen. **J Equine Vet Sci**, 12:1148-1152.

- 1954 PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by
1955 heparin. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- 1956
- 1957 PEÑA, F. J. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility
1958 and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of
1959 the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 85–98, 2003.
- 1960
- 1961 PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7
1962 p.1035 1042, 2000.
- 1963
- 1964 ROCA, J. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. Department of Medicine
1965 and animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine. University of Murcia.Spain, 2006.
- 1966
- 1967 SANOCKA D, KURPISZ M (2004). Reactive oxygen species and sperm cells.
1968 **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2, 12-18.
- 1969
- 1970 SARLÓS P, MOLNÁR A, KÓKAI M, GÁBOR G, RÁTKY J (2002). Comparative
1971 evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta**
1972 **VeterinariaHungarica**, 50(2), 235-245.
- 1973
- 1974 SCHEID IR Transportando e armazenando corretamente as doses de semen.
1975 Suino&Cia,n.2, p. 25-31, 2003.
- 1976
- 1977 SICILIANO, L.; MARCIANÒ, V.; CARPINO, A. *et al.* Prostate-like vesicles
1978 stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.6, p.5-
1979 11, 2008
- 1980
- 1981 SILVA KMG, MORAES TAP, SILVA ECB, GAMBOA SC, GUERRA MMP. 2009.
1982 Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do
1983 DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. **ArqBrasMedVetZootec**,
1984 61:42-49.
- 1985
- 1986 SILVA SV, SOARES AT, BATISTA AM, ALMEIDA FC, NUNES JF, PEIXOTO CA,
1987 GUERRA MMP (2011). In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-
1988 yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione.
1989 **Reproduction in Domestic Animals**, 46, 874-881.
- 1990
- 1991 STEDMAN, T.L. Stedman: dicionário médico. 27^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara
1992 Koogan, 2003. 2196p.
- 1993
- 1994 WHITAKER B.D.; CARLE B.;MUKAI T.; SIMPSON A. et al. Effect of exogenous
1995 glutathione supplementation on motility, viability, and DNA integrity of frozen-thawed
1996 boar semen. **Anim. Reprod.**, v.5, n.3/4, p.127-131, Jul./Dec. 2008
- 1997
- 1998
- 1999
- 2000
- 2001
- 2002
- 2003
- 2004

2005
2006
2007

ANEXO



Figura 1: Teste Eosina-nigrosina:
a) espermatozoides vivos
b) espermatozoide morto

2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016

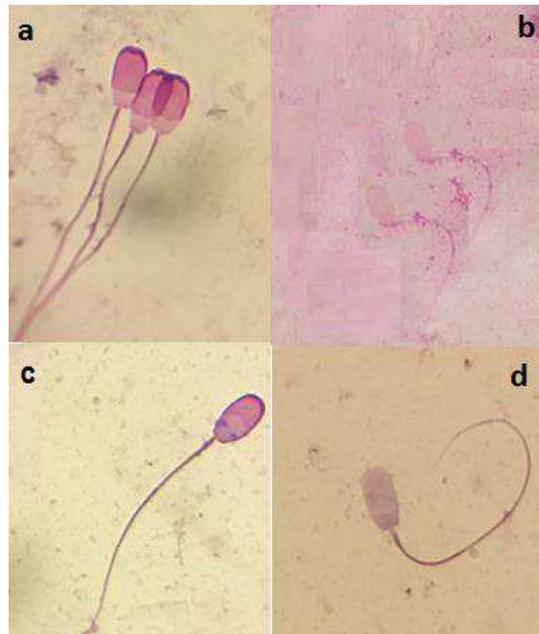


Figura 2: Teste Azul de Tripan/Giemsa:
a) Vivos com acrossoma(VC)
b) Vivo sem acrossoma (VS)
c) Morto com acrossoma (MC)
d) Morto sem acrossoma (MS)

2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025