

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Luara Medianeira de Lima Schlösser

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE
SUÍNOS COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO
ELABORADAS COM A ADIÇÃO DE α -TOCOFEROL**

Santa Maria, RS
2019

Luara Medianeira de Lima Schlösser

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE SUÍNOS COM
MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO ELABORADAS COM A ADIÇÃO
DE α -TOCOFEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi

Santa Maria, RS
2019

Schlösser, Luara Medianeira de Lima
Avaliação da viabilidade de doses inseminantes de
suínos com maior sensibilidade ao resfriamento elaboradas
com a adição de alfa-tocoferol / Luara Medianeira de Lima
Schlösser.- 2019.
60 f.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi
Coorientadora: Marta Lizandra do Rego Leal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Antioxidantes 2. Espermatozoides 3. Reprodução 4.
Suínos I. Rigon Rossi, Carlos Augusto II. do Rego Leal,
Marta Lizandra III. Título.

Luara Medianeira de Lima Schlösser

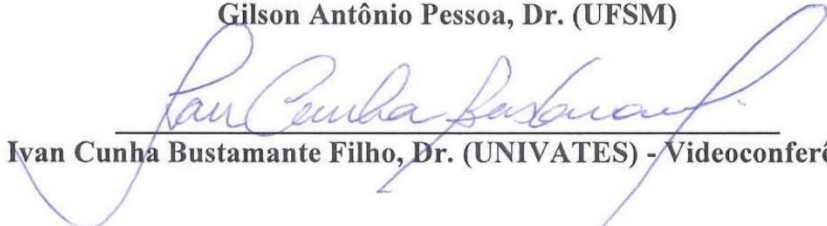
**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE SUÍNOS COM
MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO ELABORADAS COM A ADIÇÃO
DE α -TOCOFEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2019:

**Carlos Augusto Rigon Rossi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Gilson Antônio Pessoa, Dr. (UFSM)



Ivan Cunha Bustamante Filho, Dr. (UNIVATES) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sildo e Giselda, pelo apoio.

Agradeço às minhas irmãs, Camila e Janaina, por serem minha força, minha inspiração e a quem eu devo quem sou. Obrigada por tudo que fizeram e sempre fazem por mim e, por terem me dado meus dois amuletos, Arthur e Kurt. Minhas conquistas são de vocês quatro.

Agradeço aos meus grandes amores, Lucas e Chico, pelo companheirismo de vida. Obrigada Lucas por tudo que fazes por mim, és meu amor e meu melhor amigo; e Chico por ser minha alegria diária, meu ser de luz, que me fortalece a acreditar que o mundo ainda pode ser um lugar de amor.

Agradeço ao meu orientador, Carlos, pela confiança que depositou em mim a seis anos atrás, quando eu ainda estava no curso técnico, obrigada pela tua dedicação, paciência e ajuda em tudo que sempre precisei.

Agradeço ao Cristian pela parceria de anos no ANDROLAB, e também a toda equipe.

Agradeço ao pessoal da ACSURS, Luciano, Patrícia, Kananda, Karina, Vagner e Márcio, pela ajuda e disponibilidade do uso do laboratório e animais da central.

Agradeço à Aline, por ser muito mais que estagiária, mas minha amiga do coração, que a vida me enviou. Já te falei, você foi um dos meus maiores presentes de 2018. Obrigada por ser a pessoa que você é.

Agradeço à Juliana e Taís, pela ajuda nas análises de estresse oxidativo.

Agradeço ao Prof. Dr. Ivan, por disponibilizar o uso do laboratório e as meninas, Tayná e Anna Flávia, para me auxiliarem com as análises de citometria. Vocês foram incríveis, sou imensamente grata.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade em realizar o curso de pós-graduação em uma instituição de referência.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE SUÍNOS COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO ELABORADAS COM A ADIÇÃO DE α -TOCOFEROL

AUTORA: Luara Medianeira de Lima Schlösser

ORIENTADOR: Carlos Augusto Rigon Rossi

O estudo teve por objetivo avaliar a influência da adição do α -tocoferol, a doses inseminantes de suínos, selecionados quanto a sensibilidade ao resfriamento espermático, elaboradas com diluente Androstar[®] Plus e armazenadas a temperatura de 17 °C por até 168 horas. Cinco ejaculados de 24 machos suínos foram analisados quanto a motilidade espermática progressiva (MP) e classificados em grupos, de acordo com a sensibilidade ao resfriamento do ejaculado em: MP <60% em 120 horas (maior), MP \geq 60% em 120 horas e <60% em 168 horas (média), e MP \geq 60% em 168 horas (menor). Em seguida, as doses inseminantes dos animais selecionados quanto a maior sensibilidade ao resfriamento, receberam diferentes concentrações de α -tocoferol: 0 (controle) (T1), 100 μ g/mL (T2) e 200 μ g/mL (T3). A partir disso, foram realizadas análises de motilidade, peroxidação lipídica, integridade de membrana plasmática e acrossomal, e teste de termorresistência (TTR). Em relação à média da MT nos tratamentos avaliados, o T3 se mostrou mais eficaz (85,19%), quando comparado ao grupo controle (82,85%) e T2 (83,67%), respectivamente (P<0,05). Os valores das médias de MP, ML e IM não variaram de forma significativa (P>0,05) entre os tratamentos. As médias de MT e MP regrediram de forma significativa com o passar das horas de armazenamento (P<0,05), e a ML e IM não tiveram diferenças importantes (P>0,05). Nas integridades espermáticas de membrana plasmática e acrossomal, as células espermáticas com acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), diferiram (P<0,05) na média das horas de avaliação, ou seja, houve um aumento acentuado na hora 168 (29,96%) quando comparada a hora 72 (16,33%) da análise. As células espermáticas com acrossoma íntegro e membrana íntegra (AIMI), também diferiram (P<0,05) na média das horas de avaliação. Observamos que na hora 168 houve diminuição das células viáveis quando comparadas a hora 72 (66,04% e 73,06%, respectivamente). A motilidade total (MT), avaliada pelo TTR, que diferiu (P<0,05) no T3 (87,24%), quando comparada ao T1 e T2 (84,43% e 85,22% respectivamente). Na avaliação após os 30 e 120 minutos de incubação a 38°C, houve aumento (P<0,05) na MT (85,02% e 86,24%, respectivamente). Os dados relacionados a tióis totais, tióis não totais e ROS, das DI submetidas aos tratamentos com α -tocoferol, não apresentaram diferenças (P>0,05) entre os tratamentos. Portanto, é possível identificar machos reprodutores suínos com maior sensibilidade ao resfriamento através da metodologia proposta. As doses elaboradas a partir de machos com maior sensibilidade e submetidos a adição de 200 μ g/mL de α -tocoferol mantiveram um bom resultado quanto a motilidade total, porém, não houve este acompanhamento com relação a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e a redução ou manutenção da peroxidação lipídica, ao decorrer do armazenamento a 17 °C por 168 horas.

Palavras-chave: Antioxidantes. Ejaculado. Reprodução. Suínos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE VIABILITY OF INSEMINANTS DOSES OF BOARS WITH SENSITIVITY HIGHER TO COOLING ELABORATED WITH THE ADDITION OF α -TOCOPHEROL

AUTHOR: Luara Medianeira de Lima Schlösser

ADVISER: Carlos Augusto Rigon Rossi

The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of α -tocopherol to inseminating doses of boars, selected for sensitivity to sperm cooling, prepared with Androstar[®] Plus diluent and stored at a temperature of 17°C for up to 168 hours. Five ejaculates of 24 boars were analyzed for progressive sperm motility (PM) and classified into groups, according to the sensitivity to ejaculate in the cooling: PM <60% in 120 hours (greater), PM \geq 60% in 120 hours and <60% in 168 hours (mean), and PM \geq 60% in 168 hours (lower). After, the inseminating doses of the animals selected for the highest sensitivity to cooling received different concentrations of α -tocopherol: 0 (control) (T1), 100 μ g / mL (T2) and 200 μ g / mL (T3). From this, analyzes of motility, lipid peroxidation, plasma and acrosomal membrane integrity, and thermoresistance test (TTR) were performed. In relation to the mean of total motility (TM) in the evaluated treatments, T3 was more effective (85.19%), when compared to the control group (82.85%) and T2 (83.67%), respectively (P <0.05). The mean values of PM, local motility (LM) and fixed cells (IM) did not vary significantly (P > 0.05) between treatments. The mean values of TM and PM regressed significantly with the hours of storage (P <0.05), and LM and IM did not differ significantly (P > 0.05). In spermatic plasma and acrosomal membrane integrity, sperm cells with reacted acrosome and injured membrane differed (P <0.05) in the mean of the evaluation hours, that is, there was a marked increase in hour 168 (29, 96%) when compared to hour 72 (16.33%) of the analysis. Sperm cells with intact acrosome and integral membrane (AIMI) also differed (P <0.05) in the mean of the evaluation hours. We observed that at 168 hours there was a decrease in viable cells when compared to hour 72 (66.04% and 73.06%, respectively). The total motility (TM), evaluated by TTR, differed (P <0.05) in T3 (87.24%), when compared to T1 and T2 (84.43% and 85.22%, respectively). In the evaluation after 30 and 120 minutes of incubation at 38 °C, there was an increase (P <0.05) in TM (85.02% and 86.24%, respectively). The data related to total thiols, non-total thiols and ROS of the DI submitted to α -tocopherol treatments did not present differences (P > 0.05) between the treatments. The doses prepared from boars with greater sensitivity and submitted to the addition of 200 μ g / mL of α -tocopherol maintained a good result regarding total motility, however, there was no such follow-up in relation to plasma and acrosomal membranes integrity, and reduction or maintenance of lipid peroxidation, during storage at 17 ° C for 168 hours. Therefore, it is possible to identify swine breeding males with greater sensitivity to cooling through the proposed methodology. The doses prepared from males with greater sensitivity and submitted to the addition of 200 μ g/mL of α -tocopherol maintained a good result regarding total motility, however, there was no such follow-up in relation to plasma and acrosomal membranes integrity, and reduction or maintenance of lipid peroxidation, during storage at 17 ° C for 168 hours.

Keywords: Antioxidants. Sperm. Reproduction. Boars.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1- Classificação dos ejaculados, de cada animal, segundo os padrões de seleção.	45
Tabela 2- Média \pm erro padrão da motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA, SpermVision [®] , Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), considerando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), motilidade local (ML) e células imóveis (IM), nas horas 24, 72, 120 e 168 de análise.	50
Tabela 3- Média \pm erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossoma por citometria de fluxo, considerando células com acrossoma íntegro e membrana lesada (AIML), acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), acrossoma íntegro e membrana íntegra (AIMI) e acrossoma reagido e membrana íntegra (ARMI), nas horas 0, 72 e 168 de análise.	51
Tabela 4- Média \pm erro padrão de motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA, SpermVision [®] , Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), considerando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), motilidade local (ML) e células imóveis (IM), no teste de termorresistência (TTR), nas horas 72 e 168 de análise.	52
Tabela 5- Média de tióis totais, tióis não totais e espécies reativas de oxigênio (ROS), nas 5 semanas do estudo I, dos machos selecionados.	53
Tabela 6- Média de tióis totais, tióis não totais e espécies reativas de oxigênio (ROS), nas 4 semanas do estudo II, dos machos selecionados.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do α -tocoferol..... 19

MANUSCRITO

Figura 2- Cronograma de execução de experimento (Fase I e Fase II).....46

Figura 3- (A) Avaliação da motilidade progressiva (MP) e (B) Avaliação da motilidade total (MT), por sistema computadorizado (CASA, SpermVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), nas horas 24, 72, 120 e 168 do armazenamento47

Figura 4- Avaliação das integridades de membrana plasmática e acrossomal, por citômetro de fluxo, nas horas 72 e 168 do armazenamento: (A) acrossoma reagido e membrana plasmática lesada (ARML) e (B) acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (AIMI)48

Figura 5- Avaliação da peroxidação lipídica, considerando as células vivas, pela intensidade de fluorescência (a.u.), em citômetro de fluxo.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSURS	Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul
CASA	<i>Computer Assisted Semen Analysis</i>
CIA's	Centrais de Inseminação Artificial
CPS	Central de Produção de Sêmen
C11-BODIPY ^{581/591}	4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3 ^a ,4 ^a -diazas-indacene-3-undecanoic acid
DCFH-DA	2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato
DI	Doses Inseminantes
DTNB	5',5'-ditiobis- (ácido 2- nitrobenzóico)
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
GSH	Glutathiona
IA	Inseminação Artificial
IM	Imóveis
IP	Iodeto de Propídio
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
mL	Mililitros
ML	Motilidade Local
mM	Milimol
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
PSA	<i>Pisum sativum</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TTR	Teste de Termorresistência
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	A CÉLULA ESPERMÁTICA.....	13
2.2	VARIAÇÃO NA SENSIBILIDADE DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO AO RESFRIAMENTO	13
2.3	CÉLULA ESPERMÁTICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	16
2.4	MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	17
2.5	VITAMINA E (α -TOCOFEROL).....	18
2.6	TESTES DE VIABILIDADE NA CÉLULA ESPERMÁTICA	20
2.7	TESTES DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
3	MANUSCRITO - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE SUÍNOS COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO ELABORADAS COM A ADIÇÃO DE α -TOCOFEROL	24
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A capacidade reprodutiva do macho suíno, caracterizada por uma maior produção de leitões nascidos e desmamados por fêmea/ano, é um dos fatores essenciais no retorno econômico numa criação de suínos (WENTZ e BORTOLOZZO, 1998), uma vez que um número pequeno de machos é responsável pela prenhez de um grande número de fêmeas. Com o emprego da inseminação artificial (IA), a importância do cachaço é reforçada, pois apesar da redução no número de machos, cada macho será utilizado sobre um número maior de fêmeas, potencializando a necessidade de doadores de sêmen em quantidade e qualidade adequadas. Assim, a avaliação da capacidade reprodutiva e a qualidade do sêmen são importantes para prevenir a redução na eficiência reprodutiva de rebanhos suínos (RODRIGUEZ-MARTINEZ e ERIKSSON, 2000).

A eficiência reprodutiva em rebanhos se torna cada vez mais dependente da capacidade fecundante dos espermatozoides dos doadores de sêmen em centrais de inseminação artificial (CIAs). O uso do resfriamento de doses inseminantes (DI) de suínos auxilia na preservação das células espermáticas em decorrência da desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND et al., 1994). No entanto, o espermatozoide suíno é particularmente sensível ao resfriamento e pouco resistente a baixas temperaturas (DE LEEUW et al., 1991). Por este motivo, o sêmen utilizado para a IA é, em geral, diluído e armazenado a uma temperatura entre 15 a 18°C (GLOSSOP, 1996).

Há variações na sensibilidade ao processo de resfriamento do sêmen entre machos suínos. Estima-se que 15-20% dos reprodutores que atendem aos padrões pré-estabelecidos de qualidade do ejaculado (>70% motilidade total e <20% defeitos morfológicos), possuem fertilidade sub-otimizada, que resultam em desempenho reprodutivo insatisfatório (ALM et al., 2006). A avaliação rotineira, *in vitro*, da motilidade espermática, desde a diluição inicial pós-coleta até o armazenamento, possibilita o descarte de ejaculados e DI de baixa qualidade e reduzida capacidade fecundante.

A maioria das CIAs, utiliza o descarte destes animais quando começam a apresentar qualidade seminal deficiente por coletas consecutivas ou, as DI produzidas com seus ejaculados, se mantêm viáveis por menor período de tempo em conservadora regulada a 17 °C. Ainda, de acordo com ALM et al. (2006), a produção do “pool” de ejaculados (heterospermicos), também é uma prática comumente utilizada nas centrais de difusão genética. O uso de ejaculados heterospermicos, é de certa forma confiável em melhorar o desempenho

reprodutivo do rebanho, no entanto, não identifica os reprodutores cuja fertilidade está sub-otimizada (POPWELL & FLOWERS, 2004). O uso de DI com ejaculados homospérmicas pode evidenciar tanto machos com baixa fertilidade, como aqueles com fertilidade superior, que passariam despercebidos empregando uso de DI com ejaculados heterospérmicos e com o número tradicional de espermatozoides (FOXCROFT et al., 2008; DYCK et al., 2011).

Devido ao grande número de inseminações efetuadas com sêmen resfriado, na espécie suína, além de conhecer o potencial de fertilidade do macho doador de sêmen, é importante identificar os animais com diferentes sensibilidades espermáticas ao resfriamento. Esta identificação, permitiria o uso de produtos antioxidantes adicionados a doses inseminantes de machos menos férteis e com maior sensibilidade ao resfriamento. Esta, pode ser uma solução prática e viável, a fim de evitar o descarte precoce de machos, o uso de maior número de espermatozoides por dose e, o uso de ejaculados heterospérmicos, que resultam em elevadas repercussões econômicas.

Tem se buscado a melhora da qualidade seminal, por exemplo, através do uso de antioxidantes (via ração ou diretamente na dose inseminante) como forma de prevenir os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS). Os danos provocados pelo excesso das ROS afetam a qualidade espermática como a perda da motilidade de forma irreversível, a inibição da respiração espermática, as lesões ao DNA espermático e mitocondrial e as perdas de enzimas intracelulares, o que interfere na capacidade fecundante do espermatozoide (TONIOLLI, 2012).

Com base nisso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da adição do α -tocoferol, a doses inseminantes de suínos, selecionados quanto a sensibilidade ao resfriamento espermático, elaboradas com diluente de longa ação e armazenadas a temperatura de 17 °C por até 168 horas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CÉLULA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides podem ser divididos em duas estruturas, cabeça e cauda. A cabeça possui o núcleo achatado de forma oval, que abriga a cromatina. Já a extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolve o núcleo (ARRUDA et al., 2005). O acrossoma é fundamental para a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, deve permanecer intacto antes e durante o trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea até que ocorra à ligação com a zona pelúcida. Se a reação acrossômica ocorrer prematuramente haverá queda na fertilidade (SILVA e GADELLA, 2006). A cauda é composta pelo colo e pelas peças intermediária, principal e terminal. O colo é a ligação da cabeça com a cauda, a peça intermediária é a extensão que abriga a bainha mitocondrial e a peça principal é a maior extensão da cauda do espermatozoide, a porção central dessas peças forma o axonema, o conjunto total dessas estruturas é revestido pela membrana plasmática (HASHIDA et al., 2005). A membrana plasmática tem importante papel no controle, fluidez e estabilidade da bicamada lipídica. E está diretamente relacionada com a taxa de capacitação. É responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atua como barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nesta estrutura podem ocasionar perda da homeostase levando a morte celular (RODRIGUEZ-MATINEZ, 2007).

2.2 VARIAÇÃO NA SENSIBILIDADE DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO AO RESFRIAMENTO

Na reprodução, um dos grandes avanços foi a implantação da técnica de IA, difundida amplamente ao longo das décadas de setenta e oitenta e consolidada nos anos noventa. Hoje, mais de 90% das inseminações artificiais, na produção de suínos em todo o mundo, são realizadas com sêmen líquido prolongado e armazenado por um período de até 5 dias (JOHNSON et al., 2000). O processamento de sêmen envolve a diluição espermática, com diluentes de curta ou longa ação em quantidades ideais para cada fabricante, e resfriamento do ejaculado a uma temperatura de armazenamento de 15 a 18 °C.

O resfriamento do sêmen auxilia na preservação de células espermáticas em decorrência da desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND et al., 1994). No entanto, a célula espermática do suíno é particularmente sensível ao resfriamento e pouco resistente a baixas temperaturas. Provavelmente, os danos causados pelo resfriamento, não são devidos a

uma mudança na configuração das proteínas da membrana plasmática, mas podem estar relacionados à composição e organização da bicamada lipídica e às mudanças na fluidez da membrana plasmática (WATSON, 1996). À medida que a temperatura diminui, os fosfolípidios têm sua mobilidade lateral reduzida. Desta forma, pode ocorrer a separação lateral de fases, e as proteínas ficam agrupadas e excluídas dos arranjos hexagonais dos lipídios gelificados, permanecendo em locais onde há lipídios ainda em estado fluido (DE LEEUW et al., 1990). Toda essa modificação torna as membranas mais permeáveis e, existindo íons cálcio no ambiente, eles adentram na célula (BAILEY et al., 2008), induzindo os processos que levam à um processo semelhante à capacitação espermática. Ainda, pode ocorrer um desequilíbrio iônico, com influxo de sódio e zinco e efluxo de potássio e magnésio, levando à interrupção no mecanismo de geração de energia para manutenção do ambiente interno das células (HOOD et al., 1970). Esta sensibilidade tem sido caracterizada por alterações no acrossoma, ruptura da membrana plasmática e nos danos mitocondriais, conduzindo a perda da permeabilidade seletiva da membrana, diminuição da atividade respiratória e da glicólise, e consequentemente diminuição da viabilidade espermática (DE LEEUW et al., 1991).

Estudos mostram que há variações na sensibilidade ao processo de resfriamento do sêmen entre machos suínos, o que podemos chamar de variabilidade individual. Ao avaliar as características espermáticas do ejaculado, MARIANO (1988), encontrou machos com maior e menor sensibilidade espermática ao resfriamento (respectivamente, >50% e <50% de motilidade espermática após 48 horas a 15 °C). Neste contexto, doses inseminantes de doadores, que mantêm a viabilidade espermática por um maior período de tempo, poderiam ser utilizadas em situações estratégicas de inseminação (BORTOLOZZO e WENTZ, 1997). A razão pela qual machos suínos apresentam diferenças na longevidade espermática ainda não está esclarecida. A longevidade, segundo COLENBRANDER e KEMP (2000), é uma qualidade do sêmen que difere entre os ejaculados, podendo também ser uma particularidade do macho. Apesar da constatação da diferença entre machos, em termos de longevidade espermática durante o resfriamento, poucos estudos têm sido realizados para analisar as possíveis causas dessa variabilidade.

Os bons resultados de fertilidade verificados, em alguns casos, após inseminações realizadas com 24 ou mais horas antes da ovulação (UEMOTO, 1999), levam a possibilidade de que estes aspectos poderiam estar relacionados, ao menos em parte, com a maior duração da viabilidade dos espermatozoides de determinados machos no trato reprodutivo feminino. Sob o ponto de vista prático, se mostra interessante realizar estudos para verificar se há ou não correlação entre a duração da viabilidade da célula espermática *in vitro* e *in vivo* (REIS, 2002).

Se essa correlação existir, a utilização de um produto antioxidante adicionado as doses inseminantes de machos com maior sensibilidade ao resfriamento *in vitro*, poderia agregar benefícios quanto aos índices de fertilidade, em casos de intervalos inseminação-ovulação superiores a 24 horas ou para inseminações intrauterinas, com menor número de espermatozoides por dose inseminante.

Outro aspecto relevante é a alta taxa metabólica da célula espermática, a qual necessita de um constante fornecimento de energia. Quando o ejaculado é armazenado ocorre a degradação da glicose e conseqüente a produção de gás carbônico, água e produtos ácidos, como o ácido láctico, alterando o pH do meio e o período de viabilidade espermática. Para diminuir estas e outras alterações do meio e, conseqüentemente, das células, os diluentes utilizados no sêmen, são compostos por tampões, estabilizadores de membrana, quelantes de íons metálicos bivalentes, antimicrobianos, entre outros, na tentativa de prolongar ao máximo a viabilidade do espermatozoide (BORTOLOZZO, 2005).

Atualmente há grupos de diluentes de curta, média e longa duração, conforme o período de tempo que conseguem preservar o sêmen, com manutenção de características espermáticas e fertilidade adequadas. Os diluentes de curta duração preservam o sêmen por um a três dias e são usados principalmente nas granjas que possuem uma central de IA. Nestas, o sêmen é utilizado dentro de 24 horas após a coleta, seja na própria granja ou em granjas próximas. Os diluentes de média duração preservam o sêmen de quatro a cinco dias, e os diluidores de longa duração, preservam o sêmen por sete a dez dias. Estes são utilizados quando o sêmen tem que ser transportado a longas distâncias entre a central de inseminação e a granja.

Independentemente do tipo de diluente empregado para a produção das doses de sêmen, os componentes devem prolongar a vida útil dos espermatozoides através da redução da atividade metabólica, a qual é favorecida pelo armazenamento em baixas temperaturas (BUSSALLEU e TORNER, 2013). Isto pode ser conseguido, preservando os espermatozoides com a adição de diluentes que protegem suas membranas plasmáticas. Pesquisas recentes demonstraram que diluentes de curta ação, aprimorados com proteínas e antioxidantes, podem efetivamente prolongar o armazenamento de sêmen sem comprometer sua qualidade (GACZARZEWICZ et al., 2015).

2.3 CÉLULA ESPERMÁTICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Uma das razões que explicam a diminuição da qualidade do ejaculado de um reprodutor é a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), também chamadas de radicais livres, ou seja, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados (STRYER, 1996). O espermatozoide é um organismo aeróbio, sendo o oxigênio essencial para manutenção de suas funções, porém, ele causa danos quando em altas concentrações (VALENÇA e GUERRA, 2007). Dentro do ejaculado existem duas fontes principais de ROS: o espermatozoide e os leucócitos, com um mecanismo similar de geração de espécies reativas, localizado na membrana celular. Os leucócitos geram ROS durante a fagocitose, com capacidade 100 vezes maior que as células espermáticas, se tornando uma poderosa e perigosa, fonte de ROS com efeito prejudicial sobre função espermática (AITKEN e BACKER, 2002).

Os espermatozoides são muito sensíveis aos danos oxidativos devido ao fato de apresentarem na constituição de suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (POULOS; DARIN-BENNETT; WHITE, 1973), e também pelas baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma. Quando as espécies reativas de oxigênio atacam as duplas ligações associadas aos ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia de peroxidação lipídica é iniciada, a qual, não sendo paralisada, leva a uma perda da permeabilidade da membrana e conseqüentemente da função espermática. Estes danos favorecem a formação de ROS, responsáveis pela redução da viabilidade (HSU et al., 1998), e da motilidade espermática (AITKEN e BAKER, 2002).

A suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, acarreta em danos à estrutura e função das células espermáticas, uma vez que, sob condições oxidativas extremas, os lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos são alvos potenciais das ROS. O primeiro componente da célula espermática atingido pelas espécies reativas é a membrana plasmática, devido à abundância de substrato para a peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2000). A lipoperoxidação danifica a estrutura dos fosfolipídios da membrana plasmática, levando à perda da fluidez e da integridade da membrana (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993). Além dos danos peroxidativos na membrana plasmática, as ROS estão relacionadas a danos ao DNA nuclear, sendo considerado uma das principais causas de fragmentação de DNA nos espermatozoides (DE IULIIS et al., 2009). O metabolismo espermático também é afetado pela

lipoperoxidação devido à depleção de ATP, culminando em redução da motilidade espermática (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1992; GUTHRIE et al., 2008).

Entre as espécies reativas de oxigênio, podem ser citadas as seguintes: radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o radical hidroxila, o mais reativo e prejudicial ao espermatozoide (HALLIWELL, 1991). KUMARESAN et al. (2009), observaram uma diminuição da função espermática e da integridade da membrana associada a altos níveis de peroxidação lipídica, que ocorre durante o período de armazenamento do sêmen. O radical hidroxila (OH^\cdot) é considerado o responsável pelos maiores danos a célula espermática. É formado a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (AGARWAL e PRABAKARAN, 2005). O ânion superóxido (O_2^\cdot) é um radical livre formado de forma espontânea na membrana da mitocôndria a partir de oxigênio molecular adicionado de um elétron. É um metabólito pouco reativo em relação as demais ROS e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo somente no local onde é produzido (NORDBERG e ARNER, 2001). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o radical hidroxila. É gerado a partir da dismutação enzimática do O_2 pela superóxido dismutase, tem meia-vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (NORDBERG e ARNER, 2001).

Por outro lado, as espécies reativas também exercem um papel importante na fertilidade do macho, como nos processos de hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Sendo assim, o mecanismo oxidante/antioxidante deve estar em equilíbrio, pois uma produção controlada de ROS é de vital importância para a sua função normal, enquanto que a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas levam a estresse oxidativo, com impacto negativo na fertilidade (AITKEN et al., 1993).

2.4 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL, 1991). O excesso de radicais livres no organismo é combatido pelos antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta (BARREIROS et al., 2006). A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, para

limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, que pode tanto remover o agente antes da lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (HALLIWELL, 1991), incluídos basicamente em dois sistemas de defesa antioxidante: o enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo, e o não enzimático, fazendo parte deste grupo as vitaminas e outras substâncias, como os flavonoides, licopeno e bilirrubina (VASCONCELOS et al., 2014).

Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. Na neutralização das ROS como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão é constituída por algumas enzimas tais como a glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa, tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione reductase (GSH-Rd) e pela GSH-Px.

A adição de antioxidantes ou agentes quelantes nos diluentes de sêmen suíno (por exemplo: catalase, vitamina E (α -tocoferol), glutathione, hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *butylated hydroxytoluene*), superóxido dismutase e trealose) tanto para o resfriamento, quanto para o congelamento, está sendo amplamente estudada para identificar a real importância que eles possuem para diminuir estes danos oxidativos durante o armazenamento.

2.5 VITAMINA E (α -TOCOFEROL)

A vitamina E representa um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados, com atividade biológica de RRR-alfa-tocoferol, o composto estereoisômero de origem natural com atividade de vitamina E (TRABER e PACKER, 1995). É composta por 8 elementos chamados tocoferóis (alfa, beta, gama, delta, épsilon, zeta, eta e teta), onde o alfa-tocoferol é o mais potente. Constitui-se um dos grupos antioxidantes mais importantes, desempenhando papel fundamental na destruição dos radicais livres. Localiza-se principalmente nas membranas celulares, sendo sua complementação indispensável para impedir a peroxidação lipídica (WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, 1998). O tocoferol suprime a peroxidação lipídica prendendo os radicais peroxila envolvidos na cadeia da peroxidação. Nestas reações, um átomo de hidrogênio é abstraído do grupo OH no tocoferol por um radical peroxila, estabilizando a molécula, e assim, desta maneira interromper a propagação da peroxidação lipídica. Segundo

O mecanismo de ação das espécies reativas e sua influência negativa sobre a fisiologia do espermatozoide em espécies de mamíferos, ainda não foi totalmente elucidado. Entretanto, o conhecimento atual sobre a ação das substâncias antioxidantes e o papel exercido sobre os sistemas de defesa antioxidante do organismo, em particular da célula espermática e do plasma seminal, torna evidente sua ação contra os danos oxidativos. O efeito oxidativo ocasionado pela geração de ROS seria diminuído pela presença de substâncias antioxidantes no plasma seminal ou através de sua adição aos diluentes de sêmen. Porém, os trabalhos têm demonstrado resultados contraditórios referentes a esta atuação sobre a preservação da viabilidade espermática no sêmen fresco e congelado, em virtude da divergência do tipo e da concentração do antioxidante utilizado, assim como seu mecanismo de ação específico referente à proteção de célula espermática (DONELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999). Quais os benefícios da adição de antioxidantes, com menor estresse oxidativo e danos espermáticos, proporcionando a preservação da capacidade fecundante dos espermatozoides, ainda tem que ser melhor determinado nas espécies domésticas (VALENÇA e GUERRA, 2007).

2.6 TESTES DE VIABILIDADE NA CÉLULA ESPERMÁTICA

Técnicas modernas de avaliação da qualidade espermática vêm sendo utilizadas a fim de diminuir a subjetividade dos testes e melhorar a predição da fertilidade do sêmen. Há vários parâmetros que determinam a capacidade fecundante do espermatozoide, dentre eles à avaliação da membrana plasmática, verificando sua funcionalidade e integridade. A integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para função espermática. Somente uma célula intacta é capaz de provocar uma série de alterações no trato reprodutivo da fêmea, o que permite a capacitação e reação do acrossoma, e finalmente a aquisição da capacidade de fecundar um oócito (DE ANDRADE et al., 2007). Para avaliação da integridade de membrana plasmática, existem diversas sondas fluorescentes que funcionam como marcadores. O iodeto de propídio é uma das sondas específicas utilizadas, por se ligar ao DNA quando a membrana está danificada, emitindo uma fluorescência vermelha-alaranjada em microscopia de epifluorescência sob excitação de 536 nm e emissão de 617 nm (DE ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2008). Além da membrana plasmática, outros fatores são essenciais para determinar o sucesso da fecundação. Um deles é a integridade da membrana acrossomal, a qual é indispensável para que ocorra a reação do acrossoma e, outro exemplo é o potencial mitocondrial, o qual influencia diretamente a motilidade. A integridade da membrana acrossomal é importante para que ocorra a

fecundação, já que a reação acrossomal é caracterizada pela liberação de enzimas acrossomais, e é um evento essencial para que o espermatozoide penetre na zona pelúcida e ocorra a fusão com a membrana plasmática do oócito (CELEGHINI et al., 2008). Sua integridade pode ser identificada por diversas técnicas de fluorescência, sendo comumente usada a marcação de uma glicoproteína, como é o caso das lecitinas. Entre essas técnicas, a mais utilizada é a lecitina *Pisum Sativum* (PSA) marcada com o conjugado de isotiocinato de fluoresceína (FITC). A PSA é uma aglutinina de ervilha que se liga à glicoconjugados na matriz acrossomal, especificamente ao açúcar α - manose (DE ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2008). Quando o PSA se ligada ao FITC, o acrossoma danificado é marcado de amarelo esverdeado (CELEGHINI et al., 2008).

A percentagem de reação acrossomal espontânea não é significativamente diferente em machos suínos férteis e subférteis. No entanto, a incidência da reação induzida por progesterona é significativamente menor em animais subférteis comparada com os cachos férteis, sugerindo que a reação acrossomal pode ser um parâmetro para testar fertilidade (HERRERA et al., 2002). As células espermáticas possuem receptores para progesterona na membrana plasmática (FLESCH; GADELLA, 2000). A progesterona é liberada no fluido folicular no momento da ovulação e acredita-se que doses de progesterona induzam a reação acrossomal em muitas espécies de mamíferos. A principal função da mitocôndria nas células vivas é realizar a fosforilação oxidativa e produzir adenosina trifosfato (ATP), fonte energética indispensável para a motilidade espermática (CELEGHINI et al., 2008). O iodeto de 5, 5', 6, 6'-tetracloro 1, 1', 3, 3'- tetraetilbenzimidazolocarboianina (JC-1) tem sido uma das sondas mais comumente utilizada para determinar alteração funcional de mitocôndria (CELEGHINI et al., 2008). Esta sonda é uma carbocianina catiônica lipofílica de baixa toxicidade e boa solubilidade (DE ANDRADE et al., 2007; ARRUDA et al., 2007). Essa molécula existe na forma de monômeros e dependendo do potencial da mitocôndria é capaz de formar agregados. Quando o espermatozoide possui alto potencial de mitocôndria, o JC-1 forma agregados e cora-se de vermelho-alaranjado. As avaliações de integridade de membrana plasmática, membrana acrossomal e potencial mitocondrial podem ser visualizados através da utilização de um citômetro (GILLAN et al., 2005) ou um microscópio de epifluorescência (DE ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2008).

2.7 TESTES DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O método para a mensuração da lipoperoxidação através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método espectrofotométrico, o qual mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios. Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação, ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malondialdeído (MDA). Neste processo duas moléculas de ácido tiobarbitúrico reagem com uma molécula de MDA sob alta temperatura e baixo pH resultando em um cromógeno rosa que pode ser quantificado (NICHI et al., 2007). Porém este método apresenta limitações como a impossibilidade da localização intracelular da peroxidação lipídica em espermatozoides que é de grande interesse para a compreensão do mecanismo básico da peroxidação relacionado à sub ou infertilidade, dificuldade em demonstrar se as ROS observadas em amostras de células espermáticas são produzidas por uma pequena população que está sofrendo danos oxidativos ou se todas as células contribuem igualmente para a formação de ROS e pela possibilidade dos intermediários formados durante a peroxidação lipídica reagirem com outras moléculas biologicamente relevantes além do TBARS (BROUWERS e GADELLA, 2003). Como alternativa para a avaliação da lipoperoxidação algumas sondas fluorescentes lipofílicas vêm sendo utilizada. A C11-BODIPY^{581/591} é um análogo de ácidos graxos que se incorpora facilmente à membrana celular do espermatozoide e mimetiza a reação de peroxidação sofrida pelo ácido graxo poliinsaturado. Apresenta propriedade fluorescente nas faixas vermelha e verde do espectro de visibilidade e frente à oxidação induzida por radicais livres, sua fluorescência muda do vermelho para o verde. A avaliação pode ser feita através de microscopia de epifluorescência (PAP et al., 1999) ou citometria de fluxo (SILVA et al., 2007). Esta sonda tem sido usada com sucesso em experimentos para avaliação da lipoperoxidação em espermatozoides de suínos (NEILD et al., 2005; GUTHRIE, et al., 2008) e também outras espécies.

Como marcadores de estresse oxidativo, pode-se utilizar as espécies reativas de oxigênio totais (ROS totais), tióis totais (T-SHs) e tióis não-proteicos (GSH). Os compostos tiólicos são antioxidantes que contêm em sua estrutura o grupamento SH, entre estes compostos estão a glutatona e as proteínas tiólicas. Esses compostos estão envolvidos no sequestro de radicais livres e são capazes de quelar íons metálicos danosos, desempenhando assim um papel importante na defesa antioxidante. A glutatona (GSH) $C_{10}H_{17}N_3O_6 S$, M.M 307 g mol⁻¹), representada pelos tióis não proteicos, é um tripeptídeo que exerce funções essenciais na célula, destacando sua função como cofator da família de enzimas glutatona peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutatona (GSSG) ($C_{20}H_{32}N_6O_{12} S_2$, Mr 612,6 g/mol). É um tampão redox

sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila de proteínas no estado reduzido. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ROS (VASCONCELOS et al, 2014).

3 MANUSCRITO - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE DOSES INSEMINANTES DE SUÍNOS COM MAIOR SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO ELABORADAS COM A ADIÇÃO DE α -TOCOFEROL

Avaliação da viabilidade de doses inseminantes de suínos com maior sensibilidade ao resfriamento elaboradas com a adição de α -tocoferol

Evaluation of the viability of inseminants doses of boars with sensitivity higher to cooling elaborated with the addition of α -tocopherol

Luara Medianeira de Lima Schlösser^I Cristian Guilherme Gräf^I Rodrigo Dalmina Rech^I Anna Flávia Tischer da Silva^{II} Tayná Naue Lopes^{II} Juliana Sorraia de Oliveira^{III} Ivan Cunha Bustamante Filho^{II} Carlos Augusto Rigon Rossi^I

Artigo a ser submetido a periódico científico e apresentado de acordo com as normas da

Ciência Rural

1 **Avaliação da viabilidade de doses inseminantes de suínos com maior sensibilidade ao**
2 **resfriamento elaboradas com a adição de α -tocoferol**

3
4 **Evaluation of the viability of inseminants doses of boars with sensitivity higher to**
5 **cooling elaborated with the addition of α -tocopherol**

6
7 **Luara Medianeira de Lima Schlösser^{I*} Cristian Guilherme Gräf^I Rodrigo Dalmina**
8 **Rech^I Anna Flávia Tischer da Silva^{II} Tayná Naue Lopes^{II} Juliana Sorraila de**
9 **Oliveira^{III} Ivan Cunha Bustamante Filho^{II} Carlos Augusto Rigon Rossi^I**

10
11 **RESUMO**

12 O estudo teve por objetivo avaliar a influência da adição do α -tocoferol, a doses
13 inseminantes suínos, selecionados quanto a sensibilidade ao resfriamento espermático,
14 elaboradas com diluente de longa ação e armazenadas a temperatura de 17 °C por até 168 horas.
15 Cinco ejaculados de 24 machos suínos foram analisados quanto a motilidade espermática
16 progressiva (MP) e classificados em grupos, de acordo com a sensibilidade ao resfriamento do
17 ejaculado em: MP <60% em 120 horas (maior), MP \geq 60% em 120 horas e <60% em 168 horas
18 (médio), e MP \geq 60% em 168 horas (menor). Em seguida, as doses inseminantes dos animais
19 selecionados quanto a maior sensibilidade ao resfriamento, receberam diferentes concentrações
20 de α -tocoferol: 0 (controle) (T1), 100 μ g/mL (T2) e 200 μ g/mL (T3). A partir disso, foram
21 realizadas análises de motilidade, peroxidação lipídica, integridade de membrana plasmática e
22 acrossomal, e teste de termorresistência (TTR). Em relação à média da MT nos tratamentos

^{I*}Laboratório de Andrologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. 97105 970, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: luaraschlösser@hotmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, RS, Brasil.

^{III}Sector de Bioquímica e Estresse Oxidativo do Laboratório de Terapia Celular da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

23 avaliados, o T3 se mostrou mais eficaz (85,19%), quando comparado ao grupo controle
24 (82,85%) e T2 (83,67%), respectivamente ($P < 0,05$). Nas integridades espermáticas de
25 membrana plasmática e acrossomal, as células espermáticas com acrossoma reagido e
26 membrana lesada (ARML), tiveram um aumento acentuado ($P < 0,05$) na hora 168 (29,96%)
27 quando comparada a hora 72 (16,33%) da análise. As células espermáticas com acrossoma
28 íntegro e membrana íntegra (AIMI), na hora 168, tiveram diminuição ($P < 0,05$) quando
29 comparadas a hora 72 (66,04% e 73,06%, respectivamente). A motilidade total (MT), avaliada
30 pelo TTR, que diferiu ($P < 0,05$) no T3 (87,24%), quando comparada ao T1 e T2 (84,43% e
31 85,22% respectivamente). Na avaliação após os 30 e 120 minutos de incubação a 38°C, houve
32 aumento ($P < 0,05$) na MT (85,02% e 86,24%, respectivamente). Portanto, foi possível
33 identificar machos reprodutores suínos com maior sensibilidade ao resfriamento através da
34 metodologia proposta. As doses elaboradas a partir de machos com maior sensibilidade e
35 submetidos a adição de 200 µg/mL de α -tocoferol mantiveram um bom resultado quanto a
36 motilidade total, porém, não houve este acompanhamento com relação a integridade das
37 membranas plasmática e acrossomal, e a manutenção da peroxidação lipídica, ao decorrer do
38 armazenamento.

39

40 **Palavras-chave:** antioxidantes, ejaculado, reprodução, suínos.

41

42 **ABSTRACT**

43 The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of α -tocopherol
44 to inseminating doses of boars, selected for sensitivity to sperm cooling, prepared with
45 Androstar[®] Plus diluent and stored at a temperature of 17°C for up to 168 hours. Five ejaculates
46 of 24 boars were analyzed for progressive sperm motility (PM) and classified into groups,
47 according to the sensitivity to ejaculate in the cooling: PM <60% in 120 hours (greater), PM

48 $\geq 60\%$ in 120 hours and $< 60\%$ in 168 hours (mean), and PM $\geq 60\%$ in 168 hours (lower). After,
49 the inseminating doses of the animals selected for the highest sensitivity to cooling received
50 different concentrations of α -tocopherol: 0 (control) (T1), 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (T2) and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$
51 (T3). From this, analyzes of motility, lipid peroxidation, plasma and acrosomal membrane
52 integrity, and thermoresistance test (TTR) were performed. In relation to the mean of TM in the
53 evaluated treatments, T3 was more effective (85.19%), when compared to the control group
54 (82.85%) and T2 (83.67%), respectively ($P < 0.05$). In spermatic plasma and acrosomal
55 membrane integrity, sperm cells with reactive acrosome and injured membrane (ARML) had a
56 marked increase ($P < 0.05$) at hour 168 (29.96%) when compared to hour 72 (16, 33%) of the
57 analysis. Sperm cells with intact acrosome and intact membrane (AIMI) at time 168 had a
58 decrease ($P < 0.05$) when compared to hour 72 (66.04% and 73.06%, respectively). The total
59 motility (TM), evaluated by TTR, differed ($P < 0.05$) in T3 (87.24%), when compared to T1 and
60 T2 (84.43% and 85.22%, respectively). In the evaluation after 30 and 120 minutes of incubation
61 at 38 ° C, there was an increase ($P < 0.05$) in TM (85.02% and 86.24%, respectively). Therefore,
62 it is possible to identify swine breeding males with greater sensitivity to cooling through the
63 proposed methodology. The doses prepared from males with greater sensitivity and submitted
64 to the addition of 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of α -tocopherol maintained a good result regarding total motility,
65 however, there was no such follow-up in relation to plasma and acrosomal membranes integrity,
66 and maintenance of lipid peroxidation, during storage.

67

68 **Keywords:** antioxidants, sperm, reproduction, boars.

69

70 INTRODUÇÃO

71 Na reprodução de suínos, um dos grandes avanços foi a implantação da técnica de
72 inseminação artificial. Atualmente, mais de 90% das inseminações artificiais na produção de
73 suínos em todo o mundo, são realizadas com sêmen diluído, refrigerado e armazenado por um

74 período de até 7 dias. Durante o armazenamento *in vitro* do sêmen suíno é observada uma queda
75 gradativa na motilidade espermática. A diferença entre machos quanto à sensibilidade ao
76 processo de resfriamento já foi reportada em suínos, existindo machos cuja motilidade
77 espermática é mantida por um período maior de tempo, enquanto outros apresentam uma queda
78 mais precoce (PAULENZ, KOMMISRUD e HOFMO, 2000).

79 Os espermatozoides são sensíveis aos danos oxidativos, pois apresentam na constituição
80 de suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (POULOS et al.,
81 1973), e a capacidade antioxidante relativamente baixa do plasma seminal. Estes danos
82 favorecem a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), responsáveis pela redução da
83 viabilidade HSU et al. (1998), e da motilidade espermática (AITKEN e BAKER, 2002). A
84 suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, acarreta em danos à estrutura e
85 função das células espermáticas, uma vez que, sob condições oxidativas extremas, os lipídeos,
86 proteínas e ácidos nucleicos são alvos potenciais das ROS. A lipoperoxidação danifica a
87 estrutura dos fosfolipídios da membrana plasmática, levando à perda da fluidez e da integridade
88 da membrana (AITKEN et al., 1993).

89 Pesquisas recentes demonstram que diluentes de longa ação, aprimorados com proteínas
90 e antioxidantes, podem efetivamente prolongar o armazenamento de sêmen sem comprometer
91 sua qualidade (GACZARZEWICZ et al., 2015). Com base nesses estudos, a adição de
92 antioxidantes, como a vitamina E, nos diluentes de sêmen suíno tanto para o resfriamento,
93 quanto para o congelamento, está sendo amplamente avaliada para identificar a real importância
94 que eles possuem para diminuir os danos oxidativos durante o armazenamento.

95 A vitamina E é composta por elementos chamados tocoferóis. Dentre os oito tocoferóis
96 (alfa, beta, gama, delta, épsilon, zeta, eta e teta), o alfa-tocoferol é o mais potente. Constitui-se
97 um dos grupos antioxidantes mais importantes, desempenhando papel fundamental na captação
98 dos radicais livres. Localiza-se principalmente nas membranas celulares, sendo sua

99 complementação indispensável para impedir a peroxidação lipídica. O tocoferol suprime a
100 peroxidação lipídica prendendo os radicais peroxila envolvidos na cadeia da peroxidação.
101 Nestas reações, um átomo de hidrogênio é separado do grupo OH no tocoferol por um radical
102 peroxila, estabilizando a molécula e interrompendo a propagação da peroxidação lipídica
103 (WOLF et al., 1998).

104 O mecanismo de ação das ROS e sua influência negativa sobre a fisiologia da célula
105 espermática, em espécies de mamíferos, ainda não foi totalmente elucidado. Entretanto, o
106 conhecimento atual sobre a ação das substâncias antioxidantes na célula espermática e no
107 plasma seminal, torna evidente sua ação contra os danos oxidativos. Com base nisso, o presente
108 estudo avaliou a viabilidade de doses inseminantes de suínos selecionados para maior
109 sensibilidade ao resfriamento espermático, elaboradas com a adição de diferentes concentrações
110 de α -tocoferol e avaliadas por um período de até 168 horas de armazenamento.

111

112 MATERIAL E MÉTODOS

113 O experimento foi realizado na Central de Produção de Sêmen (CPS) da Associação de
114 Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS) no período de janeiro a março de 2018
115 (Figura 2). Foram utilizados 110 ejaculados, de 22 machos suínos reprodutores híbridos Topigs
116 Norsvin[®] Traxx, coletados com intervalos de sete dias, através do método semiautomático. Os
117 animais possuíam idade entre 23 a 32 meses e foram alojados em baias individuais com acesso
118 a água *ad libitum* e alimentados uma vez ao dia.

119 Os ejaculados foram coletados por sistema de coleta semiautomático, com utilização de
120 copo aquecido a 38 °C, equipado com filtro para retenção da fração gelatinosa. O sêmen *in*
121 *natura* foi pesado e analisado, com uma pequena diluição inicial de 1:9 (900 μ L de diluente e
122 100 μ L de sêmen), em microtubo tipo *ependorf*, quanto à motilidade e concentração de
123 espermatozoides, pelo sistema automatizado de análise seminal *Computer Assisted Sperm*

124 *Analysis* (CASA, SpermVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha). Somente ejaculados
125 que preencheram o critério de pelo menos 70% de motilidade espermática total foram utilizados
126 para o estudo. O sêmen total foi diluído com Androstar[®] Plus (AND, Minitüb GmbH,
127 Tiefenbach, Alemanha), considerado diluente de longa ação. As doses inseminantes foram
128 produzidas a conter $1,5 \times 10^9$ espermatozoides por dose inseminante de 45 mL, e após, foram
129 armazenadas em conservadora, sob temperatura de 17°C.

130 Foram realizadas análises de motilidade espermática total (MT), motilidade espermática
131 progressiva (MP), motilidade local (ML) e células imóveis (IM), por período de até 168 horas.
132 A partir disso, os machos foram classificados quanto a sensibilidade ao resfriamento
133 espermático em: MP <60% em 120 horas (maior sensibilidade); MP ≥60% em 120 horas e
134 <60% em 168 horas (médio) e MP ≥60% em 168 horas (menor sensibilidade), adaptado da
135 literatura (REIS, 2002). Foram utilizados os animais que apresentaram no mínimo, três, dos
136 cinco ejaculados neste padrão de seleção. Assim sendo, os animais do grupo selecionado com
137 sêmen de maior sensibilidade ao resfriamento, foram utilizados como doadores de sêmen para
138 constituir os tratamentos com diferentes concentrações de α -tocoferol nas doses inseminantes.

139 Quatro machos reprodutores suínos foram selecionados a partir dos critérios
140 anteriormente citados, através de seus ejaculados com maior sensibilidade ao resfriamento.
141 Estes, foram submetidos a coletas de sêmen uma vez por semana, por quatro semanas
142 consecutivas. Os ejaculados foram novamente analisados, diluídos e armazenados como
143 descrito anteriormente, porém, nestas doses inseminantes, foram adicionadas diferentes
144 concentrações de α -tocoferol (DL- α -tocopherol acetate - T3376 - Sigma Aldrich),
145 representados pelos seguintes tratamentos: 0 (controle) (T1), 100 μ g/mL (T2) e 200 μ g/mL
146 (T3).

147 Foram realizadas análises microscópicas de MT, MP, ML e IM nas horas 24, 72, 120 e
148 168 do armazenamento; e integridade de membrana espermática plasmática e acrossomal,

149 peroxidação lipídica e teste de termorresistência (TTR), nas horas 72 e 120 do armazenamento.
150 As análises microscópicas foram realizadas pelo sistema CASA, utilizando câmara de
151 contagem (Leja[®] Nieuw-Vennep, Holanda) e as análises de integridades de membrana
152 espermática plasmática, acrossomal e peroxidação lipídica foram realizadas no Laboratório de
153 Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), utilizando citômetro de fluxo
154 BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) controlado pelo software BDAccuri C6
155 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA).

156 Para a avaliação microscópica de motilidade espermática, foi utilizada uma amostra, de
157 cada dose inseminante, aquecida a 37 °C, nas horas 0, 24, 72, 120 e 168 do estudo. As amostras
158 foram avaliadas através do sistema automatizado de análise seminal, utilizando câmaras de
159 contagem. A câmara foi preenchida por capilaridade com 3 µL da amostra e analisada em
160 microscópio óptico sob objetiva de 20x e contraste de fase negativo. Foram analisados dados
161 de MT, MP, ML e IM.

162 O teste de termorresistência (TTR) foi realizado nas horas 72 e 168 do armazenamento.
163 Amostras de 10 mL das doses inseminantes com diferentes concentrações de α -tocoferol, foram
164 incubadas em banho-maria a 38 °C por duas horas (adaptado por SCHULZE et. al., 2013). Após,
165 3 µL da amostra, foi preenchida em uma câmara de contagem, pré-aquecida de 38 °C e analisada
166 no sistema CASA, quanto aos parâmetros de MT, MP, ML e IM, nos períodos de 30 e 120
167 minutos.

168 Para a determinação das espécies reativas de oxigênio (ROS), o ensaio de fluorescência
169 com o reagente 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) foi utilizado para medir a
170 produção de peróxido celular e outras espécies reativas (MYHRE et al., 2003). Alíquotas de 50
171 µL de amostra foram adicionados a um meio contendo tampão Tris-HCl (0,01 mM, pH 7,4) e
172 DCFH-DA (1 mM). Após a adição da amostra, o meio foi incubado no escuro durante 1h até a
173 medição de fluorescência (excitação a 488 nm e emissão a 525 nm, com ambas as larguras de

174 fenda em 1.5 nM). A fluoresceína dicloro-oxidada foi determinada e os resultados expressos
175 como DCFH-DA fluorescência.

176 O total de grupos tióis (T-SHs) foi analisado por espectrofotometria através do método
177 de ELLMAN e BOYNE (1972), com adaptações descritas a baixo. Utilizou-se uma alíquota de
178 200 µL de amostra, que foi adicionada à 10 mM (0,05 mL) de 5',5'-ditiobis- (ácido 2-
179 nitrobenzóico) (DTNB). Uma curva padrão usando cisteína foi adicionada para calcular o teor
180 de grupos tiol em amostras e os valores foram expressos como µmol SH/mL de proteína. Para
181 a determinação de tióis não-proteicos (glutathiona- GSH), foi realizada uma avaliação em
182 espectrofotômetro utilizando o método de ELLMAN (1959). As amostras foram misturadas
183 (1:1) com ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugadas a 4000×g durante 10 min. Após a
184 centrifugação, o sedimento de proteína foi descartado e os grupos NPSH livres foram
185 determinados no sobrenadante. As amostras foram adicionadas em um sistema contendo
186 tampão de fosfato de potássio (1M, pH 7,4) e DTNB (10 mM). O produto da reação foi medido
187 a 412 nm. Uma curva padrão utilizando GSH foi adicionada para calcular o teor de grupos tióis
188 não proteicos em amostras, e os valores foram expressos como nmol de GSH/mL.

189 Para as integridades de membrana plasmática e acrossomal, foi adicionado na amostra
190 1,0 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis,
191 Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 1,0 µL de aglutinina de *Pisum sativum*
192 conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma Aldrich
193 Co., Saint Louis, Missouri, EUA). Estas duas sondas tiveram o objetivo de corar as células com
194 membrana plasmática lesada (IP positivo) (DE ANDRADE et al., 2007) e com a membrana
195 acrossomal reagida (FITC-PSA positivo) (DE ANDRADE et al., 2011). Todas as amostras
196 tiveram 10.000 células analisadas em citômetro de fluxo.

197 Para a avaliação de peroxidação lipídica, as amostras foram coradas com 1 µL da sonda
198 C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e após,

199 adicionados 1,0 µL de Syto 59 e 1,0 µL de Iodeto de Propídio. Foram analisadas 10.000 células
200 por amostra em citômetro de fluxo. As células viáveis (IP negativo) e coradas com a sonda C11-
201 BODIPY^{581/591} foram analisadas quanto à mediana de intensidade de emissão de fluorescência.

202 No delineamento experimental, foi realizado uma amostragem aleatória simples dos
203 animais em um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados por análise
204 de variância. A análise estatística considerou os tratamentos, as horas, os minutos (quando
205 existentes), as coletas e suas interações como efeitos fixos e, o animal e o resíduo, como efeitos
206 aleatórios, utilizando o procedimento MIXED do SAS[®], versão 9.4. Quando observadas
207 diferenças, as médias foram comparadas utilizando o recurso LSmeans e as interações foram
208 desdobradas quando significativas a 5% de probabilidade. As variáveis AIML e ARML, e ML
209 e IM, foram analisadas por estatística não paramétrica utilizando o teste de Wilcoxon. Foram
210 adotados os valores limites de probabilidade de 5% para significância.

211

212 **RESULTADOS**

213 Os dados analisados de motilidade, integridade espermática plasmática e acrossomal,
214 peroxidação lipídica e TTR, não diferiram ($P>0,05$) na interação entre tratamentos e horas.
215 Nesses casos, as médias são mostradas de acordo com os tratamentos ou horas.

216 Os resultados de motilidade são apresentados na Tabela 2. Em relação à média da MT
217 nos tratamentos avaliados, o T3 se mostrou mais eficaz (85,19%), quando comparado ao grupo
218 controle (82,85%) e T2 (83,67%), respectivamente ($P<0,05$). Os valores das médias de MP,
219 ML e IM não variaram de forma significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos. As médias de MT
220 e MP regrediram de forma significativa com o passar das horas de armazenamento ($P<0,05$), e
221 a ML e IM não tiveram diferenças importantes ($P>0,05$).

222 Nas integridades espermáticas de membrana plasmática e acrossomal (Tabela 3), as
223 células espermáticas com acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), diferiram ($P<0,05$)

224 na média das horas de avaliação, ou seja, houve um aumento acentuado na hora 168 (29,96%)
225 quando comparada a hora 72 (16,33%) da análise. As células espermáticas com acrossoma
226 íntegro e membrana íntegra (AIMI), também diferiram ($P < 0,05$) na média das horas de
227 avaliação. Observamos que na hora 168 houve diminuição das células viáveis quando
228 comparadas a hora 72 (66,04% e 73,06%, respectivamente), demonstrando que o uso das
229 concentrações de antioxidantes utilizadas no estudo, não foram suficientes para impedir os
230 danos de membrana plasmática e acrossomal aos espermatozoides durante o armazenamento.

231 Os resultados de peroxidação lipídica da membrana plasmática deste trabalho,
232 demonstraram que não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos, porém no
233 tempo 168 horas houve um aumento acentuado ($P < 0,05$) em relação ao tempo 72 horas, da
234 intensidade de fluorescência, nas células espermáticas vivas das DI armazenadas (Figura 4).
235 Portanto, o resultado apresentado em nosso estudo, demonstra que o antioxidante utilizado,
236 adicionado as DI, nas dosagens de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, não previne a lipoperoxidação da
237 membrana plasmática no armazenamento até 168 horas.

238 A Tabela 4, indica a motilidade total (MT), avaliada pelo TTR, que diferiu ($P < 0,05$) no
239 T3 (87,24%), quando comparada ao grupo controle e T2 (84,43% e 85,22% respectivamente).
240 Na avaliação após os 30 e 120 minutos de incubação a 38°C, houve aumento ($P < 0,05$) na MT
241 (85,02% e 86,24%, respectivamente).

242 Os dados analisados de tióis totais, tióis não-proteicos e ROS não diferiram ($P > 0,05$) na
243 interação entre semanas e horas e, nem entre tratamentos e horas. Nesses casos, as médias são
244 mostradas de forma isolada. As Tabela 5 apresenta os dados relacionados a tióis totais, tióis não
245 proteicos e ROS, das DI produzidas com os ejaculados dos quatro machos selecionados no
246 estudo I. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) nos valores encontrados para tióis totais e
247 ROS no decorrer das cinco semanas de estudo. Os quatro machos utilizados foram classificados
248 em um grupo de mesmo padrão de seleção, dessa forma, o esperado realmente, era de que não

249 houvessem diferenças significativas entre as doses inseminantes produzidas em relação a
250 quantidade de ROS e a capacidade antioxidante durante o armazenamento. Para tióis não-
251 proteicos, houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as semanas, porém, não foram valores que
252 geraram preocupação por estarem equilibrados.

253 A Tabela 6 apresenta os dados relacionados a tióis totais, tióis não-proteicos e ROS, das
254 DI produzidas com ejaculados dos quatro machos selecionados, onde foram aplicados os
255 tratamentos com α -tocoferol, para o estudo II. Em nosso trabalho, não houve diferença
256 estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$) em nenhuma das variáveis analisadas (tióis totais, tióis
257 não-proteicos e ROS). A capacidade antioxidante não foi melhorada com a adição do
258 antioxidante nas dosagens utilizadas. A quantidade de ROS totais, se manteve estável mesmo
259 nas amostras onde foram aplicados os tratamentos e, portanto, não foram suficientes para
260 diminuir a produção de espécies reativas.

261

262 **DISCUSSÃO**

263 A diferença de respostas entre ejaculados de um mesmo macho revela a dificuldade em
264 efetuar uma classificação dos machos conforme a sensibilidade ao resfriamento. KENNEDY e
265 WILKINS (1984), chamaram a atenção para o fato da avaliação de um único ejaculado não ser
266 um bom indicativo do potencial produtivo do macho, pois os parâmetros de avaliação seminal
267 apresentam baixa repetibilidade, sendo de 0,21 para a motilidade. Para ter uma estimativa mais
268 precisa do potencial de produção de doses inseminantes, estes autores recomendam a coleta de
269 no mínimo 5 ejaculados. No presente estudo, se forem considerados os 5 ejaculados coletados,
270 dos 4 machos selecionados, aqueles considerados menos sensíveis (grupo menor) foram os que
271 apresentaram, no total, um maior número de ejaculados do tipo esperado (Tabela 1).

272 A variação da motilidade espermática com o tempo de armazenamento, dificulta o
273 processo de seleção, pela diminuição da uniformidade dos ejaculados de um mesmo macho. As

274 razões pelas quais os diferentes ejaculados de um mesmo macho apresentam variação na
275 manutenção da motilidade durante o resfriamento, ainda não são conhecidas. Considerando que
276 os espermatozoides adquirem maior sensibilidade ao choque térmico ao percorrerem os túbulos
277 epididimários, segundo WATSON (1995), a diferença na frequência de coletas e a duração do
278 trânsito espermático no epidídimo poderiam contribuir para a variação dos ejaculados de um
279 mesmo macho. A variação entre ejaculados de um mesmo macho também foi observada na
280 capacidade dos espermatozoides em se ligar à zona pelúcida, levando HARRISON (1997) a
281 apresentar a hipótese de que o conteúdo de espermadesinas esteja envolvido, o que denotaria,
282 diferenças na composição do plasma seminal de um ejaculado para outro.

283 Com relação a motilidade espermática, a melhor manutenção da motilidade total no T3,
284 pode indicar, que uma concentração de 200 µg/mL nas doses inseminantes, seriam suficientes
285 para melhorar a motilidade espermática. Resultados semelhantes foram obtidos com um
286 análogo da vitamina E, em concentrações de 100 e 200 µg/mL, adicionado a doses inseminantes
287 de reprodutores suínos. Houve aumento significativo da motilidade espermática e velocidade
288 espermática; redução significativa de células com movimento circular (motilidade local - ML)
289 e aumento no número de espermatozoides com elevada atividade mitocondrial (PEÑA et al.,
290 2003).

291 Nossos estudos contrariam os encontrados por BREININGER et al. (2005), que
292 concluíram que 200 µg/mL de α -tocoferol é o melhor nível para resistência a peroxidação
293 lipídica em amostras de sêmen suíno. O estresse oxidativo ocorre durante o processo de
294 armazenamento do sêmen, levando a um declínio significativo na função espermática. Está bem
295 estabelecido que a peroxidação lipídica é responsável por interromper a integridade da
296 membrana plasmática (KUMARESAN et al., 2009). WATERHOUSE et al. (2004) e AWDA
297 et al. (2009), também afirmaram que a peroxidação lipídica da membrana tem sido associada a
298 diminuição da viabilidade da membrana plasmática e integridade de acrossoma em sêmen de

299 suínos. Portanto, nosso trabalho fortalece estas afirmações, pois tivemos aumento de
300 espermatozoides com acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), e aumento da
301 peroxidação lipídica em nossas análises, ao passar das horas do armazenamento.

302 O TTR representa a tentativa de avaliar a capacidade dos espermatozoides de
303 sobreviverem e manterem a sua competência funcional, sob condições simuladas, na
304 temperatura corporal fisiológica da fêmea (TARDIF et al., 1999). Em nosso estudo, houve
305 melhora da motilidade no tratamento com maior concentração de antioxidante (T3), quando
306 comparado aos demais (T1 e T2). O TTR tem o potencial de detectar níveis sutis de dano latente
307 do processo de armazenamento que, sob avaliação da motilidade espermática na rotina, não
308 seriam detectados (FISER et al., 1991).

309 A adição de Vitamina E e análogos a ejaculados diluídos, têm apresentado efeitos
310 variados sobre a motilidade espermática do sêmen humano (DONNELLY et al., 1999) e de
311 animais (UPRETI et al., 1997). Estes resultados demonstram que o processo de oxidação pode
312 ter efeito diverso, dependendo da espécie animal e/ou das estruturas celulares espermáticas
313 afetadas. Desta forma, os efeitos da Vitamina E podem variar de acordo com a dose utilizada,
314 e dependendo desta proporção, poderá apresentar um efeito antioxidante ou inverso,
315 estimulando o processo oxidativo (CUTLER, 1997).

316 Está bem estabelecido que as ROS são responsáveis pelo comprometimento da
317 motilidade espermática devido ao esgotamento dos níveis de ATP intracelular (DE
318 LAMIRANDE e GAGNON, 1992; GUTHRIE et al., 2008) e a peroxidação lipídica interrompe
319 a integridade da membrana plasmática (KUMARESAN et al., 2009). O efeito oxidativo
320 ocasionado pela geração de ROS seria diminuído pela presença de substâncias antioxidantes no
321 plasma seminal ou através de sua adição aos diluentes de sêmen. Porém, os trabalhos têm
322 demonstrado resultados contraditórios referentes a esta atuação sobre a preservação da
323 viabilidade espermática no sêmen, em virtude da divergência do tipo e da concentração do

324 antioxidante utilizado, assim como seu mecanismo de ação específico referente à proteção da
325 célula espermática (DONELLY et al., 1999). Os benefícios da adição de antioxidantes, gerando
326 menos estresse oxidativo e danos espermáticos, proporcionando a preservação da capacidade
327 fecundante das células espermáticas, ainda precisa ser melhor determinado nas espécies
328 domésticas (VALENÇA e GUERRA, 2007).

329

330 **CONCLUSÃO**

331 É possível identificar machos reprodutores suínos com maior sensibilidade ao
332 resfriamento através da metodologia proposta. As doses elaboradas a partir de machos com
333 maior sensibilidade e submetidos a adição de 200 µg/mL de α -tocoferol mantiveram um bom
334 resultado quanto a motilidade total, porém, não houve este acompanhamento com relação a
335 integridade das membranas plasmática e acrossomal, e a redução ou manutenção da
336 peroxidação lipídica, ao decorrer do armazenamento a 17 °C por 168 horas.

337

338 **AGRADECIMENTOS**

339 Os autores agradecem a Central de Produção de Sêmen (CPS) da Associação de
340 Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS), pela disponibilidade das instalações e
341 dos animais para execução do trabalho; ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade do
342 Vale do Taquari (UNIVATES), pela ajuda na condução experimental e realização de análises;
343 a empresa Analisa Soluções em Estatística, pelo auxílio com as análises estatísticas e ao Setor
344 de Bioquímica e Estresse Oxidativo do Laboratório de Terapia Celular, pelo auxílio com as
345 análises de estresse oxidativo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
346 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento
347 001.

348

349 **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

350 O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
351 Animais da Universidade Federal de Santa Maria (protocolada sob o CEUA nº 1106270218).

352

353 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

354 Os autores declaram não haver conflito de interesses. As instituições colaboradoras na
355 execução do trabalho não tiveram nenhum papel no desenho experimental; na coleta, análise
356 ou interpretação de dados; na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

357

358 **REFERÊNCIAS**

359 AITKEN, R.J. et al. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa.

360 **Molecular Reproduction and Development**, v.35, p.302-315, 1993. Disponível em:

361 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352936>>. Acesso em 15 abr. 2018. doi:

362 10.1002/mrd.1080350313.

363 AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a

364 continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v.25, p.191-194, 2002. Disponível

365 em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121567>>. Acesso em: 15 abr. 2018. doi:

366 10.1046/j.1365-2605.2002.03521.x.

367 AWDA, B.J. et al. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of**

368 **Reproduction**, v.81, p.553-561, 2009. Disponível em: <

369 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357363>>. Acesso em: 24 mar. 2018. doi:

370 10.1095/biolreprod.109.076471.

371 BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components.

372 **Analytical Biochemistry**, v. 46, p. 639-653, 1972.

373 BREININGER, E. et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in

374 cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.458-467, 2005. Disponível em:

375 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826678>>. Acesso em: 28 mar. 2018. doi:
376 10.1016/j.theriogenology.2004.08.016.

377 CUTLER, R.G. High concentration of antioxidants may not improve defense against oxidative
378 stress. **Archives Gerontology and Geriatrics**, v.17, p.189-201, 1997. Disponível em:
379 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374318>>. Acesso em: 12 mai. 2018. doi:
380 10.1016/0167-4943(93)90050-R.

381 DE ANDRADE, A.F.C. et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of
382 mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm.
383 **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.190-194, 2007. Disponível em:
384 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17348977>>. Acesso em: 21 mai. 2018. doi:
385 10.1111/j.1439-0531.2006.00751.x.

386 DE ANDRADE, A.F.C. et al. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what
387 is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.682-686,
388 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121969>>. Acesso em: 12 abr.
389 2018. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01729.x.

390 DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II:
391 depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility.
392 **Journal of Andrology**, v.13, n.5, p.379-386, 1992. Disponível em: <
393 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.1992.tb03328.x>>. Acesso em:
394 16 dez. 2017. doi: 10.1002/j.1939-4640.1992.tb03328.x.

395 DONNELLY, F.T. et al. Antioxidant supplementation *in vitro* does not improve human sperm
396 motility. **Fertility and Sterility**, v.72, p.484-486, 1999. Disponível em:
397 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028299002678>>. Acesso em: 22
398 mar. 2018. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00267-8.

- 399 ELLMAN, G.L. Tissue Sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82,
400 p.70-77, 1959. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- 401 FISER, P.S.; HANSEN, C.; UNDERHILL, L.; MARCUS, G.J. New thermal stress test to assess
402 the viability of cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.28, p.454-459, 1991. doi:
403 10.1016/0011-2240(91)90054-R.
- 404 GACZARZEWICZ, D. et al. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes
405 in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive
406 capability. **Turkish Journal of Biology**, v.39, p.582-594, 2015. Disponível em:
407 <<https://journals.tubitak.gov.tr/biology/abstract.htm?id=16603>>. Acesso em: 11 mai. 2018.
408 doi: 10.3906/biy-1412-76.
- 409 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R.; LONG, J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen
410 species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v.70, p.1209-1215, 2008. doi:
411 10.1016/j.theriogenology.2008.06.017.
- 412 HARRISON, R.A.P. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **Journal**
413 **Reproduction and Fertility. Supplement**, v.52, p.195-211, 1997.
- 414 KENNEDY, B.W.; WILKINS, J.N. Boar, breed and environmental factors influencing semen
415 characteristics of boars used in artificial insemination. **Canadian Journal of Animal Science**,
416 v.64, p.833-843, 1984. Disponível em:
417 <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/cjas84-097#.XD0ey1VKjIU>>. Acesso
418 em: 18 out. 2018. doi: 10.4141/cjas84-097.
- 419 KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K.M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.;
420 KUMAR, S.; NASKAR, S. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and
421 apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.162-171,
422 2009. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.006.

- 423 PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different
424 temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35,
425 p.83-87, 2000. doi: g/10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x.
- 426 HSU, P.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity
427 in rat sperm. **Toxicology**, v.128, p.169-179, 1998. Disponível em:
428 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X98000687>>. Acesso em: 12
429 abr. 2018. doi: 10.1016/S0300-483X(98)00068-7.
- 430 KUMARESAN, A. et al. Preservation of boar semen a 18 °C induces lipid peroxidation and
431 apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.110, n.1, p.162-171,
432 2009. Disponível em:
433 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008000092>>. Acesso em: 15 abr.
434 2018. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.006.
- 435 MYHRE, O.; ANDERSEN, J.M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-
436 dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation.
437 **Biochemical Pharmacology**, v.65, p.1575–1582, 2003. doi: 10.1016/S0006-2952(03)000832.
- 438 PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different
439 temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35,
440 p.83-87, 2000. Disponível em: < [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1439-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x)
441 [0531.2000.00207.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x)>. Acesso em: 16 out. 2018. doi: 10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x
- 442 PEÑA, F.J. et al. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and
443 mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of ejaculate.
444 **Animal Reproduction Science**, v.78, p.85-98, 2003. Disponível em:
445 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003000496>>. Acesso em: 18
446 mai. 2018. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00049-6.

- 447 POULOS, A. et al. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian
448 spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.46, p.541-549, 1973. Disponível
449 em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049173900941>>. Acesso em: 12
450 abr. 2018. doi: 10.1016/0305-0491(73)90094-1.
- 451 REIS, G.R. **Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de**
452 **ligação espermática a um substrato sintético**. 2002. 91f. Tese (Doutorado em Ciências
453 Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 454 SCHULZE, M.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; SCHMOLL, F.; GROSSFELD, R.;
455 GRIESSLER, A. Effects on boar semen quality after infection with Porcine Reproductive and
456 Respiratory Syndrome virus: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.55, p.16-24,
457 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3599264/>>. Acesso
458 em: 12 dez. 2017. doi: 10.1186/1751-0147-55-16.
- 459 TARDIF, S. et al. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo.
460 **Theriogenology**, v.52, p.447-459, 1999. Disponível em:
461 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99001429>>. Acesso em: 18
462 mai. 2018. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00142-9.
- 463 UPRETI, G.C. et al. Motility of ram spermatozoa drying storage in a chemically defined diluent
464 containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, n.2, p.269-278, 1997.
465 Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432097000547>>.
466 Acesso em: 11 mai. 2018. doi: 10.1016/S0378-4320(97)00054-7.
- 467 VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e a utilização
468 de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução**
469 **Animal**, v.31, n.1, p.47-53, 2007. Disponível em:
470 <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB105Valencapag47-53.pdf>>.
471 Acesso em: 02 mai. 2018.

- 472 WATERHOUSE, K.E. et al. Effects of in vitro storage time and semen extender on membrane
473 quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**, v.62, p.1638–1651, 2004.
474 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15511551>>. Acesso em: 11 mai. 2018.
475 doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.001.
- 476 WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of
477 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility**
478 **Development**, v.7, p.871-891, 1995.
- 479 WOLF, R. et al. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of**
480 **Dermatology and Venereology**, v.10, n.2, p.103-117, 1998. Disponível em:
481 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553906>>. Acesso em: 22 mar. 2018. doi:
482 10.1111/j.1468-3083.1998.tb00709.x.
- 483

484 Tabela 1- Classificação dos ejaculados, de cada animal, segundo os padrões de seleção.

Machos	Grupos*	Seleção		
		GMa	GMe	GMen
1	Maior	4	1	0
2	Maior	3	0	2
3	Maior	3	0	2
4	Maior	3	1	1
5	Médio	2	3	0
6	Médio	1	4	0
7	Médio	1	4	0
8	Médio	0	4	1
9	Médio	1	3	1
10	Menor	1	1	3
11	Menor	1	1	3
12	Menor	1	1	3
13	Menor	1	0	4
14	Menor	2	0	3
15	Menor	0	1	4
16	Menor	1	0	4
17	Menor	1	0	4
18	Menor	0	0	5

485 *Dos 22 machos utilizados na seleção, 4 deles, não foram classificados em nenhum dos grupos.

486 GMa: MP <60% em 120 horas (maior) (mínimo 3/5 ejaculados neste padrão de seleção);

487 GMe: MP ≥60% em 120 horas e <60% em 168 horas (médio) (mínimo 3/5 ejaculados neste padrão de seleção);

488 GMen: MP ≥60% em 168 horas (menor) (mínimo 3/5 ejaculados neste padrão de seleção).

490

491

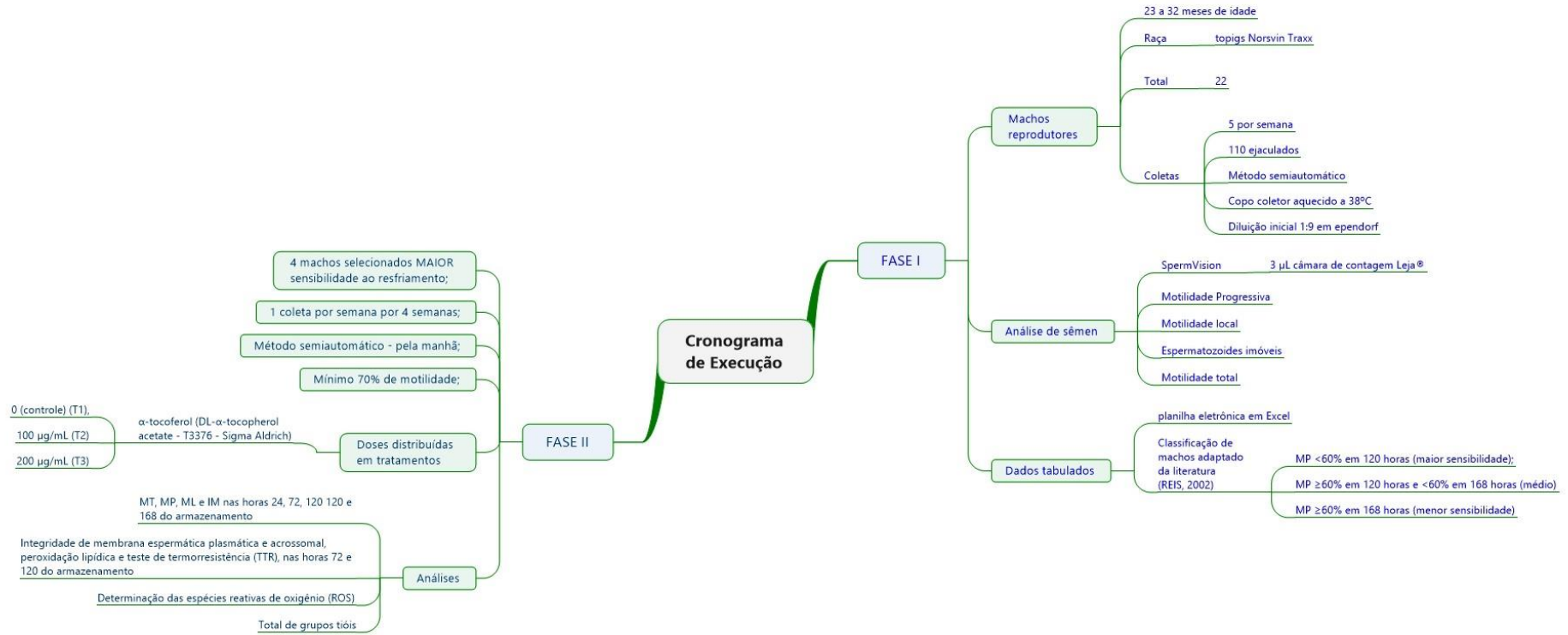
492

493

494

495

Figura 2- Cronograma de execução de experimento (Fase I e Fase II).



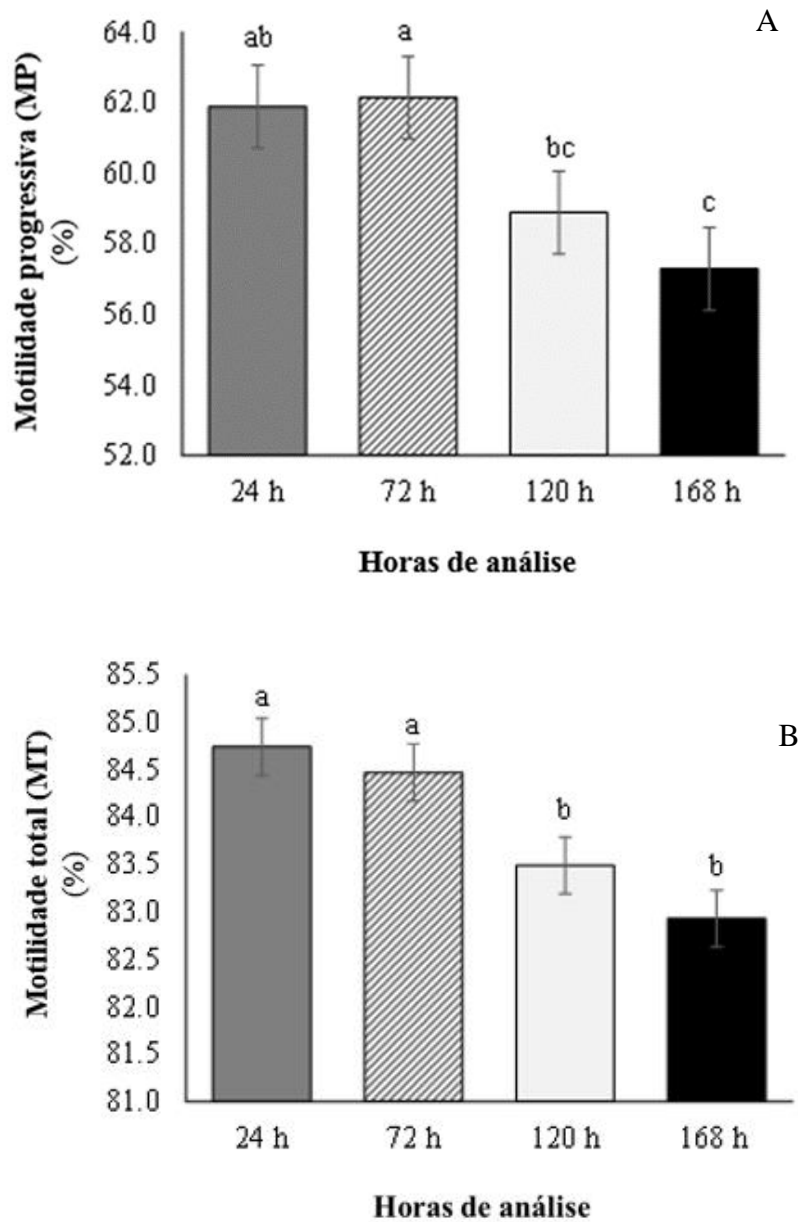
496

497

498

499

Figura 3- (A) Avaliação da motilidade progressiva (MP) e (B) Avaliação da motilidade total (MT), por sistema computadorizado (CASA, SpermVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemanha), nas horas 24, 72, 120 e 168 do armazenamento.



500

501

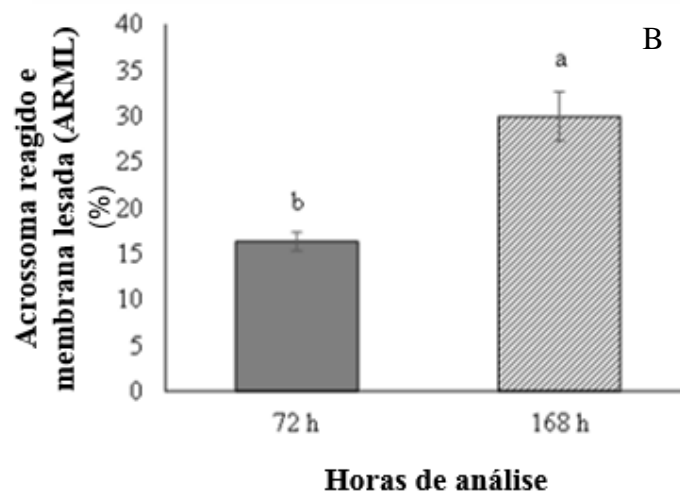
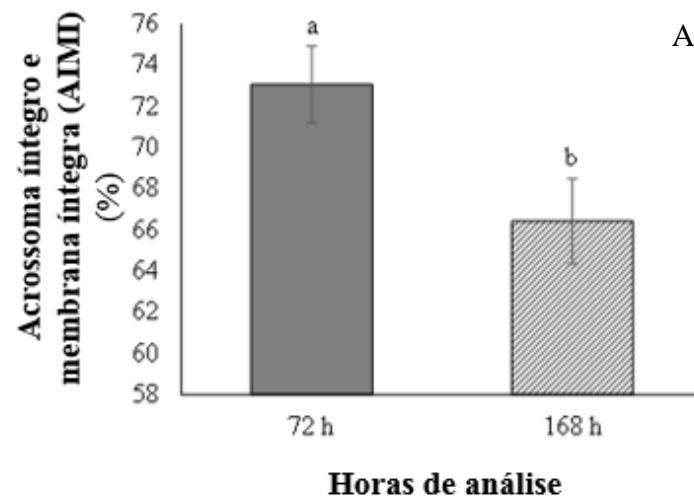
502

503

504

505

Figura 4- Avaliação das integridades de membrana plasmática e acrossomal, por citômetro de fluxo, nas horas 72 e 168 do armazenamento: (A) acrossoma reagido e membrana plasmática lesada (ARML) e (B) acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (AIMI).



506

507

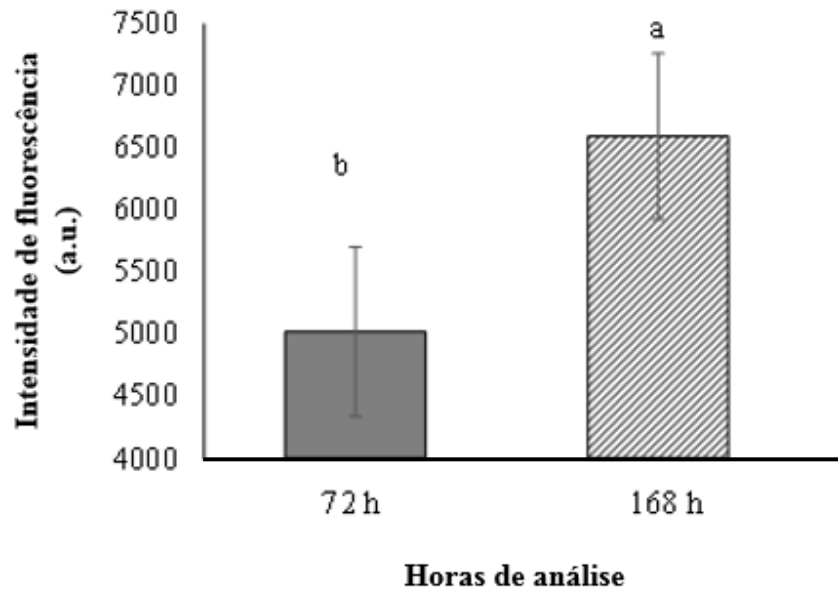
508

509

510

511

Figura 5- Avaliação da peroxidação lipídica, considerando as células vivas, pela intensidade de fluorescência (a.u.), em citômetro de fluxo.



512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523 Tabela 2- Média \pm erro padrão da motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA, SpermVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach,
524 Alemanha), considerando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), motilidade local (ML) e células imóveis (IM), nas horas
525 24, 72, 120 e 168 de análise.

Variáveis*	Tratamentos			Horas				Probabilidades					526
	T1	T2	T3	24	72	120	168	T	Sem	H	T*Sem	T*H	
MT	82,80 ^C	83,60 ^B	85,19 ^A	84,7 ^A	84,40 ^A	83,50 ^B	82,90 ^B	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,90	0,89	
	$\pm 0,26$	$\pm 0,26$	$\pm 0,26$	$\pm 0,30$	$\pm 0,30$	$\pm 0,30$	$\pm 0,30$						
MP	60,60	60,77	58,74	61,9 ^{AB}	62,1 ^A	58,9 ^{BC}	57,3 ^C	0,41	0,0019	0,0039	0,3072	0,7498	
	$\pm 1,19$	$\pm 1,19$	$\pm 1,19$	$\pm 1,17$	$\pm 1,17$	$\pm 1,17$	$\pm 1,17$						
ML	22,61	24,08	25,04	24,07	23,42	22,68	25,49	0,3065	0,2267	0,4655	-	-	
	$\pm 1,07$	$\pm 1,07$	$\pm 1,21$	$\pm 1,30$	$\pm 1,39$	$\pm 1,23$	$\pm 1,20$						
IM	17,13	16,33	15,79	15,26 ^B	15,52 ^B	17,83 ^A	17,07 ^A	0,3932	0,0059	0,0678	-	-	
	$\pm 0,29$	$\pm 0,30$	$\pm 1,30$	$\pm 0,41$	$\pm 0,34$	$\pm 1,46$	$\pm 0,32$						

527 T=tratamentos; Sem=semanas de análise; H=horas de análise. ^{A,B,C} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). *Valores
528 expressos em porcentagem (%).

529

530

531

532

533

534 Tabela 3- Média \pm erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossoma por citometria de fluxo, considerando células com acrossoma
 535 íntegro e membrana lesada (AIML), acrossoma reagido e membrana lesada (ARML), acrossoma íntegro e membrana íntegra (AIMI) e
 536 acrossoma reagido e membrana íntegra (ARMI), nas horas 0, 72 e 168 de análise.

Variáveis	Tratamentos			Horas			Probabilidades				
	C	100	200	0	72	168	T	Coleta	H	T*coleta	T*H
AIML	5,49 $\pm 0,56$	5,52 $\pm 0,65$	6,55 $\pm 0,77$	6,29 $\pm 0,61$	6,45 $\pm 0,62$	4,80 $\pm 0,76$	0,442	0,082	0,156	-	-
ARML	22,67 $\pm 2,38$	23,33 $\pm 2,06$	20,53 $\pm 1,47$	20,00 ^B $\pm 1,14$	16,33 ^B $\pm 1,08$	29,96 ^A $\pm 2,66$	0,5924	0,8006	<0,0001	-	-
AIMI	70,97 $\pm 2,27$	68,09 $\pm 2,26$	68,54 $\pm 2,24$	68,91 ^B $\pm 2,15$	72,58 ^A $\pm 2,15$	66,10 ^B $\pm 2,32$	0,316	0,3317	0,0031	0,8003	0,7461
ARMI	5,93 $\pm 1,23$	7,22 $\pm 1,24$	5,92 $\pm 1,25$	6,20 $\pm 1,22$	5,69 $\pm 1,22$	7,19 $\pm 1,23$	0,172	0,0441	0,1127	0,8998	0,988

537 T=tratamentos; C=Controle; Sem=semanas; H=horas; ^{A,B,C} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). * Valores
 538 expressos em porcentagem (%).

539

540

541

542

543

544 Tabela 4- Média \pm erro padrão de motilidade espermática por sistema computadorizado (CASA, SpermVision[®], Minitüb GmbH, Tiefenbach,
545 Alemanha), considerando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), motilidade local (ML) e células imóveis (IM), no teste
546 de termorresistência (TTR), avaliadas em 30 e 120 minutos de incubação a 38°C, nas horas 72 e 168 de análise.

Variáveis*	Tratamentos			Horas		Minutos		Probabilidades			
	T1	T2	T3	72	168	30	120	T	Sem	Hora	Min
MT	84,4 ^B	85,2 ^B	87,2 ^A	86,4 ^A	84,8 ^B	85,02 ^B	86,2 ^A	<0,0001	0,12	<0,0001	<0,0001
	$\pm 0,51$	$\pm 0,51$	$\pm 0,51$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$				
MP	66,7	67,3	66,8	69,71 ^A	64,23 ^B	67,4	66,5	0,90	0,01	<0,0001	0,40
	$\pm 1,23$	$\pm 1,23$	$\pm 1,23$	$\pm 1,04$	$\pm 1,04$	$\pm 1,04$	$\pm 1,04$				
ML	17,8	18,0	19,1	16,4 ^B	20,4 ^A	17,7	19,3	0,85	0,02	0,0002	0,21
	$\pm 1,36$	$\pm 1,36$	$\pm 1,36$	$\pm 1,24$	$\pm 1,24$	$\pm 1,24$	$\pm 1,24$				
IM	15,5 ^A	14,8 ^A	12,7 ^B	13,5 ^B	15,2 ^A	15,0 ^A	13,8 ^B	<0,0001	0,13	<0,0001	0,0001
	$\pm 0,51$	$\pm 0,51$	$\pm 0,51$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$	$\pm 0,46$				

547 T=tratamentos; Sem=semanas; Min=minutos; Probabilidades das interações: MT= 0,54; 0,34; 0,52 e 0,75 para T*Sem, T*hora, T*min e
548 T*Hora*min, respectivamente. MP= 0,87; 0,38; 0,87 e 0,05 para T*Sem, T*hora, T*min e T*Hora*min, respectivamente. ML= 0,45; 0,59; 0,73 e
549 0,38 para T*Sem, T*hora, T*min e T*Hora*min, respectivamente. IM= 0,54; 0,34; 0,52 e 0,75 para T*Sem, T*hora, T*min e T*Hora*min,
550 respectivamente. * Valores expressos em percentagem (%).

551

552

553

554

555

556 Tabela 5- Média de tióis totais, tióis não-proteicos e espécies reativas de oxigênio (ROS), nas 5 semanas do estudo I, dos machos selecionados.

Variáveis	Semanas					Probabilidades				Dpr
	1	2	3	4	5	S	H	M	M*S	
Tióis totais*	45,15	49,87	50,47	40,43	52,47	0,079	0,678	0,001 ¹	0,001	11,46
Tióis não-proteicos**	54,32 ^{AB}	52,67 ^B	54,03 ^{AB}	55,50 ^A	53,11 ^{AB}	0,023 ²	0,960	0,090	0,209	2,13
ROS***	1,500	1,370	2,277	2,311	1,499	0,009	0,926	0,012 ³	0,143	0,80

557 S=semanas; H=horas de análise; M=machos selecionados; M*S=interação, Dpr=desvio padrão residual; ^{A, B, C} letras diferentes na mesma linha
558 diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância; Equações de regressão: ¹M=2,77-0,00521 Tióis totais; ²S=2,24+0,0141 Tióis não totais;
559 ³M=2,36+0,079; * Os valores foram expressos como $\mu\text{mol SH/mL}$ de proteína; ** Os valores foram expressos como nmol de GSH/mL; *** Os
560 valores foram expressos como DCFH-DA fluorescência.

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570 Tabela 6- Média de tióis totais, tióis não-proteicos e espécies reativas de oxigênio (ROS), nas 4 semanas do estudo II, dos machos selecionados.

Variáveis	Tratamentos			Probabilidades					Dpr
	1	2	3	S	T	M	H	T*M	
Tióis totais*	55,31	53,94	55,47	0,001 ¹	0,537	0,191	0,420	0,133	7,38
Tióis não-proteicos**	55,38	53,94	55,47	0,001 ²	0,519	0,203	0,444	0,138	7,35
ROS***	1,99	2,20	2,013	0,322	0,597	0,004 ³	0,222	0,909	1,11

571 S=semanas; H=horas de análise; M=machos selecionados; M*S=interação, Dpr=desvio padrão residual; ^{A, B, C} letras diferentes na mesma linha
572 diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância; Equações de regressão: ¹S=2,54-0,016 Tióis totais ²S=2,50-0,0001 Tióis não totais; ²M=2,77-
573 0,00521 Tióis totais; ³M=2,07+0,206 ROS; * Os valores foram expressos como $\mu\text{mol SH/mL}$ de proteína; ** Os valores foram expressos como
574 nmol de GSH/mL; *** Os valores foram expressos como DCFH-DA fluorescência.

575

576

577

578

579

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993.

ALM, K. et al. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.210-213, 2006.

ALMOND, G.W. et al. **The AI book: a field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine**. 2 ed. Minitub of America, 1994. 108 p.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, supl. 1, p.145-150, 2005.
ARRUDA, R.P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 8-16, 2007.

AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reative oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 553-561, 2009.

BAILEY, J.L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251-1259, 2008.

BARCLAY, L.R.C. et al. Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble chainbreaking antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 106, n. 8, p. 2479-2481, 1984.

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

BORTOLOZZO, F.P. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO, F.P. & WENTZ, Ivo. Suinocultura em ação: inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Pallotti, 2005, cap. 2, p. 69-90.

BORTOLOZZO, F.P; WENTZ, I. Sucesso de um programa de IA em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 15-21, 1997.

BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 35, p. 1382-91, 2003.

BURTON, G. W.; JOYCE, A.; INGOLD, K. V. Is vitamin E the only lipid soluble, chain breacking in human blood plasma and erythrocyte membranes. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 221, n. 1, p. 281-290, 1983.

BUSSALEU, E.; TORNER, E. Quality improvement of boar seminal doses. In: BONET, S. et al. **Boar Reproduction: fundamentals and New Biotechnological Trends**. 1 ed. Berlin: Springer, 2013, p. 517-550.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2, p. 119-131, 2008.

CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99-111, 2000.

COLENBRANDER, B.; KEMP, B. Factors influencing semen quality in pigs. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 40, p. 105-115, 2000.

DE ANDRADE, A.F.C. de et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.

DE IULIIS, G.N. et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8- hydroxy-2-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 517-24, 2009.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II: depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.

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

DE LEEUW, F.E. et al. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 95-104, 1991.

DONNELLY, F.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.F.M. Antioxidant supplementation *in vitro* does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 484-486, 1999.

DYCK, M.K. et al. Biological markers of boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 55-58, 2011.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

- FOXCROFT, G.R. et al. Identifying usable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324-1336, 2008.
- GACZARZEWICZ, D. et al. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 582-594, 2015.
- GADEA, J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.
- GILLAN, L. et al. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n.2, p. 445-447, 2005.
- GLOSSOP, C. Semen collection, evaluation and handling. In: SWINE REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1996. **Proceedings**. American College of Theriogenologists and Society for Theriogenology and American Association of Swine Practitioners, 1996. p. 7-14.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R.; LONG, L.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation boar motility. **Theriogenology**, v. 70, p. 1209-1215, 2008.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p.14-22, 1991.
- HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, n. 2, p. 119-123, 2005.
- HERRERA, J. et al. Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. **Arch. Androl.**, v. 48, n. 2, p. 133-1339, 2002.
- HOOD, R.D.; FOLEY, C.W.; MARTIN, T.G. Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 30, n.1, p. 91-94, 1970.
- HSU, P.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p. 143-172, 2000.
- KUMARESAN, A. et al. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 162-171, 2009.
- MARIANO, M.S. **Características biológicas e bioquímicas do sêmen com diferentes resistências à conservação no estado líquido e ao congelamento**. 1988. 72p. Dissertação

(Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1988.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238, 2005.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

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

PALUDO, E.; BRESCIANI, L.; HILGEMANN, M.; TASSINARY, J.A.; STÜLP, S. Comportamento eletroquímico e avaliação da difusão *in vitro* do α -tocoferol associado à iontoforese. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1469-1473, 2014.

PAP, E.H.; DRUMMEN, G.P.; WINTER, V.J.; KOOIJ, T.W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K.W.; OP DEN KAMP, J.A.; HAGE, W.J.; POST, J.A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY^{581/591}. **FEBS Letters**, v. 453, p. 278- 282, 1999.

PEÑA, F.J. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.

POPWELL, J. M. & FLOWERS, L. W. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 97-113, 2004.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 541-549, 1973.

REIS, G.R. **Avaliação de machos suínos: sensibilidade ao resfriamento e capacidade de ligação espermática a um substrato sintético**. 2002. 91f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ERIKSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB “INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS”, 2000, Flores da Cunha. **Anais**. Porto Alegre: Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.13-33.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of art in farm sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.91-101, 2007.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 25, n. 1, 2004.

- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-78, 2006.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p. 609–619, 2007.
- STRYER, L. Selenometionina e vitamina C no sêmen. **Bioquímica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro- RJ, 1996.
- TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Ciência Animal**. Ed. Especial. 22(1), p. 365-375, 2012.
- TRABER, M.G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1501–1509, 1995.
- UEMOTO, D. **Comportamento estral e desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes intervalos pré-ovulatórios**. 1999. 100p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1999.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.; MACENAD, R.H.M.; BASTOS, V.P.D. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n.9, p. 213-219, 2014.
- WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n.1, p. 135-140, 1996.
- WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. **Inseminação artificial em suínos**. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I. Suinocultura Intensiva: Produção, Manejo e Saúde do Rebanho. 2 ed. Concórdia-SC, 1998.
- WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 10, n. 2, p. 103-117, 1998.
- ZHANG, G. F. et al. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. **Chemico-Biological Interactions**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 267–284, 2001.