

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE  
SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE COELHO**

Autora: Cristiane Arieta Alvarez  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Julho - 2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE  
SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE COELHO**

Autora: Cristiane Arieta Alvarez  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Julho - 2005



O Ser Vivo, tal qual foi criado por Deus, é um complexo, não obstante, uma unidade indivisível, onde todos os sistemas do ser atuam como um órgão só, e a vida como uma única função.

Vida que, a partir do momento da concepção, desenvolve-se de uma única célula a um ser com trilhões. Contudo, não há desarmonia. Tudo funciona corretamente, nos seus mínimos e, até mesmo, desconhecidos detalhes.

Um eterno e belo milagre de vida!!

Autor desconhecido

Dedico este trabalho aos meus filhos, Aline, Marina, Felipe e ao meu esposo Estevam,  
que superaram com alegria a ausência da mãe e esposa, durante todo curso.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida.

À Empresa Alltech's Global Foods Division, pela doação do Sel Plex<sup>®</sup> 50 para a confecção da ração para realização deste trabalho.

À Empresa Roche, pela doação do Rovimix<sup>®</sup> C-EC para confecção da ração para realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes, pela dedicada orientação, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Elias Nunes Martins, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao amigo Prof. MSc Pitágoras Augusto Piana, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Departamento de Zootecnia, UEM.

À Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá, em especial ao meu co-orientador Prof. Dr. Cláudio Scapinello pelo fornecimento de seus animais e de suas instalações para a execução deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da UEM, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas de curso, pela amizade, apoio e demonstração de companheirismo.

Aos funcionários da Fazenda Experimental da UEM, em especial o funcionário Ezulpério Salim da Silva pelo auxílio na realização das coletas de sêmen e preparação das rações do experimento.

Aos amigos Denise, Marcela e Rafael, pelo auxílio estimável durante o desenvolvimento do experimento.

Ao meu esposo Estevam José Alvarez que auxiliou nas coletas de sêmen e minha filha Aline Alvarez pela ajuda estimável nas análises laboratoriais.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

CRISTIANE ARIETA ALVAREZ, filha de Francisco Arieta e Marysia Cione Arieta, nasceu em Catanduva, São Paulo, no dia 11 de julho de 1963.

Em dezembro de 1985, concluiu o curso de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, e em dezembro de 1986, concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Em Dezembro de 2000, concluiu o curso de Especialização em Morfofisiologia pelo Departamento de Ciências Morfofisiológicas – DCM da Universidade Estadual de Maringá.

Contratada desde 2003 como Professora da disciplina Biofísica e Fisiologia dos cursos de Ciências Biológicas, Medicina Veterinária, Enfermagem, Farmácia e Educação Física pela Instituição Integrado Colégio e Faculdade de Campo Mourão, Paraná.

Em março de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução Animal.

No dia 15 de julho de 2005, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
<b>I - INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
Radicais Livres .....	1
Mecanismos de defesa antioxidante no sêmen .....	4
Vitamina C ou ácido ascórbico .....	5
Glutationa Peroxidase e selênio .....	7
Referências .....	11
<b>II - OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>III - Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho .....</b>	<b>16</b>
Resumo .....	16
Abstract .....	17
Introdução .....	18
Material e Métodos .....	20
Resultados e Discussão .....	25
Conclusões .....	32
Literatura Citada .....	33

<b>IV -</b>	<b>Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as morfo patologia espermática do sêmen de coelho.....</b>	<b>36</b>
	Resumo .....	36
	Abstract .....	37
	Introdução .....	38
	Material e Métodos .....	39
	Resultados e Discussão .....	44
	Conclusões .....	61
	Literatura Citada .....	62
<b>V -</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>65</b>

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
FIGURA 1. Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cor (CO) do sêmen em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	27
FIGURA 2. Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre a porcentagem de motilidade progressiva em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.....	28
FIGURA 3. Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre o vigor espermático (escore 0 - 5) em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	29
FIGURA 4. Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/Kg de ração) sobre a concentração espermática (CON X 10 <sup>5</sup> ) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	31
FIGURA 5. Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre o consumo de ração (CONS) dos coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	32

FIGURA 6.	Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre a porcentagem de espermatozoides normais em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	45
FIGURA 7.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a porcentagem de patologias totais (PT) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.....	46
FIGURA 8.	Espermatozoides com cauda bifurcada (A) e microcefalia (B) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, classificados como patologias primárias. Aumento de 40X em microscopia de contraste de fase .....	46
FIGURA 9.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a porcentagem de patologias espermáticas primárias (PP) em coelhos Novas Zelândia Branco com seis meses de idade .....	47
FIGURA 10.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a porcentagem de patologias espermáticas secundárias (PS) em coelhos Novas Zelândia Branco com seis meses de idade .....	47
FIGURA 11.	Espermatozoides com cauda dobrada, patologia secundária em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtido de fotografia em microscópio de contraste de fase, aumento de 100X.....	51
FIGURA 12.	Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cauda dobrada (CD) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	51

FIGURA 13.	Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cauda abaxial (CAB) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	52
FIGURA 14.	Espermatozóide com cabeça periforme em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, em fotografia obtida em microscópio de contraste de fase, aumento 40X .....	53
FIGURA 15.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre o número de cabeça periforme (CAPE) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	54
FIGURA 16.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre capuchão solto (CAPS) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	54
FIGURA 17.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre cabeça raquetiforme (CARE) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	55
FIGURA 18.	Espermatozóide com cauda solta em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtido em microscopia de contraste de fase, aumento 40X .....	56
FIGURA 19.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a patologia cauda solta (CAUSO) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	56

FIGURA 20.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a cauda enrolada na porção final (CENF) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.....	57
FIGURA 21.	Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre gota citoplasmática distal (GODI) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	58
FIGURA 22.	Espermatozóide com gota citoplasmática proximal em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtida de microscópio de contraste de fase, aumento 100X.....	59
FIGURA 23.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre gota citoplasmática proximal (GOPR) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	59
FIGURA 24.	Espermatozóide com microcefalia em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade. Foto obtida em microscópio de contraste de fase, aumento 40X .....	60
FIGURA 25.	Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre microcefalia (MICRO) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	61







**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
TABELA 1. Composição percentual e química da ração base .....	22
TABELA 2. Diferentes tratamentos com suplementações adicionais de selenometionina (SeM) e vitamina C (VC) fornecidos aos animais durante a fase experimental .....	23
TABELA 3. Diferentes níveis de selenometionina sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	26
TABELA 4. Diferentes níveis de vitamina C sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.....	27
TABELA 5. Diferentes níveis de selenometionina sobre as patologias espermáticas em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade .....	49
TABELA 6. Diferentes níveis de vitamina C sobre as patologias espermáticas em coelhos Nova Zelândia Branco em seis meses de idade .....	50



## RESUMO

### TÍTULO: “EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE COELHO”

O trabalho foi realizado com o objetivo de analisar os efeitos da selenometionina (SeM), vitamina C (VC) e a combinação de selenometionina e vitamina C sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade. Foram utilizados 125 coelhos machos, alojados individualmente e distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com vinte cinco tratamentos (rações com adição de selenometionina e vitamina C) e cinco repetições. As colheitas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas, totalizando oito colheitas por animal. Os parâmetros avaliados foram: volume, cor, pH, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática por mm<sup>3</sup> e, as morfopatologias espermáticas como: normais (NO), patologias totais (PT), patologias primárias (PP), patologias secundárias (PS), cauda dobrada (CD), cauda abaxial (CAB), cauda bifurcada (CABI), cabeça periforme (CAPE), capuchão solto (CAPS), cabeça raquetiforme (CARE), cabeça solta (CASO), cauda solta (CAUSO), cauda degenerada (CDE), cauda dobrada na porção final (CDF), cauda enrolada (CEN), cauda enrolada na porção final (CENF), cauda quebrada na porção final (CQF), cauda quebrada na porção inicial (CQI), cauda quebrada na porção intermediária (CQIN), cauda quebrada junto à cabeça (CQJC), edema de colo (EDCO), gota citoplasmática distal (GODI), gota citoplasmática proximal (GOPR), macrocefalia (MACRO), microcefalia (MICRO). Foram encontradas diferenças significativas em tratamentos com VC ( $P < 0,05$ ) com relação à cor do sêmen e concentração espermática. O volume com e sem gelatina, pH, motilidade espermática progressiva e vigor espermático não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pelos tratamentos. Não ocorreu interação entre a selenometionina e vitamina C

nos tratamentos, não influenciando as características do sêmen. O consumo de ração aumentou linearmente ( $P<0,05$ ), conforme os níveis de vitamina C foram aumentados nos tratamentos, não tendo sido influenciado pelos diferentes níveis de selenometionina. Dentre as morfolopatologias espermáticas notou-se que foram influenciadas pelos tratamentos de SeM e VC ( $P<0,05$ ): PT, PP, PS, CD, CAB, CAPS, CARE, CAUSO, CENF, GODI, GOPR, MICRO; as demais não foram influenciadas por SeM e VC ( $P>0,05$ ). Os tratamentos com SeM e VC aumentaram as patologias: PT, PP, CD, CAB, CARE, CAUSO, GODI até níveis intermediários e depois voltaram a decrescer. A GOPR foi reduzida até o nível de 300 mg de SeM/kg de ração, mostrando a eficiência do selênio com relação ao amadurecimento dos espermatozóides. A microcefalia apresentou um efeito linear positivo com relação à vitamina C, diminuindo o número de microcefalias à medida que houve o aumento nos níveis de vitamina C, demonstrando o efeito de proteção antioxidante sobre os espermatozóides. Como conclusão observou-se que alguns parâmetros quantitativos e qualitativos (cor do sêmen e concentração de espermatozóides) e algumas morfolopatologias (MICRO E CAUSO), melhoraram com a inclusão principalmente da vitamina C.

**Palavras-chave:** coelhos, morfologia espermática, selenometionina, sêmen, vitamina C.

## ABSTRACT

TITLE: “EFFECT OF SUPPLEMENTATION SELENOMETHIONINE AND VITAMIN C ON SEMEN CHARACTERISTICS IN RABBIT”

The work was carry out to analyse the effects of the selenomethionine, vitamin C and the combination of selenomethionine and vitamin C on semen characteristics in New Zealand White rabbits with six months of age. Were used 125 rabbits male, kept individually in cage and distributed in completely randomized design with twenty five treatments (vitamin C and selenomethionine added in the diets) and five replications. Semen was collected once a week, during eight weeks, totalizing eight collects by animal. The evaluated parameters were: volume, color, pH, progressive motility, spermatic vigor, and spermatic concentration/mm<sup>3</sup> and, spermatic morphopathologies: NO – normal; PT - total pathologies; PP – primary pathologies; PS – secondary pathologies; CD - bent tail; CAB – abaxial tail; CABI - forked tail; CAPE - pyriform head; CAPS - free cap; CARE - raquetiform head; CASO - tailless; CAUSO - headless; CDE - degenerate tail; CDF - final bent tail; CEN - coiled tail; CENF - final coiled tail; CQF - final broken tail; CQI – initial broken tail; CQIN – mid-piece broken tail; CQJC - tail broken close head; EDCO – swollen neck; GODI – distal droplet; GOPR – proximal droplet; MACRO – sperm macrocephalic; MICRO – sperm microcephalic. There was a significant difference to the treatments with VC (P <0.05) considering the color and spermatic concentration. Volume with and without gelatin, pH, progressive motility and spermatic vigor didn't show significant differences (P>0.05) among the treatments. There wasn't interaction between the selenomethionine and vitamin C in the treatments, not influencing semen characteristics. The ration intake increased lineally according to the increasing of vitamin C levels in the treatments, but there wasn't any effect of selenomethionine levels. Considering the spermatic morphology the following parameters were influenced by treatments of SeM and VC (P<0.05): PT, PP, PS, CD, CAB, CAPS, CARE, CAUSO, CENF, GODI, GOPR, MICRO, but the others were not

influenced ( $P>0.05$ ) by the same treatments. The treatments with SeM and VC increased the parameters until on intermediate level, reducing them later: PT, PP, CD, CAB, CARE, CAUSO and GODI. The GOPR was reduced until the intermediate levels of 300 mg SeM/kg of ration, showing the efficiency of the selenium in the spermatozoa maturation. The sperm microcephalic parameter presented a positive linear effect related to the vitamin C, decreasing the sperm microcephalic number as there was the vitamin C increased, showing the effect of antioxidant protection in the spermatozoa. As conclusion it was observed that some quantitative and qualitative parameters (color and spermatic concentration) and some morphopathologies (MICRO and CAUSO) improved with the inclusion of, vitamin C.

**Key words:** rabbits, selenomethionine, semen, spermatic morphologies, vitamin C.

## **I – Introdução Geral**

### **Radicais Livres**

Uma das hipóteses que envolvem a diminuição da qualidade do sêmen dos animais é a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que são radicais livres, isto é, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados (Stryer, 1996). Entre as espécies reativas ao oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o óxido nítrico. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as EROs, primariamente formadas, sendo que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado através de reações enzimáticas ou não enzimáticas do ânion superóxido (Halliwell & Gutteridge, 1999). Porém, a ERO mais reativo e prejudicial é o radical hidroxila, que pode ser formado através do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e do ânion superóxido e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, produzindo o peroxinitrito, que então, irá se decompor em  $\text{NO}_2$  e  $\text{OH}^-$  (Halliwell, 1991). O ânion superóxido, gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas celulares, ficando restrito ao compartimento onde é produzido (Halliwell & Gutteridge, 1999). O ânion superóxido parece ser o produto primário do sistema de produção de EROs, gerando o peróxido de hidrogênio após reações enzimáticas



(Nordberg & Árner, 2001). De acordo com estes autores, a formação do superóxido acontece espontaneamente, em ambientes aeróbicos, ricos em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória.

O  $H_2O_2$  não é um radical livre, porém é importante, principalmente, devido à sua habilidade de penetrar em membranas biológicas (Halliwell, 1991). Esta substância age como intermediário na formação de mais moléculas de EROs, como o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) formado pela oxidação de metais de transição. A remoção do  $H_2O_2$  ocorre por pelo menos dois sistemas enzimáticos antioxidantes, a catalase e a glutathione peroxidase (Mates et al., 1999).

Distúrbios na produção de oxidante / antioxidante, em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo (Aitken, 1995). Em princípio, o estresse oxidativo pode ser causado por redução na quantidade de antioxidante nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de EROs (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As células espermáticas humanas são altamente susceptíveis aos danos causados pelas EROs, devido à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (Aitken & Fishel, 1994). As EROs também produzem extensivos danos às proteínas, modificam o citoesqueleto e causam alterações de mecanismos celulares (Sharma & Agarwal, 1996). A célula espermática humana faz parte de uma lista de células que exibem a capacidade de gerar EROs quando incubadas em condições anaeróbicas (Aitken & Baker, 2002). A produção espermática de Eros, no homem, ocorre principalmente por células morfológicamente anormais e dentre estas,

especialmente as células que possuem gota proximal e distal (Gomes et al., 1998). Sendo assim, acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerarem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que serviria como fonte de elétrons para a produção de EROs (Aitken & Baker, 2002).

Estudos realizados por vários pesquisadores indicam que o  $H_2O_2$  é a ERO que causa mais danos aos espermatozóides *in vitro*, devido à sua alta capacidade em penetrar membranas biológicas (Aitken et al., 1993; Armstrong et al., 1999). Armstrong et al. (1999) sugeriram que  $H_2O_2$  possui funções deletérias, atuando na diminuição da motilidade espermática nos homens.

Espermatozóides imóveis e espermatozóides morfológicamente normais humanos, porém, funcionalmente anormais, são também fontes de EROs (Engel et al., 1999).

A produção de EROs pelos espermatozóides dos homens é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para fusão espermatozóide / ovócito (De Lamirande & Gagnon, 1993). Apesar do efeito fisiologicamente normal das EROs na fisiologia espermática, um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs no sêmen causa efeitos prejudiciais aos espermatozóides (De Lamirande & Gagnon, 1995). A excessiva produção de EROs, também chamada de estresse oxidativo positivo, ocorre tanto pelo excesso de EROs como pela diminuição de antioxidantes (De Lamirande & Gagnon, 1995).

Kessopoulo et al. (1994) verificaram que, em sêmen humano, a maior fonte de produção de EROs seriam os leucócitos presentes mesmo em homens férteis. No entanto, Wolff (1995) sugeriu que os EROs, gerados por leucócitos, são deletérios às

células espermáticas humanas apenas na ausência de sistemas antioxidantes, como são vistos em infecções agudas nos testículos e epidídimo. Espermatozóides normais e não funcionais parecem gerar radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) em maiores taxas que aqueles saudáveis. Geração excessiva de EROs no sêmen pode ser uma consequência de infertilidade (Aitken & Fishel, 1994). Zini et al. (2000) observaram que o plasma seminal de homens inférteis não eram deficientes em enzimas superóxido dismutase e/ou catalase, e que o elevado teor de EROs no sêmen de alguns homens inférteis se deve a produção excessiva de EROs e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes. Halliwell & Gutteridge (1989) evidenciaram que as células somáticas humanas contêm antioxidantes em seu citoplasma, mas que, os espermatozóides perdem a maioria do seu citoplasma durante o processo de maturação, levando-os a perderem os mecanismos endógenos de reparo e defesa enzimáticas observados em outros tipos celulares. Contudo, estes autores destacaram que os espermatozóides são protegidos dos ataques oxidativos pelo plasma seminal que contém uma quantidade grande de enzimas oxidativas, tais como, a superóxido dismutase e a catalase que remove os EROs.

### **Mecanismos de defesa antioxidante no sêmen**

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato (Halliwell & Gutteridge, 1989).

O espermatozóide das espécies animais possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as EROs, que consiste, principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase (SDO), catalase, glutatona peroxidase (GPx) e a redutase, bem como, antioxidante não enzimáticos como: ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol

ou vitamina E (Aitken, 1995). Extracelularmente, o espermatozóide do homem é protegido pelo plasma seminal que contém vários redutores de EROs enzimáticos e não enzimáticos, contribuindo para uma poderosa atividade antioxidante (Zini et al., 2000), destacando-se o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, glutathione e outros tiois, taurina, hipotaurina e  $\alpha$ -tocoferol. Foi descoberto, recentemente, que a tirosina, também exerce um papel importante como antioxidante no plasma seminal (Van Overveld et al., 2000).

### **Vitamina C ou ácido ascórbico**

As vitaminas antioxidantes protegem as membranas plasmáticas, reagindo com e removendo os radicais livres, assim destruindo a cadeia de reações (Eichner, 1994). Para este autor, mantendo uma dieta que forneça níveis apropriados de vitaminas antioxidantes, especialmente, a vitamina C e E ocorreria a redução dos danos nas membranas celulares.

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante (Eichner, 1994). A vitamina C reduz o  $\alpha$ -tocoferol, peróxidos e EROs, como superóxidos e age também, prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (Nordberg & Árner, 2001). Porém, quando ingerida em dose elevada ou na presença de metais como ferro ou cobre, a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando a lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999). *In vitro*, a mistura Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos, levando a formação de radicais livres, os quais danificam o ácido desoxirribonucléico (ADN), lipídios e proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O ácido ascórbico (vit. C) é um dos componentes não enzimáticos que atuam como antioxidante e é essencial nas dietas de humanos e outros mamíferos e foi relacionado com a fertilidade (Millar, 1992). Alguns mamíferos como o homem, o porco da índia e os morcegos não sintetizam o ácido ascórbico por não sintetizarem a enzima L- gulonalactona oxidase, assim, os níveis de ácido ascórbico, nestes animais, diminuem em períodos que ocorrem restrições alimentares (Levine & Morita, 1985). Gonul & Kaplan (1999) verificaram que a restrição alimentar induzida causou a perda de peso de porcos da índia, mesmo tendo sido preservado os níveis ideais de vitamina C, via suplementação. Contudo, os autores constataram que ao testarem a peroxidação oxidativa no plasma com o ácido tiobarbitúrico (SRAT), os níveis de peroxidação se elevaram, mesmo tendo havido suplementação com ácido ascórbico, indicando a ausência de ação antioxidante no plasma sanguíneo, nesta condição de restrição alimentar.

Yousef et al. (2003) demonstraram, em coelhos machos, que a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) foi significativamente diminuída com a suplementação de ácido ascórbico (vit. C) e  $\alpha$ -tocoferol (vit. E). Resultados semelhantes foram encontrados em caprinos por Brzezinska-Slebodzinska et al. (1995) e em humanos por Geva et al. (1996) ao descreverem que a suplementação de vitamina E e/ou vitamina C reduziram as espécies reativas ao oxigênio (EROs), melhorando assim, a taxa de fertilização por reduzir a peroxidação lipídica. Fraga et al. (1991) demonstraram que o ácido ascórbico está presente em altas concentrações no plasma seminal humano comparado com o plasma sanguíneo (400 vs 60  $\mu$ M), presumivelmente, refletindo o importante papel fisiológico. Além disso, o ácido ascórbico é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal,

atuando na prevenção de danos oxidativos ao ADN. Portanto, o dano oxidativo no ADN do espermatozóide resultaria em infertilidade e defeitos congênitos nas proles.

A eficiência do ácido ascórbico como antioxidante também foi demonstrada em estudos onde a suplementação de ácido ascórbico teve efeitos benéficos sobre as características do sêmen e os níveis de testosterona em coelhos (Salem et al., 2001). Foi sugerido por Thiele et al. (1995) que as concentrações de ácido ascórbico no plasma seminal humano estão correlacionadas, positivamente, com as porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais e também foi sugerido que esta vitamina é protetora do epidídimo, agindo como proteção antioxidante das membranas celulares. Chinoy et al. (1986) relataram que o ácido ascórbico é importante para a manutenção fisiológica da integridade dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias e a deficiência de vitamina C nas dietas causariam rápida degeneração do sistema reprodutivo como um todo, como foram demonstrados pelos autores nas espécies de porcos da Índia.

Sonmez et al. (2005) investigaram os efeitos da suplementação de ácido ascórbico sobre a qualidade do sêmen, peroxidação lipídica e os níveis de testosterona no plasma sanguíneo de ratos Wistar. Os autores concluíram que a suplementação do ácido ascórbico não aumentou o peso corporal, o peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata, mas a suplementação aumentou, significativamente, a concentração de ácido ascórbico nos testículos e plasma sanguíneo, diminuindo, consideravelmente, os níveis de peroxidação lipídica.

Altas concentrações de ácido ascórbico no sêmen de espécies como os homens e os peixes parecem ter um papel chave na manutenção da integridade genética das

células espermáticas, prevenindo danos oxidativos ao ADN dos espermatozóides (Fraga et al., 1991; Dabrowski & Ciereszko, 1996).

### **Glutationa peroxidase e selênio**

Dentre os sistemas enzimáticos, destaca-se a Glutationa Peroxidase (GPx) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus álcoois correspondentes, convertendo Glutationa – forma reduzida (GSH) a Glutationa – forma oxidada (GSSG), que contem duas moléculas ligadas por uma ligação dissulfeto, sendo o selênio essencial para a atividade da enzima (Nordberg & Árner, 2001). Esta enzima contém um átomo de selênio (Se) ligado, covalentemente, na forma de selenocisteína (Maiorino et al., 2003). Em mamíferos existe GPx de 1 a 4 (Imai & Nakagawa, 2003). Recentemente, estes autores descobriram que a GPx 4 tem dupla função na célula espermática: é enzimaticamente ativa na espermátide e insolúvel, funcionando como uma proteína estrutural no espermatozóide maduro. Destacaram também que a GPx 4 pode reagir com peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios, sendo portanto, considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidativos.

Nos testículos, a GPx 4 encontra-se presente na forma de três isoformas que são derivadas dos mesmos genes e localizadas no citosol, mitocôndria e núcleo, tendo a função de auxiliar no desenvolvimento dos espermatozóides por proteger contra espécies reativas ao oxigênio (Beckett & Arthur, 2005). Estes autores constataram que homens com baixa fertilidade devido à reduzida concentração e pobre qualidade dos espermatozóides, continham pouca GPx nos espermatozóides.

Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a esfera reprodutiva de todas as espécies de machos e fêmeas (Noguchi et al., 1973). De acordo com Hafeman et al. (1974), a atividade da glutathiona peroxidase, nos tecidos de ratos, cai drasticamente em animais com dietas deficientes em selênio e aumenta quando ocorre reposição de selênio.

O selênio é encontrado e utilizado em dietas animais como selenito de sódio ou na forma orgânica como selenometionina e selenocisteína (Thompson & Stewart, 1973). Raras são as pesquisas que mostram a eficiência da forma selenometionina sobre a forma inorgânica, selenito de sódio. Mas, sabe-se que a forma selenometionina, por estar associada a aminoácidos, torna-se mais biodisponível por não apresentar cargas elétricas, favorecendo assim, sua absorção ao nível de trato gastrointestinal (Whanger & Butler, 1988).

Foi observado por Lane et al. (1979) que o aumento nas concentrações de selênio, nem sempre é observado um correspondente aumento na atividade da glutathiona peroxidase (GPx), indicando que a GPx não poderia ser usada para monitorar o selênio em ratos, especialmente, se a forma de selênio administrada for como selenometionina.

Thompson & Stewart (1973) demonstraram, em ratos, que a absorção intestinal de selenito e selenometionina é equivalente a 92% de selenito e a 96% de selenometionina, mas a retenção total no corpo indicou que a excreção do selenito absorvido foi maior do que a selenometionina.

A Glutathiona-S-Transferase (GST) consiste de quatro principais classes: alfa (A), mu (M), pi (P) e theta (T), envolvidas na detoxificação de muitos compostos eletrofílicos pela conjugação de reações com a Glutathiona. Foi demonstrado que a glutathiona e a glutathiona-S-transferase teriam um importante papel na reprodução, mas



as pesquisas sobre a glutatona e glutatona-S-transferase no plasma seminal são limitadas (Ochsendorf et al., 1998). Entretanto, para Raijmakers & Maarten (2003), a glutatona-S-transferase está presente em quantidade considerável na maioria dos plasmas seminais de homens férteis, mostrando assim, que a glutatona parece ter um papel na fertilidade porque as concentrações de glutatona no plasma seminal estavam altas nos machos férteis, por melhorar a motilidade espermática e a morfologia dos espermatozóides.

Para Castellini et al. (2002), a suplementação de selênio na dieta aumentou a atividade da glutatona peroxidase (GPx) nos eritrócitos e sêmen de coelhos, mas a estabilidade oxidativa dos espermatozóides não foi observada.

Behne et al. (1996) estudaram quatro gerações de ratos alimentados com deficiência em selênio. As gônadas dos machos das quatro gerações mostraram atrofia bilateral e diminuição nos diâmetros dos túbulos seminíferos, indicando que a morfologia e função testicular são severamente alteradas na deficiência de selênio, principalmente, a biossíntese da testosterona e o desenvolvimento normal dos espermatozóides.

Trabalhando com sêmen de carneiros, Sarlós et al. (2002) avaliaram o efeito de vários antioxidantes, entre eles, a glutatona peroxidase, e observaram que a adição de antioxidante prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozóide e reduz o grau de danos celulares.

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado, porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que o papel exercido pelos sistemas de defesa antioxidante do

espermatozóide e do plasma seminal contra os danos oxidativos causados pelas EROs é evidente.

Esta revisão acompanha os trabalhos experimentais a seguir, proporcionando um melhor entendimento das características que foram avaliadas durante todo o experimento.

## Referências

- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.40, p.183-197, 1989.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- 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.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v.16, p.259-267, 1994.
- 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.
- ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p.869-880, 1999.
- BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v.184, p.455-465, 2005.
- BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. et al. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.2, p.291-297, 1996.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p.69-74, 1995.

- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A. et al. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v.58, p.1723-1732, 2002.
- CHINOY, N.J.; BUCH-NEE, R.P.; MELITA, R.R. et al. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **International Journal of Fertility**, v.31, p.232-239, 1986.
- DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. **Experientia**, v.52, p.97-100, 1996.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p.255-265, 1993.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa : a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, n.1, p.15-21, 1995.
- EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), **PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH.**, Champaign, Illinois: Human Kinetics, p.35-42, 1994.
- ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A. ; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v.88, p.11003-11006, 1991.
- GEVA, E.; BARTOOV, B.; ZABLUDOVSKY, N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an *in vitro* fertilization program. **Fertility and Sterility**, v.66, p.430-434, 1996.
- GOMES, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v.21, p.81-94, 1998.
- GONUL, B.; KAPLAN, B. Effects of vitamin C supplementation on plasma antioxidant status in unfed periods. **General Pharmacology**, v.32, p.195-199, 1999.
- HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**, v.104, p.580-587, 1974.
- 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.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.543p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: New York, 1999.936p.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx 4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, n.2, p.145-169, 2003.
- KESSOPOULO, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRATT, C.L. et al. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.463-470, 1994.
- LANE, H.W.; STRENGTH, R.; JOHNSON, J. et al. Glutathione peroxidase activity in intestinal and liver tissues of rats fed various levels of selenium, sulfur and  $\alpha$ -tocopherol. **Journal of Nutrition**, v.109, p.444-452, 1979.
- LEVINE, M; MORITA, K. Ascorbic acid in endocrine systems. **Vitamins & Hormones**, v.42, p.1-64, 1985.
- MAIORINO, M.; BOSELLO, V.; URSINI, F. et al. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in human. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1134-1141, 2003.
- MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.595-603, 1999.
- MILLAR, J. Vitamin C: the primate fertility factor?. **Medical Hypotheses**, v.38, p.292–295, 1992.
- NOGUCHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **Journal of Nutrition**, v.103, p.1502-1511, 1973.
- NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- OCHSENDORF, F.R.; BUHL, R.; BASTLEIN, A. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Human Reproduction**, v.13, p.353-359, 1998.
- RAIJMAKERS, M.; MAARTEN, T.M. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.79, n.1, p.169-172, 2003.
- SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I. et al. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxicology**, v.162, p.209-218, 2001.

- SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, n.6, p.835-850, 1996.
- SONMEZ, M.; TURK, G. ; YUCE, A. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, (Prelo), 2005.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.1000p.
- THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J. et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma : determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v.10, p.110-155, 1995.
- THOMPSON, C.D.; STEWART, R.D.H. Metabolic studies of [<sup>75</sup> Se] selenomethionine and [<sup>75</sup> Se] selenite in the rat. **British Journal of Nutrition**,v.30, p.139-147, 1973.
- VAN OVERVELD, F.WG.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV, J. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico Biological Interactions**, v.127, p.151-161, 2000.
- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **Journal of Nutrition**, v.118, p.846-852, 1988.
- WOLFF, H. The biological significance of white blood cells in semen. **Fertility and Sterility**, v.63, p.1143-1157, 1995.
- YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.99-111, 2003.
- ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, n.6, p.922-926, 2000.

## **II – Objetivo Geral**

Determinar a influência de diferentes níveis de selenometionina e vitamina C sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

### **III – Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho**

#### **RESUMO**

Foram avaliadas as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelhos alimentados com rações, contendo diferentes níveis de selenometionina e vitamina C. Foram utilizados 125 coelhos machos Nova Zelândia Branco, com idade média de seis meses, alojados individualmente e distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com vinte cinco tratamentos (rações com adição de selenometionina e vitamina C) e cinco repetições. As colheitas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas, totalizando oito colheitas por animal. Os parâmetros avaliados foram: volume, cor, pH, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração espermática por  $\text{mm}^3$ . Foi observada diferença significativa entre os tratamentos com VC ( $P < 0,05$ ) com relação à cor e concentração espermática. O volume com e sem gelatina, pH, motilidade espermática progressiva e vigor espermático não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Não ocorreu interação entre a selenometionina e vitamina C nos tratamentos, não influenciando as características do sêmen. O consumo de ração aumentou linearmente ( $P < 0,05$ ), conforme os níveis de vitamina C foram aumentados nos tratamentos, não tendo sido influenciado pelos diferentes níveis de selenometionina. Com base nas condições em que o trabalho foi conduzido foi possível constatar que a vitamina C melhoraram a cor e concentração espermática em coelhos e que a vitamina C aumentou o consumo de ração.

**Palavras-chave:** coelhos, selenometionina, sêmen, vitamina C.

### **III – Effect of supplementation of selenomethionine and vitamin C on quantitative and qualitative semen characteristics of rabbit**

#### **ABSTRACT**

Quantitative and qualitative semen characteristics of rabbits fed with rations containing different selenomethionine and vitamin C levels were studied. Were used 125 News Zealand White male rabbits, with six months of age, kept individually in cage and distributed in a completely randomized design with twenty five treatments (vitamin C and selenomethionine added in the diets) and five replications. Semen was collected once a week, during eight weeks, totalizing eight collects by animal. The following parameters were evaluated: volume, color, pH, progressive motility, spermatic vigor, and spermatic concentration/mm<sup>3</sup>. Significant difference ( $P < 0.05$ ) was observed to the treatments with VC considering the semen color and spermatic concentration. Volume with and without gelatin, pH, progressive motility and spermatic vigor didn't show significant differences ( $P > 0.05$ ) among the treatments. There wasn't interaction between the selenomethionine and vitamin C in the treatments, not influencing semen characteristics. The ration intake increased lineally according to the increasing of the vitamin C levels in the treatments, but there wasn't any effect of selenomethionine levels. With these results and the conditions that this experiment was carried out it's possible to conclude that vitamin C improved the semen color and spermatic concentration and vitamin C increased the ration intake.

**Key words:** rabbits buck, selenomethionine, semen, vitamin C.



## **Introdução**

A cunicultura, como atividade de exploração animal intensiva, tem passado por diversas modificações nos últimos anos, oriundas das buscas constantes de técnicas que melhorem a produtividade, destacando-se aquelas relacionadas à reprodução de machos e fêmeas (Andreazzi, 2002).

Ao contrário do que ocorrem com as coelhas, poucos trabalhos têm focado o desempenho reprodutivo dos machos. Algumas pesquisas têm se reportado sobre as características do sêmen (Battaglini et al., 1992; Castellini et al., 2002), porém, poucas se referem a fatores específicos, como uma suplementação na dieta (Luzi et al., 1996; Castellini et al., 2002).

Os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (Poulos et al., 1973). Os danos peroxidativos induzem a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que é uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (Hsu et al., 1998).

Foi descrito que 40% dos homens inférteis têm quantidades detectáveis de ERO no sêmen, e não foi detectável atividade de EROs no sêmen de homens férteis (Zini et al., 1993). Estudando sêmen de homens, Aitken et al. (1989) observaram que a produção elevada de EROs reduz a motilidade espermática.

Inúmeros antioxidantes têm beneficiado o tratamento de machos inférteis, tais como a vitamina C, vitamina E, glutathione e a coenzima Q10 (Sinclair, 2000). Ao fornecer dietas com níveis apropriados de vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina C e E, ocorreria a redução dos danos nas membranas celulares (Eichner, 1994).

Frei et al. (1990) demonstraram que o ácido ascórbico agiu como fator de defesa primária no plasma sanguíneo contra os radicais livres. O ácido ascórbico também está presente em altas concentrações no plasma seminal comparado com o plasma sanguíneo (400 vs. 60  $\mu\text{M}$ ), presumivelmente, refletindo o importante papel fisiológico, sendo assim, a relação entre o dano oxidativo do espermatozóide e os níveis altos de ácido ascórbico no plasma seminal são de grande interesse (Fraga et al., 1991).

Dawson et al. (1992) indicaram melhora na viabilidade do espermatozóide, diminuição na percentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática após suplementação com vitamina C, em experimento com homens fumantes de 25 anos de idade, quando a ingestão de 1,0 g/dia de ácido ascórbico foi suplementada. Luck et al. (1995) descreveram que o ascorbato poderia ser considerado como essencial para o processo reprodutivo humano.

Outro elemento implicado na degradação dos peróxidos de hidrogênio é o selênio (Se) (Alvarez & Storey, 1989). O selênio é um cofator da Glutathione Peroxidase (GPx), uma das enzimas que catalisa a degradação dos peróxidos (Whanger & Butler, 1988). A atividade GPx é encontrada no sêmen de várias espécies, entre elas os coelhos e caprinos (Virag & Mézes, 1994; Marin-Guzman et al., 1997), no qual tem diferentes papéis de proteção na degradação de hidroperóxidos.

O selênio utilizado em dietas de animais é encontrado como selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) ou na forma orgânica como selenometionina (Se-Met) e selenocisteína (Se-Cys) (Whanger & Butler, 1988). Thompson & Stewart (1973) demonstraram que a

absorção intestinal de selenito de sódio é de 92% e selenometionina é de 96% e a retenção total no corpo indica que a excreção do selenito absorvido é maior do que a do selenometionina.

Assim, objetivou-se com este trabalho, demonstrar a influência das suplementações adicionais de vitamina C e selenometionina em parâmetros do sêmen, incluindo volume (mL), cor, pH, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração de espermatozóiide ( $\text{mm}^3$ ).

## **Material e Métodos**

### **3.1 – Local e animais**

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, de março a julho de 2004. Foram utilizados 125 coelhos machos Nova Zelândia Branco, com idade média de seis meses, alojados individualmente em gaiolas de arame galvanizado medindo 40 cm X 60 cm X 45 cm (comprimento, largura e altura), respectivamente, providas de bebedouro automático e comedouro semi-automático, instalados em galpão de alvenaria com cobertura de fibroamianto. Os animais foram mantidos por um período preliminar de oito semanas em dieta base sem suplementações e, posteriormente, foi realizada uma triagem para a formação dos grupos de tratamentos, que constaram de cinco animais por tratamento. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental fatorial inteiramente casualizado, com vinte e cinco tratamentos (rações com adições de níveis diferentes de vitamina C e selenometionina) e cinco repetições.

O modelo estatístico foi:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_1 \text{SeM}_i + b_2 \text{VC}_j + b_3 \text{SeM}_i \text{VC}_j + b_4 \text{SeM}_i^2 + b_5 \text{VC}_j^2 + e_{ijk}$$

onde:

$Y_{ijk}$  = a observação no animal  $k$ , alimentado com ração contendo o nível  $i$  de selenometionina e o nível  $j$  de vitamina C;

$b_0$  = constante geral;

$b_1$  = coeficiente linear de regressão de  $Y$  em função do nível de selenometionina;

$b_2$  = coeficiente linear de regressão de  $Y$  em função do nível de vitamina C;

$b_3$  = coeficiente de regressão de  $Y$  em função da interação entre  $i$  de selenometionina e  $j$  de vitamina C;

$b_4$  = coeficiente quadrático de regressão de  $Y$  em função do nível  $i$  de selenometionina;

$b_5$  = coeficiente quadrático de regressão de  $Y$  em função do nível  $j$  de vitamina C;

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ijk}$ .

Foi empregada a metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972), usando-se o software GLIM 4.0, em que o modelo estatístico foi o mesmo empregado anteriormente, sendo as características estudadas comparadas por meio do teste F ( $P < 0,05$ ). Para os gráficos foi utilizado o software STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2003).

As rações foram formuladas com base nas exigências do AEC (1987) para coelhos em reprodução (Tabela 1) em que de acordo com Andreazzi (2002) continham em 90% de matéria seca, 17% de amido, 16% de proteína bruta, 35% de fibra em detergente neutro (FDN), 17% de fibra em detergente ácido (FDA), 3,65% de extrato etéreo (ácido graxo saturado – 0,54% e ácido graxo insaturado – 3,11%) e 2.599 Kcal/kg de energia digestível, consistindo de uma ração base acrescida do suplemento (Tabela 2), e seu fornecimento foi, em média, de 100 gramas/animal/dia durante 4 meses, com água à vontade. As rações foram elaboradas para serem consumidas em um mês para evitar a perda de princípio ativo dos produtos. O selenometionina com 1,0 mg de selênio/kg (Sel-Plex<sup>®</sup> 50 - Alltech Inc.) e a vitamina C com 98% de pureza (Rovimix<sup>®</sup> C-EC – Roche) foram pesados em balanças analíticas e adicionados às rações tratamentos. As

rações bases mais às adições de selenometionina e vitamina C, de acordo com cada tratamento, foram misturadas em misturador Y por um tempo de 15 minutos e posteriormente, processadas pelo método de peletização, em que os tamanhos dos péletes obtidos foram de 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento. Depois de peletizadas foram secas ao ar livre e ensacadas em sacos etiquetados de acordo com cada tratamento.

Tabela 1 – Composição percentual e química da ração base

*Table 1 – Percentual and chemical composition of the basic ration*

<b>Ingredientes</b> <i>Ingredient</i>	<b>%</b> <i>%</i>	<b>Unidade</b> <i>Unit</i>	<b>Ração Base</b> <i>Basic Ration</i>
Milho <i>Corn</i>	25,6	kg	77,00
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	14,0	kg	42,00
Farelo de Trigo <i>Wheat meal</i>	24,0	kg	72,00
Feno de Alfafa <i>Alfalfa hay</i>	23,3	kg	50,00
Feno de Coast Cros <i>Coast Cros hay</i>	10,0	kg	50,00
Sal Comum <i>Common salt</i>	0,4	kg	1,20
Fosfato bicálcico <i>Dicalcium phosphate</i>	0,8	kg	2,40
Calcário Calcítrico <i>Limestone</i>	1,0	kg	3,00
DL – Metionina <i>DL- Methionine</i>	-	kg	0,40
Bacitracina <i>Bacitracin</i>	0,05	kg	0,15
Cicostat Robenidina <i>Cycostat Robenidin</i>	0,083	kg	0,25
Mist. Vit + Min. <sup>1</sup> <i>Premix vit+min.<sup>1</sup></i>	0,5	kg	1,50
<b>Total</b>			<b>300,00</b>

<sup>1</sup> Nuvital, composição por kg do produto: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200 mg ; Vit B12, 2.000mcg; Ac. Pantotênico, 2.000 mg; Colina, 70.000 mg; Ferro, 8.000 mg; Cobre, 1.200 mg; Cobalto, 200 mg; Manganês, 8.600 mg; Zinco, 12.000 mg; Iodo, 64 mg; Selênio, 16 mg; Metionina, 120.000 mg; Antioxidante, 20.000 mg.

<sup>1</sup> *Vitamin-mineral premix composition per kg: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200mg; Vit B12, 2.000mcg; Panthotenic acid, 2.000 mg; Choline, 70.000 mg; Iron, 8.000 mg; Copper, 1.200 mg; Cobalt, 200 mg; Manganese, 8.600 mg; Zinc, 12.000 mg; Iodine, 64 mg; Selenium, 16 mg; Methionine, 120.000 mg; Sinox, 20.000 mg.*

Os 125 coelhos machos Nova Zelândia Branco foram submetidos à análise do sêmen antes da formação dos grupos e foram distribuídos nos tratamentos apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Diferentes tratamentos com suplementações adicionais de Selenometionina (SeM)\* e Vitamina C (VC)\*\* fornecidos aos animais durante a fase experimental

*Table 2 - Different treatments with additional supplementation of Selenomethionine (SeM)\* and Vitamin C (VC)\*\* supplied to the animals during the experimental phase*

Tratamentos	N	Selenometionina (mg/kg ração)	Vitamina C (mg/kg ração)
<i>Treatments</i>	<i>N</i>	<i>Selenomethionine (mg/kg ration)</i>	<i>Vitamin C (mg/kg ration)</i>
T1 - SeM <sub>0</sub> VC <sub>0</sub>	5	0	0
T2 - SeM <sub>0</sub> VC <sub>300</sub>	5	0	300
T3 - SeM <sub>0</sub> VC <sub>225</sub>	5	0	225
T4 - SeM <sub>0</sub> VC <sub>150</sub>	5	0	150
T5 - SeM <sub>0</sub> VC <sub>75</sub>	5	0	75
T6 - SeM <sub>150</sub> VC <sub>0</sub>	5	150	0
T7 - SeM <sub>150</sub> VC <sub>300</sub>	5	150	300
T8 - SeM <sub>150</sub> VC <sub>225</sub>	5	150	225
T9 - SeM <sub>150</sub> VC <sub>150</sub>	5	150	150
T10 - SeM <sub>150</sub> VC <sub>75</sub>	5	150	75
T11 - SeM <sub>300</sub> VC <sub>0</sub>	5	300	0
T12 - SeM <sub>300</sub> VC <sub>300</sub>	5	300	300
T13 - SeM <sub>300</sub> VC <sub>225</sub>	5	300	225
T14 - SeM <sub>300</sub> VC <sub>150</sub>	5	300	150
T15 - SeM <sub>300</sub> VC <sub>75</sub>	5	300	75
T16 - SeM <sub>450</sub> VC <sub>0</sub>	5	450	0
T17 - SeM <sub>450</sub> VC <sub>300</sub>	5	450	300
T18 - SeM <sub>450</sub> VC <sub>225</sub>	5	450	225
T19 - SeM <sub>450</sub> VC <sub>150</sub>	5	450	150
T20 - SeM <sub>450</sub> VC <sub>75</sub>	5	450	75
T21 - SeM <sub>600</sub> VC <sub>0</sub>	5	600	0
T22 - SeM <sub>600</sub> VC <sub>300</sub>	5	600	300
T23 - SeM <sub>600</sub> VC <sub>225</sub>	5	600	225
T24 - SeM <sub>600</sub> VC <sub>150</sub>	5	600	150
T25 - SeM <sub>600</sub> VC <sub>75</sub>	5	600	75
125			

\* Selenometionina – SEL – PLEX<sup>®</sup> 50 (Alltech Inc.)

\*\* Vitamina C - ROVIMIX<sup>®</sup> C-EC (Roche)

Os animais, depois de previamente selecionados por sorteio dentro de cada tratamento, foram colocados em suas respectivas gaiolas. As dietas, dentro de cada

tratamento, iniciaram-se no dia 08 de março de 2004. Cada animal recebeu, em média, 100 gramas de ração/dia, durante quatro meses.

### **3.2 – Análise do sêmen**

As colheitas de sêmen iniciaram depois dos animais terem recebido as dietas por dois meses. As colheitas foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas, totalizando oito colheitas por animal. A colheita foi realizada com uma vagina artificial desenvolvida no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, constituída de tubo plástico com 8 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro, revestida, internamente, com membrana constituída de preservativo não lubrificado e copo coletor graduado (Scapinello et al., 1997). A temperatura da água na vagina artificial, no momento da coleta, foi de 41° C e utilizou-se uma coelha em cio como manequim. Logo após cada colheita, avaliaram-se visualmente, o volume com (VOCG) e sem gelatina (VOSG) e a cor. Para a cor (CO) do sêmen foi atribuído valor numérico que variaram entre 1 a 5 pontos, onde: 1 (branco leitoso), 2 (branco aquoso), 3 (amarelo claro), 4 (amarelo cítrico) e 5 (marrom). O pH foi avaliado utilizando-se papel indicador de tornassol (Universal indicator pH 0-14, Merck). Em seguida, o sêmen foi colocado em banho-maria, a 37° C, para analisar o vigor espermático (VI) e a motilidade espermática progressiva (MO). Em uma lâmina de microscopia óptica foram diluídas uma gota de sêmen com 5 gotas de citrato de sódio diidratado a 3% e deste diluído, foi preparado a lâmina com lamínula e avaliado subjetivamente os dois parâmetros, em microscópio de contraste de fase (Micronal CBA), em aumento de 40X. Para a motilidade espermática progressiva utilizou-se um escore de 0 a 100% e para o vigor espermático um escore de 0 a 5 pontos, sendo que o valor 5 representou o melhor vigor.

A concentração espermática (CON) foi analisada, posteriormente, no laboratório de Reprodução Animal da UEM, acondicionando o sêmen em frascos contendo solução salina tamponada, na diluição de 1:100. A análise foi feita utilizando-se a câmara de Neubauer (Hemocitômetro – Germany Improved Double). A contagem e a determinação de espermatozóides por  $\text{mm}^3$  de sêmen foi realizado de acordo com Sorensen (1979).

### **3.3 – Controle do consumo**

Ao início e ao término do experimento os baldes contendo as rações foram pesados em balança analítica *Filizola* com capacidade para 6,0 kg para determinar a média de consumo de ração entre os animais de cada tratamento, durante os 120 dias de experimento.

## **Resultados e Discussão**

As médias de características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com 6 meses de idade, alimentados com diferentes níveis de selenometionina (SeM) e vitamina C (VC), encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Observou-se o melhor volume de sêmen com gelatina (VOCG), no tratamento que apresentava 450 mg de SeM/kg de ração e 75 mg de VC/kg de ração, sendo de 0,84 mL, mas as diferenças entre os tratamentos não foram significativas ( $P>0,05$ ). Yousef (2005), trabalhando com coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal observou um volume (0,87 mL). Com relação ao volume sem gelatina



(VOSG), foi observado que o tratamento com 300 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração apresentou o melhor volume, sendo de aproximadamente 0,80 mL, mas não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ).

Tabela 3 – Diferentes níveis de selenometionina sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Table 3 - Different selenomethionine levels on semen characteristics in New Zealand White rabbits with six months of age

PAR*	Selenometionina (mg/kg ração) Selenomethionine (mg/kg ration)									
	0		150		300		450		600	
	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD
VOCG	0,511	1,041	0,760	1,118	0,754	1,236	0,857	1,507	0,516	1,109
VOSG	0,728	0,573	0,791	0,556	0,885	0,789	0,715	0,469	0,663	0,557
CO	1,284	0,716	1,371	0,843	1,660	1,131	1,338	0,779	1,340	0,800
pH	7,956	0,610	7,933	0,652	8,099	0,778	8,067	0,689	8,046	0,700
MO	41,306	23,238	44,211	23,744	33,885	28,121	33,559	25,255	37,196	25,142
VI	2,787	1,131	2,933	1,092	2,565	1,207	2,415	1,283	2,655	1,251
CON	360137	200761	329990	173100	276688	179160	278320	194733	324910	190241

\* Parâmetros: VCG – volume com gelatina (mL); VOSG – volume sem gelatina (mL); CO – cor (escora 1 - 5); pH (escala 0 - 14); MO - motilidade progressiva (%); VI – vigor espermático (escora 0 - 5); CON – concentração espermática (mm<sup>3</sup>).

\* Parameters: VCG – volume with gel (mL); VOSG – volume without gel (mL); CO – color (score 1 - 5); pH (scale 0-14); MO – progressive motility (%); VI – spermatic vigor (score 0 - 5); CON – spermatic concentration (mm<sup>3</sup>).

Observaram-se diferenças significativas nos tratamentos com SeM e VC ( $P<0,05$ )

sobre a cor do sêmen (CO), em que os tratamentos que apresentavam 450 mg de SeM/kg de ração mostraram a pior cor para o sêmen. Por outro lado, nos tratamentos que continham vitamina C foi observado melhora significativa ( $P<0,05$ ) a medida que foi sendo adicionado maior quantidade de vitamina C aos tratamentos. O ponto mínimo ocorreu no tratamento com 300 mg de VC/kg de ração, onde o escore foi de 1,236 ( $P<0,05$ ) (Figura 1); entretanto, no tratamento com 0 mg de VC/kg de ração, a cor do sêmen foi a pior. A cor que predominou foi o branco leitoso (escore 1), estando de acordo com os resultados obtidos por Scapinello et al. (1997) que também observaram cor branco leitoso em coelhos suplementados com metionina+cistina, o que para os autores representa normalidade e demonstra boa qualidade do sêmen.

Foi observado o melhor pH no tratamento que apresentava 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração, em que o pH foi de 7,6 (Tabelas 3 e 4, respectivamente), mas não foram encontradas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os

tratamentos. Yousef (2005) encontrou pH em torno de 7,2, em coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal. Alvariño (2000) descreveu que o pH entre 6,8 e 8,4 é um valor adequado para sêmen de coelhos.

Tabela 4 - Diferentes níveis de vitamina C sobre as características do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com idade de seis meses

Table 4 - Different vitamin C levels on semen characteristic in New Zealand White rabbits with six months of age

PAR*	Vitamina C (mg/kg ração) Vitamin C (mg/kg ration)									
	0		75		150		225		300	
	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD
VOCG	0,612	1,187	0,837	1,469	0,522	0,979	0,748	1,193	0,693	1,221
VOSG	0,718	0,496	0,911	0,768	0,665	0,591	0,773	0,640	0,718	0,442
CO	1,472	0,898	1,665	1,094	1,277	0,755	1,351	0,836	1,236	0,678
pH	8,144	0,673	7,973	0,797	7,963	0,676	8,016	0,690	8,005	0,596
MO	32,969	25,883	37,207	26,825	39,194	23,718	40,266	26,841	40,451	23,392
VI	2,441	1,292	2,617	1,233	2,743	1,162	2,729	1,277	2,821	1,027
CON	273359	183022	286755	172154	315026	181103	338088	196671	354513	204825

\* Parâmetros: VO CG – volume com gelatina (mL); VOSG – volume sem gelatina (mL); CO – cor (escora 1 a 5); pH (escala 0 – 14); MO – motilidade progressiva; VI – vigor espermático (escora 0 a 5); CON – concentração espermática (mm<sup>3</sup>).

\* Parameters: VO CG – volume with gel (mL); VOSG – volume without gel (mL); CO – color (score 1 – 5); pH (scale 0-14); MO – progressive motility (%); VI – spermatic vigor (score 0 – 5); CON – spermatic concentration (mm<sup>3</sup>).

$$CO = \exp(0,351 + 0,001129*SeM - 0,0007444*VitC - 0,000001827*SeM^2)$$

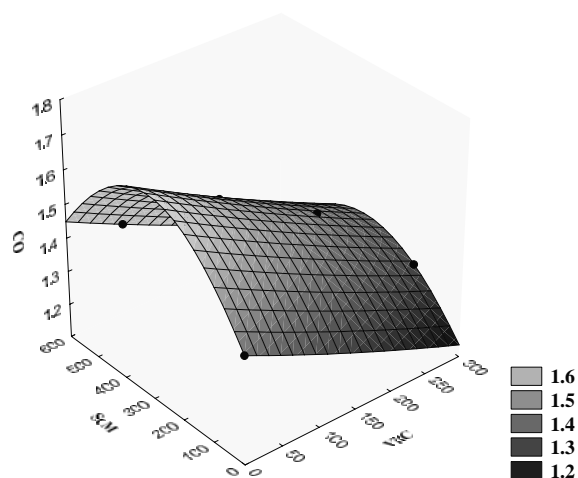


Figura 1 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cor (CO) do sêmen em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 1 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on semen color(CO) in New Zealand White rabbits with six months of age

A motilidade progressiva (MO) teve destaque nos tratamentos que apresentaram 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração, tendo sido de 55% (Figura 2),

mas não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os diferentes níveis dos dois produtos. Apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos essa motilidade espermática se apresentou maior que o controle, onde foi observado 42% de motilidade espermática. Castellini et al. (2002) observaram uma motilidade progressiva de 57% em coelhos suplementados com 500 mg de selênio/kg de ração, em contra ponto foi observado pelos autores uma motilidade progressiva de 64% nos controles. A maior motilidade progressiva (81%) foi destacada por Yousef (2005) em coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal. Provavelmente, este resultado mais elevado encontrado por este autor, deve-se as grandes concentrações de ácido ascórbico utilizados neste experimento.

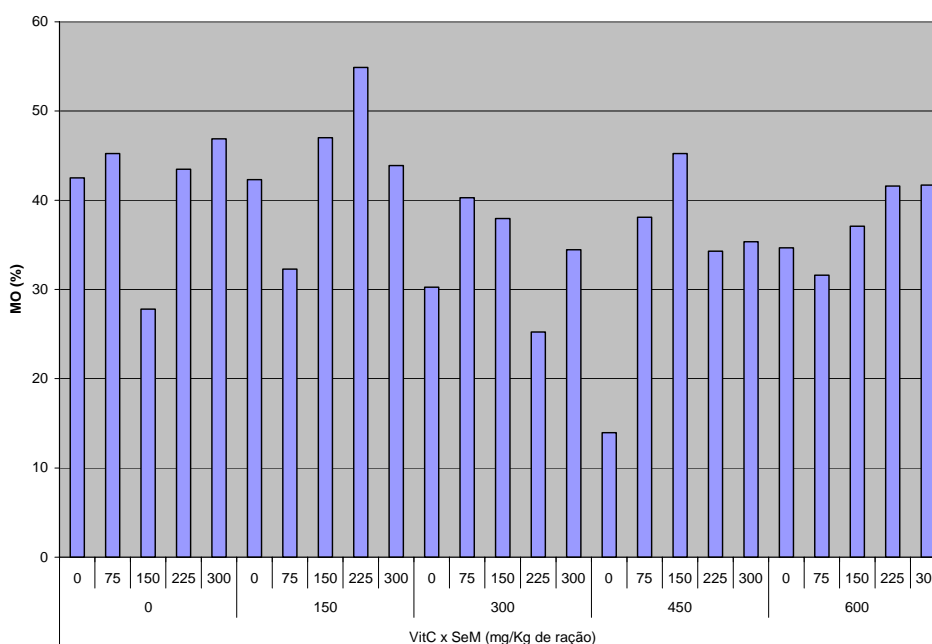


Figura 2 – Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre a porcentagem de motilidade progressiva em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 2 - Different Vitamin C X Selenomethionine (Vit C X SeM mg/kg of ration) levels on semen progressive motility percentage in New Zealand White rabbits with six months of age*

Diferentemente do observado nesta pesquisa, Castellini et al. (2002) e Yousef (2005) observaram influência positiva do selênio e da vitamina C, respectivamente, na motilidade espermática progressiva. Ciereszko & Dabrowski (1995), trabalhando com

peixes Rainbow Trout com dietas suplementadas com ascorbil monofosfato (vitamina C), confirmaram que a deficiência de ácido ascórbico reduz a motilidade espermática e a concentração dos espermatozóides e conseqüentemente, a fertilidade desta espécie. Castellini et al. (2002) descreveram que a suplementação de 150 mg de selênio/kg de ração seria adequada para coelhos machos, pois ajudaria a aumentar a estabilidade oxidativa do sêmen. Andreazzi (2002) ressaltou que a motilidade se constitui num fator importante para a determinação da qualidade do sêmen, pois apresenta uma relação direta com a fertilidade após a cobertura ou inseminação.

Os tratamentos com 450 mg de SeM/kg de ração e 0 mg de VC/kg de ração apresentaram o menor valor numérico para a motilidade espermática (15%), mas não houve diferenças significativas.

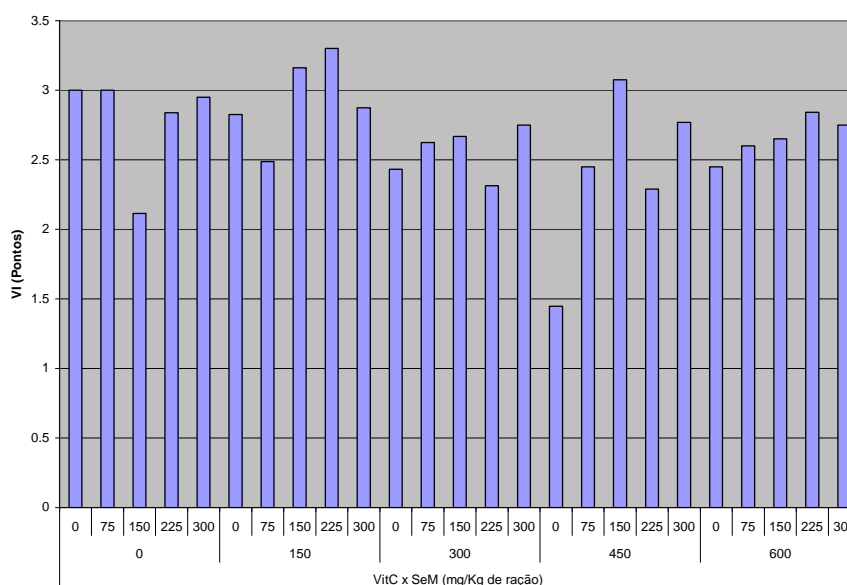


Figura 3 – Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre o vigor espermático (escore 0 - 5) em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 3 - Different Vitamin C X Selenomethionine (VitC X SeM mg/kg of ration) levels on semen spermatic vigor (score 0 - 5) in New Zealand White rabbits with six months of age

O vigor espermático médio (VI) observado situou-se em 3,3 pontos, que correspondem aos tratamentos com 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração (Figura 3), não apresentando diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Os tratamentos com 450 mg de SeM/kg de ração e 0 mg de VC/kg de ração

apresentaram o pior vigor espermático (1,4 pontos). Alvariño (1998) afirmou que um bom sêmen de coelho deve apresentar vigor espermático superior a 3,0 pontos. Scapinello et al. (1997) encontraram um vigor espermático em torno de 3,0 pontos em coelhos machos alimentados com diferentes níveis de metionina+cistina, valores estes próximos do encontrado nesta pesquisa.

A concentração espermática (CON) observada neste estudo teve um ponto mínimo em 356 mg de SeM/kg de ração ( $P<0,05$ ) que correspondeu a pior concentração (276688) espermatozoides/mm<sup>3</sup> (Figura 4). Nos tratamentos com vitamina C observou-se um aumento linear ( $P<0,05$ ) da concentração espermática à medida que foi adicionando um maior nível de vitamina C aos tratamentos. O ponto máximo encontrado foi em 300 mg de VC/kg de ração, em que a concentração espermática atingiu 354513 espermatozoides/mm<sup>3</sup> (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Quando os tratamentos foram associados foi encontrado o melhor tratamento em 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração, onde a concentração espermática atingiu 420000 espermatozoides/mm<sup>3</sup>. Estes valores médios encontrados estão acima dos limites normais para coelhos, que segundo Mies Filho (1987) é de 200000 espermatozoides/mm<sup>3</sup>. Scapinello et al. (1997) encontraram uma concentração espermática média de 251500 espermatozoides/mm<sup>3</sup>, em coelhos suplementados com metionina+cistina.

Os resultados da cor do sêmen combinado com a concentração espermática observada, pode-se destacar como melhor tratamento o uso de 300 mg de VC/kg de ração. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os encontrados por Sonmez et al. (2005), ao trabalharem com ratos Wistar, não tendo verificado efeito da vitamina C sobre a motilidade progressiva, mas verificaram melhora na concentração de espermatozoides. No entanto, os autores não verificaram diferenças entre 250 e 500 mg

de Vit C/kg animal/dia, administrada na água de beber. Neste nível, com 300 mg de VC/kg de ração, a cor aproximou-se do escore branco leitoso (escore 1) que representa a normalidade, haja vista que, à medida que o aspecto se apresentou mais aquoso, normalmente, a concentração de espermatozóides foi mais baixa (Scapinello et al., 1997).

$$CON = \exp(12,68 - 0,001482*SeM + 0,0009056*VitC + 0,00000208*SeM^2)/10^5$$

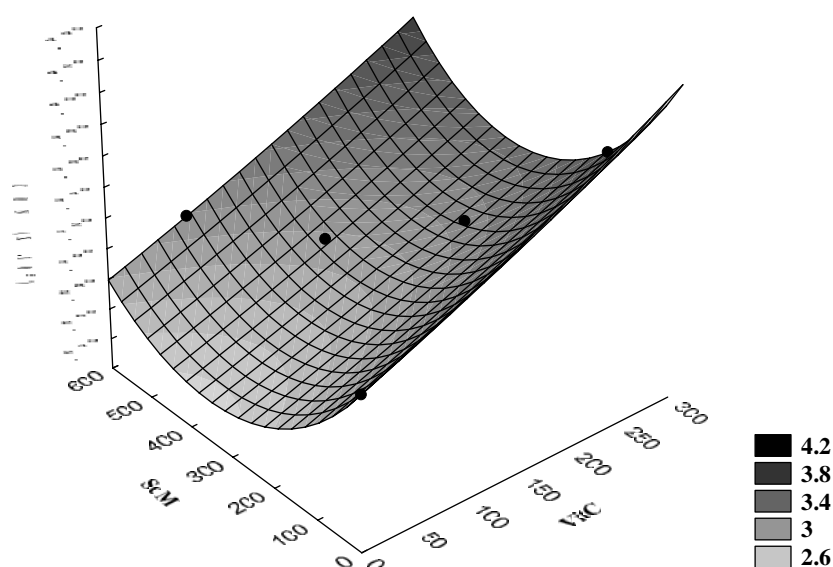


Figura 4 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg Vit C/kg de ração) sobre a concentração espermática ( $CON \times 10^5$ ) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 4 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on spermatic concentration ( $CON \times 10^5$ ) in New Zealand White rabbits with six months of age*

O consumo de ração determinado no final do experimento foi influenciado ( $P < 0,05$ ) pelos tratamentos com vitamina C (Figura 5), elevando-se à medida que aumentou a adição de vitamina C, atingindo o ponto máximo com 300 mg de VC/kg de ração (11,34 kg ração/animal) em 120 dias de experimento. Este resultado está de acordo com o que foi relatado por Salem et al. (2001), que demonstraram que a suplementação de ácido ascórbico estimula o ganho de peso.

Foi constatado, neste experimento, que não houve interação entre selenometionina e a vitamina C. Donnelly et al. (1999) e Yousef et al. (2003) verificaram interação entre a vitamina E e vitamina C, em experimentos com sêmen de homens e coelhos, respectivamente.

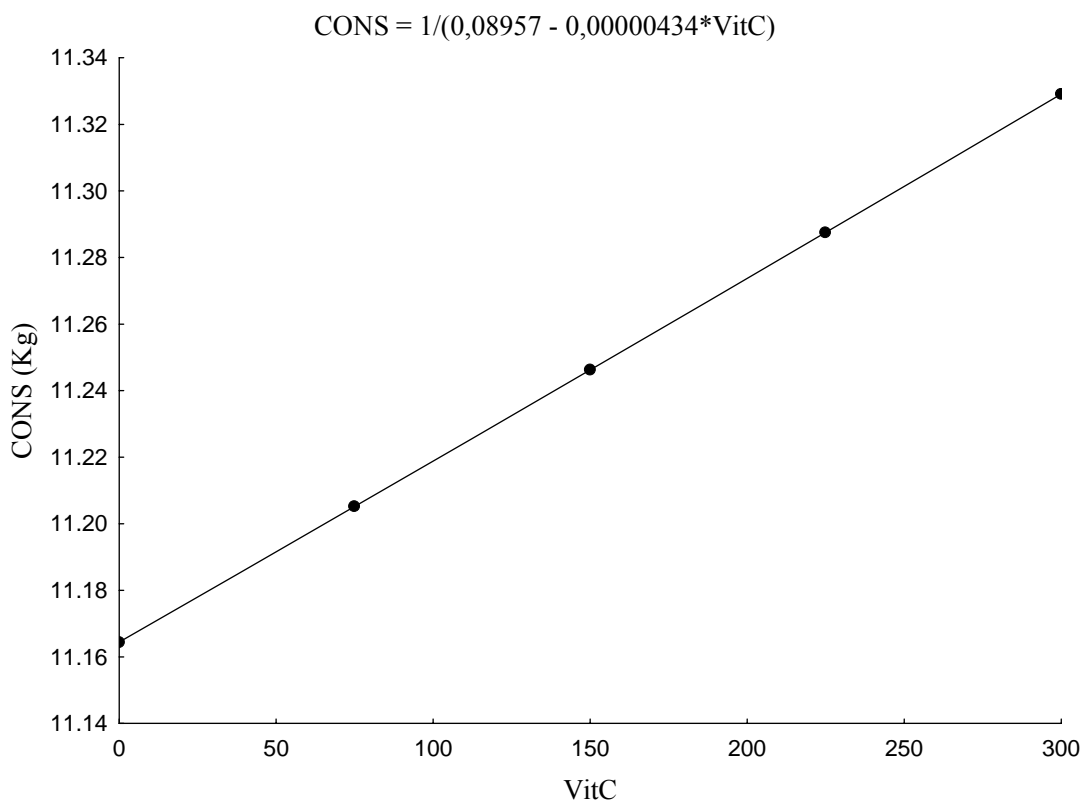


Figura 5 – Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre o consumo de ração (CONS) dos coelhos Nova Zelândia Branco com idade de seis meses

*Figure 5 - Different vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on the ration intake (CONS) of New Zealand White rabbits with six months of age*

## Conclusões

Nas condições em que o trabalho foi conduzido notou-se que a suplementação de vitamina C melhorou a cor do sêmen e concentração de espermatozóides. O volume, pH, motilidade progressiva, vigor espermático, não foram influenciados pelos tratamentos de selenometionina e vitamina C. Já, o consumo de ração aumentou linearmente à medida que aumentou-se a adição de vitamina C, mas não houve efeito da selenometionina.

## Literatura Citada

- AEC. **Recomendações para nutrição animal**. 5 ed. France: Rhone – Poulene, 1987. 86p.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.40, p.183-197, 1989.
- ALVAREZ, J.G; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v.23, p.77-79, 1989.
- ALVARIÑO, J.R.M. **Inseminación artificial como base de la cunicultura industrial**. Leon: Overejo, 1998.78p.
- ALVARIÑO, J.R.M. Reproductive performance of male rabbits. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 7, 2000, Valencia. **Proceedings...** Valencia: ACAF, p.13-35, 2000.
- ANDREAZZI, M.A. **Avaliação reprodutiva de matrizes e coelhos reprodutores alimentados com ração, contendo diferentes fontes de óleos vegetais**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2002. 93p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2002.
- BATTAGLINI, M.; CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P. Variability of the main characteristics of rabbit semen. **Journal of Applied Rabbit Research**, v.15, p.439–446, 1992.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A. et al. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v.58, p.1723-1732, 2002.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in Rainbow Trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. **Biology of reproduction**, v.52, p.982-988, 1995.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, v.58, p.1034–1039, 1992.
- DONNELLY, E.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.72, n.3, p.484-495, 1999.
- EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), **PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH**. Human Kinetics, Champaign, Illinois, p.35-42, 1994.



- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A. ; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v.88, p.11003-11006, 1991.
- FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L. et al. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.264, p.155-163, 1990.
- HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.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.
- LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLE, R.A. Minireview : ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v.52, p.262-266, 1995.
- LUZI, F.; MAERTENS, L.; MIJTEN, P. et al. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 6, 1996. **Proceedings...**Toulouse: France, p.87-92, 1996.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K. Effect of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue response, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2994-3003, 1997.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5 ed. Porto Alegre: Sulina, v.2, 1987.783p.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society A**, v.135, n.3, p.370-384, 1972.
- 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.
- SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I. et al. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxicology**, v.162, p.209-218, 2001.
- SCAPINELLO, C.; MORAES, G.V.; SOUZA, M.L.R. et al. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Unimar**, v.19, n.3, p.923-931, 1997.
- SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Alternative Medicine Review**, v.5, p.28-38, 2000.
- SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, (Prelo), 2005.

- SORENSEN, J.R. **A laboratory manual for animal reproduction**. 4 ed. Boston: American Press, 1979.154p.
- STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 6. <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>, 2003.
- THOMPSON, C.D.; STEWART, R.D.H. Metabolic studies of [<sup>75</sup> Se] selenomethionine and [<sup>75</sup> Se] selenite in the rat. **British Journal of Nutrition**, v.30, p.139-147, 1973.
- VIRAG, G.Y; MÉZES, M. Glutathione-peroxidase activity of seminal plasma in rabbits. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v.49, p.296-297, 1994.
- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **Journal of Nutrition**, v.118, p.846-852, 1988.
- YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.99-111, 2003.
- YOUSEF, M.I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. **Toxicology**, v.207, p.81-89, 2005.
- ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.16, n.3., p.183-188, 1993.

#### **IV – Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho**

##### **RESUMO**

Foram avaliadas as morfopatologias espermáticas do sêmen de coelhos alimentados com rações contendo diferentes níveis de selenometionina (SeM) e vitamina C (VC). Foram utilizados 125 coelhos Nova Zelândia Branco, com idade média de seis meses, alojados individualmente, e distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com vinte e cinco tratamentos (rações com selenometionina e vitamina C) e cinco repetições. As colheitas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas, totalizando oito colheitas por animal, tendo as colheitas sido iniciadas dois meses depois dos animais estarem sob tratamento com vitamina C e selenometionina. Os parâmetros encontrados e avaliados no sêmen foram as morfopatologias espermáticas: normais (NO), patologias totais (PT), patologias primárias (PP), patologias secundárias (PS), cauda dobrada (CD), cauda abaxial (CAB), cauda bifurcada (CABI), cabeça periforme (CAPE), capuchão solto (CAPS), cabeça raquetiforme (CARE), cabeça solta (CASO), cauda solta (CAUSO), cauda degenerada (CDE), cauda dobrada na porção final (CDF), cauda enrolada (CEN), cauda enrolada na porção final (CENF), cauda quebrada na porção final (CQF), cauda quebrada na porção inicial (CQI), cauda quebrada na porção intermediária (CQIN), cauda quebrada junto à cabeça (CQJC), edema de colo (EDCO), gota citoplasmática distal (GODI), gota citoplasmática proximal (GOPR), macrocefalia (MACRO) e microcefalia (MICRO). Destas patologias, as que foram influenciadas pelos tratamentos com SeM e VC ( $P < 0,05$ ) foram: PT, PP, PS, CD, CAB, CAPS, CARE, CAUSO, CENF, GODI, GOPR, MICRO. Foi observado que os tratamentos com SeM e VC aumentaram as patologias: PT, PP, CD, CAB, CARE, CAUSO, GODI até níveis intermediários e depois voltaram a decrescer. A GOPR foi reduzida até os níveis de 300 mg de SeM/kg de ração, mostrando a eficiência do selênio com relação ao amadurecimento dos espermatozoides, mas a partir de então piorou. A microcefalia apresentou um efeito linear positivo com relação à vitamina C, diminuindo o número de microcefalias à medida que houve o aumento de vitamina C, demonstrando o efeito de proteção antioxidante dos espermatozoides. Como conclusão, o SeM e VC melhoraram os índices de algumas patologias e pioraram outras.

**Palavras-chave:** espermatozoides, morfopatologias, selenometionina, vitamina C.

#### **IV – Effect of supplementation of selenomethionine and vitamin C levels on spermatic morphopathologies in the rabbit semen**

##### **ABSTRACT**

The spermatic morphopathologies in the rabbits semen fed with rations containing different selenomethionine (SeM) and vitamin C (VC) levels were evaluated. Were used 125 News Zealand White male rabbits, with six months of age, kept individually in cage and distributed in completely randomized design with twenty five treatments vitamin C and selenomethionine added in the diets and five replications. The semen collects were done once a week, during eight weeks, totalizing eight collects by animal. In the evaluated semen were found the followings spermatic morphopathologies: NO – normal; PT - total pathologies; PP – primary pathologies; PS – secondary pathologies; CD - bent tail; CAB – abaxial tail; CABI - forked tail; CAPE - pyriform head; CAPS - free cap; CARE - raquetiform head; CASO - tailless; CAUSO - headless; CDE - degenerate tail; CDF - final bent tail; CEN - coiled tail; CENF - final coiled tail; CQF - final broken tail; CQI – initial broken tail; CQIN – mid-piece broken tail; CQJC - tail broken close head; EDCO – swollen neck; GODI – distal droplet; GOPR – proximal droplet; MACRO – macrocephalic sperm and MICRO – microcephalic sperm. The following parameters were influenced by treatments of SeM and VC ( $P < 0.05$ ): PT, PP, PS, CD, CAB, CAPS, CARE, CAUSO, CENF, GODI, GOPR, MICRO. It was observed that treatments with SeM and VC increased until an intermediate level and later it reduced the followings morphopathologies: PT, PP, CD, CAB, CARE, CAUSO, GODI. The GOPR increased until intermediate levels of 300 mg SeM/kg of ration, showing the efficiency of the selenium on spermatozoa maturation. The microcephalic sperm had a positive linear effect relationed to the vitamin C, decreasing the microcephalic sperm number as the vitamin C level increased, demonstrating the effect of antioxidant protection in the spermatozoa. In conclusion, SeM and VC improved some semen pathologies rate and impaired others.

**Key words:** morphopathologies, selenomethionine, spermatozoa, vitamin C.



## Introdução

O efeito prejudicial das espécies reativas ao oxigênio (EROs), nos espermatozóides, foi sugerido há mais de 50 anos atrás, quando MacLeod (1943) *apud* Halliwell & Gutteridge (1999), demonstraram que a exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade, com o aparecimento de anormalidades morfológicas nos espermatozóides. Espermatozóides imóveis e espermatozóides morfológicamente normais, porém funcionalmente anormais, são também fontes de EROs (Engel et al., 1999). A excessiva produção de EROs, também chamada de estresse oxidativo positivo, ocorre tanto pelo excesso de EROs como pela diminuição de antioxidantes (De Lamirande & Gagnon, 1995).

Espermatozóides normais e não funcionais parecem gerar radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) em maiores taxas que aqueles saudáveis. Geração excessiva de EROs, no sêmen, pode ser uma consequência de infertilidade (Aitken & Fishel, 1994).

O espermatozóide possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as EROs, que consiste, principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase (SDO), catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e a redutase, bem como, antioxidante não enzimáticos como: ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E (Aitken, 1995).

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante (Eichner, 1994). A vitamina C reduz o  $\alpha$ -tocoferol, peróxidos e EROs, como superóxidos e age também prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (Nordberg & Árnér, 2001). Dawson et al. (1992) indicaram melhora na viabilidade do espermatozóide, diminuição na percentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática em experimento com homens fumantes de 25 anos de idade, quando a ingestão de 1,0 g/dia de ácido ascórbico

foi suplementada. Luck et al. (1995) descreveram que o ascorbato poderia ser considerado como essencial para o processo reprodutivo humano.

Outro elemento implicado na degradação dos peróxidos de hidrogênio é o selênio (Se) (Alvarez & Storey, 1989). Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a esfera reprodutiva (Noguchi et al., 1973). Barbosa & Souza (2005) destacaram que a deficiência dietética de Se levaria ao surgimento de espermatozoides com cauda quebrada, deformações de cabeça, deformações na peça intermediária, oligozoospermia, necrozoospermia, baixa longevidade e, por consequência, baixo índice de prenhez.

Dentre as disfunções espermáticas que podem surgir devido a falta de proteção antioxidante destacam-se as anormalidades ou patologias espermáticas (De Lamirande & Gagnon, 1995). Sendo assim, a avaliação da morfologia espermática visa, basicamente, determinar a proporção de células exibindo morfologia anormal, podendo-se classificar as anomalias de várias formas. Um sistema de classificação importante divide as anormalidades espermáticas em defeitos primários e defeitos secundários, sendo os primeiros originados durante a espermatogênese e os últimos durante a maturação no epidídimo, transporte ou contato com o meio externo (Hafez & Hafez, 2004).

No presente trabalho objetivou-se avaliar diferentes níveis de selenometionina e vitamina C sobre as morfopatologias espermáticas em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

## **Material e Métodos**

### **4.1 – Local e animais**

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, de março a julho de 2004. Foram utilizados 125 coelhos machos Nova Zelândia Branco, com idade média de seis meses,

alojados individualmente em gaiolas de arame galvanizado medindo 40 cm X 60 cm X 45 cm (comprimento, largura e altura), respectivamente, providas de bebedouro automático e comedouro semi-automático, instalados em galpão de alvenaria com cobertura de fibroamianto. Os animais foram mantidos por um período preliminar de oito semanas em dieta base sem suplementações e posteriormente, foi realizada uma triagem para a formação dos grupos de tratamentos, que constaram de cinco animais por tratamento. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental fatorial inteiramente casualizado, com vinte e cinco tratamentos (rações com adições de níveis diferentes de vitamina C e selenometionina) e cinco repetições.

O modelo estatístico foi:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_1 \text{SeM}_i + b_2 \text{VC}_j + b_3 \text{SeM}_i \text{VC}_j + b_4 \text{SeM}_i^2 + b_5 \text{VC}_j^2 + e_{ijk}$$

onde:

$Y_{ijk}$  = a observação no animal k, alimentado com ração contendo o nível i de selenometionina e o nível j de vitamina C;

$b_0$  = constante geral;

$b_1$  = coeficiente linear de regressão de Y em função do nível de selenometionina;

$b_2$  = coeficiente linear de regressão de Y em função do nível de vitamina C;

$b_3$  = coeficiente de regressão de Y em função da interação entre i de selenometionina e j de vitamina C;

$b_4$  = coeficiente quadrático de regressão de Y em função do nível i de selenometionina;

$b_5$  = coeficiente quadrático de regressão de Y em função do nível j de vitamina C;

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ijk}$ .

Foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972), usando-se o software GLIM 4.0, em que o modelo estatístico foi o citado anteriormente, sendo as características estudadas comparadas por meio do teste F ( $P < 0,05$ ). Para os gráficos foi utilizado o software STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2003).

As rações foram formuladas com base nas exigências do AEC (1987) para coelhos em reprodução (Tabela 1), onde de acordo com Andreazzi (2002) continham em 90% de



matéria seca, 17% de amido, 16% de proteína bruta, 35% de fibra em detergente neutro (FDN), 17% de fibra em detergente ácido (FDA), 3,65% de extrato etéreo (ácido graxo saturado – 0,54% e ácido graxo insaturado – 3,11%) e 2.599 Kcal/kg de energia digestível, consistindo de uma ração base, e seu fornecimento foi em média de 100 gramas/animal/dia durante 4 meses, com água à vontade.

Tabela 1 – Composição percentual e química da ração base  
*Table 1 – Percentual and chemical composition of the basic ration*

<b>Ingredientes</b> <i>Ingredient</i>	<b>%</b> <i>%</i>	<b>Unidade</b> <i>Unit</i>	<b>Ração Base</b> <i>Basic Ration</i>
Milho <i>Corn</i>	25,6	kg	77,00
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	14,0	kg	42,00
Farelo de Trigo <i>Wheat meal</i>	24,0	kg	72,00
Feno de Alfafa <i>Alfalfa hay</i>	23,3	kg	50,00
Feno de Coast Cros <i>Coast Cros hay</i>	10,0	kg	50,00
Sal Comum <i>Common salt</i>	0,4	kg	1,20
Fosfato bicálcico <i>Dicalcium phosphate</i>	0,8	kg	2,40
Calcário Calcítrico <i>Limestone</i>	1,0	kg	3,00
DL – Metionina <i>DL- Methionine</i>	-	kg	0,40
Bacitracina <i>Bacitracin</i>	0,05	kg	0,15
Cicostat Robenidina <i>Cycostat Robenidin</i>	0,083	kg	0,25
Mist. Vit + Min. <sup>1</sup> <i>Premix vit+min.<sup>1</sup></i>	0,5	kg	1,50
<b>Total</b>			<b>300,00</b>

<sup>1</sup> Nuvital, composição por kg do produto: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200 mg ; Vit B12, 2.000mcg; Ac. Pantotênico, 2.000 mg; Colina, 70.000 mg; Ferro, 8.000 mg; Cobre, 1.200 mg; Cobalto, 200 mg; Manganês, 8.600 mg; Zinco, 12.000 mg; Iodo, 64 mg; Selênio, 16 mg; Metionina, 120.000 mg; Antioxidante, 20.000 mg.

<sup>1</sup> *Vitamin-mineral premix composition per kg: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200mg; Vit B12, 2.000mcg; Panthotenic acid, 2.000 mg; Choline, 70.000 mg; Iron, 8.000 mg; Copper, 1.200 mg; Cobalt, 200 mg; Manganese, 8.600 mg; Zinc, 12.000 mg; Iodine, 64 mg; Selenium, 16 mg; Methionine, 120.000 mg; Sinox, 20.000 mg.*

As rações foram elaboradas para serem consumidas em um mês para evitar a perda de princípio ativo dos produtos. O selenometionina com 1,0 mg de selênio/kg incorporado (Sel-Plex<sup>®</sup> 50 - Alltech Inc.) e a vitamina C com 98% de pureza (Rovimix<sup>®</sup> C-EC – Roche) foram pesados em balanças analíticas e adicionados às rações tratamentos.

As rações bases mais às adições de selenometionina e vitamina C de acordo com cada tratamento foram misturadas em misturador Y por um tempo de 15 minutos e posteriormente, processadas pelo método de peletização, onde os tamanhos dos péletes obtidos foram de 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento. Depois de peletizadas foram secas ao ar livre e ensacadas em sacos etiquetados de acordo com cada tratamento.

Os 125 coelhos machos Nova Zelândia Branco foram submetidos à análise do sêmen antes da formação dos grupos e foram distribuídos nos tratamentos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes tratamentos com suplementações adicionais de Selenometionina (SeM)\* e Vitamina C (VC)\*\* fornecidos aos animais durante a fase experimental  
*Table 2 - Different treatments with additional supplementation of Selenomethionine (SeM)\* and Vitamin C (VC)\*\* offered to the animals during the experimental phase*

Tratamentos	N	Selenometionina (mg/kg ração)	Vitamina C (mg/kg ração)
<i>Treatments</i>	<i>N</i>	<i>Selenomethionine (mg/kg ration)</i>	<i>Vitamin C (mg/kg ration)</i>
T1 – SeM <sub>0</sub> VC <sub>0</sub>	5	0	0
T2 – SeM <sub>0</sub> VC <sub>300</sub>	5	0	300
T3 – SeM <sub>0</sub> VC <sub>225</sub>	5	0	225
T4 – SeM <sub>0</sub> VC <sub>150</sub>	5	0	150
T5 – SeM <sub>0</sub> VC <sub>75</sub>	5	0	75
T6 – SeM <sub>150</sub> VC <sub>0</sub>	5	150	0
T7 – SeM <sub>150</sub> VC <sub>300</sub>	5	150	300
T8 – SeM <sub>150</sub> VC <sub>225</sub>	5	150	225
T9 – SeM <sub>150</sub> VC <sub>150</sub>	5	150	150
T10 – SeM <sub>150</sub> VC <sub>75</sub>	5	150	75
T11 – SeM <sub>300</sub> VC <sub>0</sub>	5	300	0
T12 – SeM <sub>300</sub> VC <sub>300</sub>	5	300	300
T13 – SeM <sub>300</sub> VC <sub>225</sub>	5	300	225
T14 – SeM <sub>300</sub> VC <sub>150</sub>	5	300	150
T15 – SeM <sub>300</sub> VC <sub>75</sub>	5	300	75
T16 – SeM <sub>450</sub> VC <sub>0</sub>	5	450	0
T17 – SeM <sub>450</sub> VC <sub>300</sub>	5	450	300
T18 – SeM <sub>450</sub> VC <sub>225</sub>	5	450	225
T19 – SeM <sub>450</sub> VC <sub>150</sub>	5	450	150
T20 – SeM <sub>450</sub> VC <sub>75</sub>	5	450	75
T21 – SeM <sub>600</sub> VC <sub>0</sub>	5	600	0
T22 – SeM <sub>600</sub> VC <sub>300</sub>	5	600	300
T23 – SeM <sub>600</sub> VC <sub>225</sub>	5	600	225
T24 – SeM <sub>600</sub> VC <sub>150</sub>	5	600	150
T25 – SeM <sub>600</sub> VC <sub>75</sub>	5	600	75
	125		

\* Selenometionina – SEL – PLEX® 50 (Alltech Inc.)

\*\* Vitamina C - ROVIMIX® C-EC (Roche)

Os animais, depois de previamente selecionados por sorteio dentro de cada tratamento, foram colocados em suas respectivas gaiolas. As dietas, dentro de cada tratamento, iniciaram-se no dia 08 de março de 2004. Cada animal recebeu, em média, 100 gramas de ração/dia durante quatro meses.

#### **4.2 – Análise do sêmen**

As colheitas de sêmen iniciaram depois dos animais terem recebido as dietas base e suplementações por dois meses. As colheitas foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas, totalizando oito colheitas por animal. A colheita foi realizada com uma vagina artificial desenvolvida no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, constituída de tubo plástico com 8 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro, revestida, internamente com membrana constituída de preservativo não lubrificado e copo coletor graduado (Scapinello et al., 1997). A temperatura da vagina artificial, no momento da coleta, foi de 41°C. Para colher o sêmen utilizou-se uma coelha em cio, como manequim.

Para análise das morfologias espermáticas preparam-se dois esfregaços, que foram corados pelo método Williams (1920), modificado por Lagerlöff (1934), e depois de secos, foram levados ao microscópio de contraste de fase de 100X. Foram considerados os normais (NO), patologias totais (PT), patologias primárias (PP) e secundárias (PS), realizando a contagem de 100 espermatozóides entre as duas lâminas feitas de cada ejaculado.

Entre as patologias primárias (PP) encontrou-se: cauda degenerada (CDE), cabeça periforme (CAPE), cabeça raquetiforme (CARE), microcefalia (MICRO), macrocefalia (MACRO), cauda bifurcada (CABI), cauda quebrada na porção inicial (CQI), cauda quebrada na porção intermediária (CQIN), cauda quebrada na porção final (CQF), cauda quebrada junto à cabeça (CQJC), cauda enrolada (CEN), cauda enrolada na porção final

(CENF), cauda abaxial (CAB); e entre as patologias secundárias (PS) encontrou-se: cauda dobrada (CD), cauda dobrada na porção final (CDF), cabeça solta (CASO), cauda solta (CAUSO), edema de colo (EDCO), capuchão solto (CAPS), gota citoplasmática proximal (GOPR) e gota citoplasmática distal (GODI).

## **Resultados e Discussão**

As anormalidades morfológicas dos espermatozóides apresentam relação negativa com a fertilidade (Hafez & Hafez, 2004). De acordo com os autores, o índice de patologias totais (PT), para diferentes espécies animais, que não prejudica a fertilidade é de 20%. Bilbao (1996) reportou valores de até 25% de patologias para os coelhos, que não seriam prejudiciais a esta espécie, e ainda, Alvariño (2000) relatou que os índices de patologias variam com a raça de coelhos, sendo que, machos da raça Nova Zelândia Branco apresentam, em média, 11% de patologias totais. No presente estudo foi observada a melhor porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais (NO) no tratamento que apresentava 600 mg de SeM/kg de ração e 300 mg de VC/kg de ração (Figura 6), em que o valor aproximou-se de 60%, mas não teve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. O pior tratamento foi com o nível de 0 mg de VC/kg de ração e 450 mg de SeM/kg de ração, onde observou-se 48% de espermatozóides normais.

Edens (2001) estudou aves machos Hubbard Ultra-Yield com 4 semanas de idade, suplementadas com 480 mg de SeM/kg de ração, tendo observado 98,7% de espermatozóides normais no sêmen dos galos ( $P<0,05$ ), enquanto na dieta basal que continha 280 mg de selênio/kg de ração, sem suplementação, apresentou 57,9% de espermatozóides normais. Isto demonstra a importância do selênio para a manutenção da integridade dos espermatozóides normais, fato não observado nesta pesquisa, pois os suplementados adicionalmente com SeM se comportaram de forma idêntica aos controles.

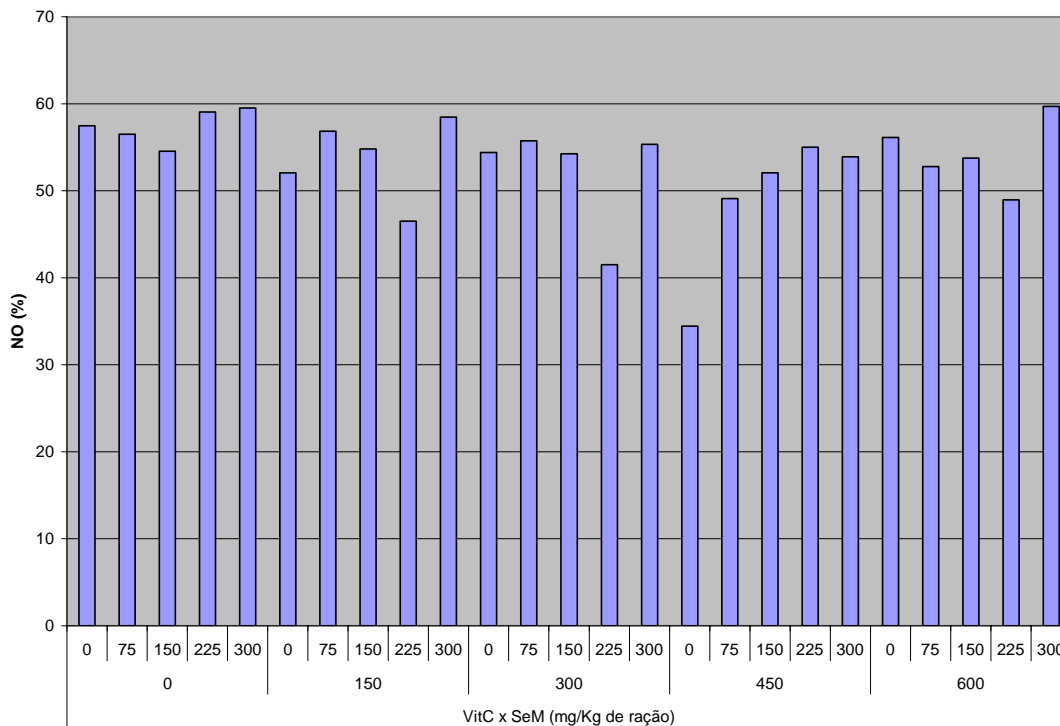


Figura 6 - Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM mg/kg de ração) sobre a porcentagem de espermatozóides normais em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com idade de seis meses

Figure 6 – Different Vitamin C X Selenomethionine (Vit C X SeM mg/kg of ration) on normal spermatozoa percentage in semen from New Zealand White rabbits with six months of age

As patologias totais (PT), patologias primárias (PP) e patologias secundárias (PS) foram influenciadas pelos tratamentos ( $P < 0,05$ ) (Figuras 7,9,10, respectivamente).

Avaliando as patologias totais (PT) apresentadas na figura 7, notou-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) com relação a selenometionina em que observa-se 42% de PT no tratamento com 0 mg de SeM/kg de ração, tendo atingido o ponto máximo em 374 mg de SeM/kg de ração (49%). A partir deste valor, o teor de patologias totais diminuiu, chegando próximo a 47%, com 600 mg de SeM/kg de ração. O mesmo comportamento foi observado com relação às patologias primárias (PP) em que o ponto máximo apresentou-se em 325 mg de SeM/kg de ração, tendo atingido o valor de 30,5%, voltando a mostrar redução até atingir os níveis de 27%, no tratamento com 600 mg de SeM/kg de ração (Figura 9). Na figura 8 são ilustradas duas patologias analisadas, como cauda bifurcada e microcefalia.

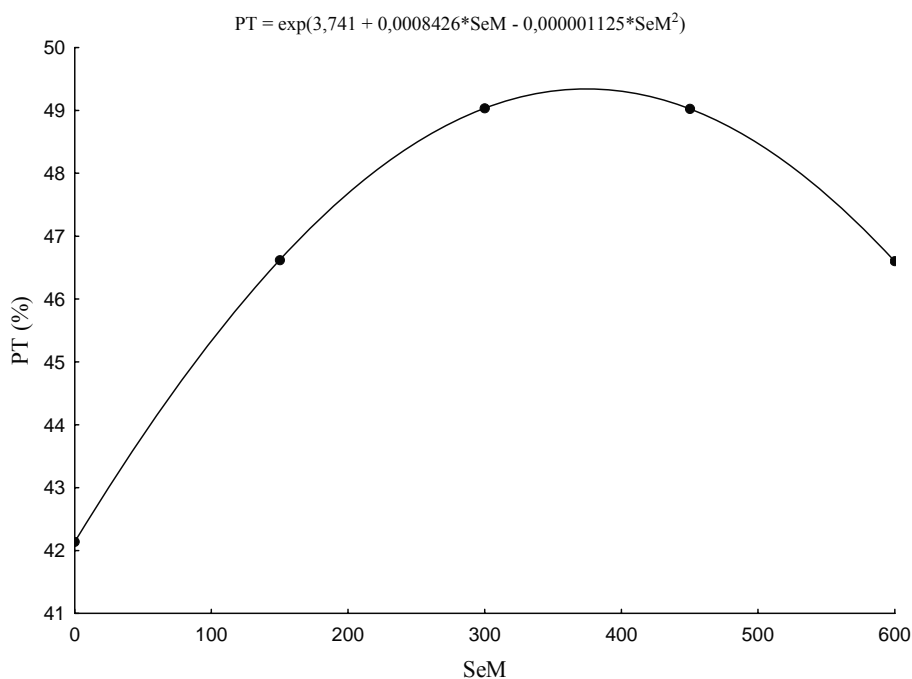


Figura 7 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a porcentagem de patologias totais (PT) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade  
 Figure 7 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on total pathologies (PT) percentage in New Zealand White rabbits with six months of age

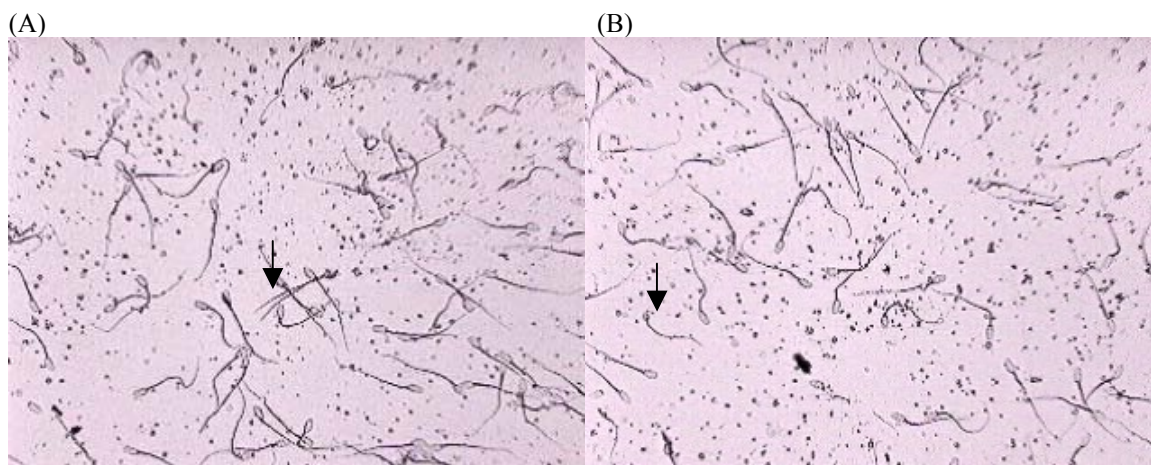


Figura 8 – Espermatozoides com cauda bifurcada (A) e microcefalia (B) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, classificados como patologias primárias. Aumento de 40X em microscopia de contraste de fase  
 Figure 8 - Spermatozoa with forked tail (A) and microcephalic (B) sperm in New Zealand White rabbits with six months of age, classified as primary pathologies. Increase of 40X in phase contrast microscopy

As patologias secundárias (PS) aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) a medida que se aumentou os níveis de selenometionina, observando-se o ponto máximo em 600 mg de SeM/kg de ração (20%) (Figura 10).

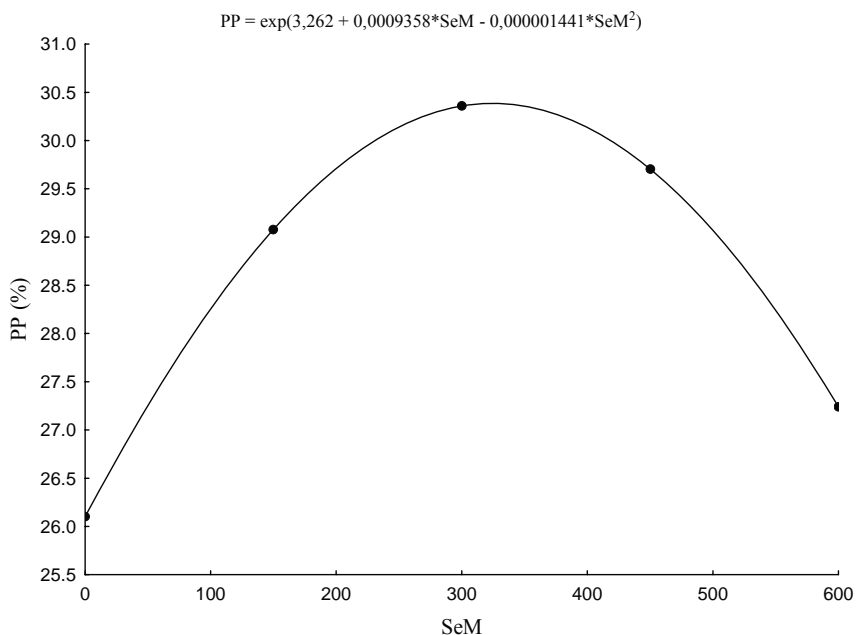


Figura 9 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg) sobre a porcentagem de patologias espermáticas primárias (PP) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 9 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on percentage of primary pathologies(PP) in New Zealand White rabbits with six months of age*

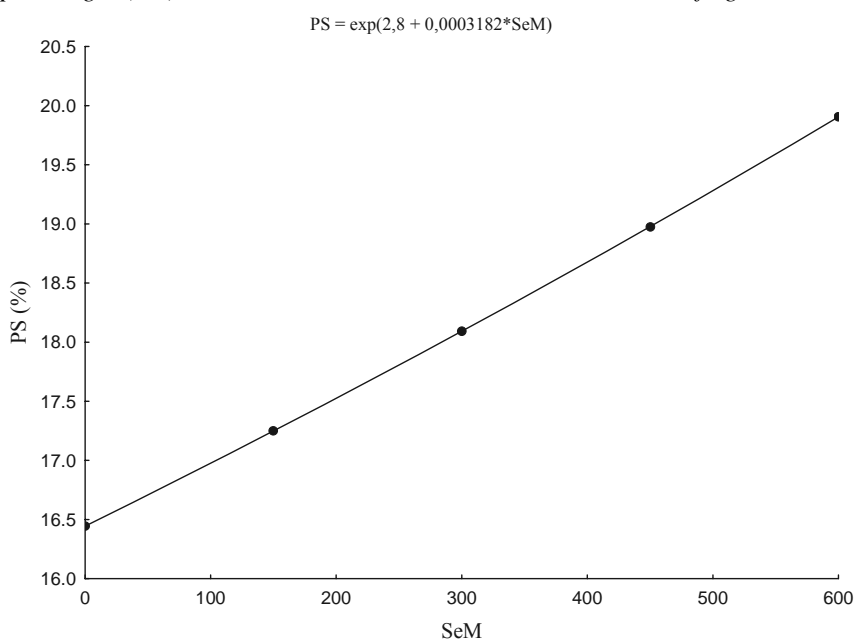


Figura 10 - Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre a porcentagem de patologias espermáticas secundárias (PS) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 10 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on secondary pathologies(PS) percentage in New Zealand White rabbits with six months of age*

As patologias totais (PT) e patologias primárias (PP) que assumiram o comportamento de aumentarem e depois reduzirem em um nível maior de adição de

selenometionina não pôde ser explicado, fisiologicamente, até o momento, pois não foi encontrada fundamentação na literatura pesquisada.

Yousef et al. (2005) trabalharam com suplementações de ácido ascórbico (1,5 g/l de água), em coelhos e avaliando características do sêmen, encontraram 10% de patologias espermáticas primárias nos animais que receberam ácido ascórbico e 12,98% nos controles. Os autores relataram também a redução dos níveis de peroxidação lipídica, que seria uma das causas do aparecimento de patologias nos espermatozóides, o que está de acordo com Sonmez et al. (2005) ao reportarem que altas doses de ácido ascórbico reduziram patologias primárias. No entanto, nesta pesquisa, não encontrou-se efeitos significativos ( $P>0,05$ ) com relação aos tratamentos com vitamina C.

Nas tabelas 5 e 6 estão os resultados encontrados para os diferentes tipos de patologias espermáticas analisadas em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com idade média de 6 meses, tratados com níveis diferentes de selenometionina e vitamina C.

Dentre as patologias, foi observado que cauda bifurcada (CABI), cabeça solta (CASO), cauda degenerada (CDE), cauda dobrada na porção final (CDF), cauda enrolada (CEN), cauda quebrada na porção final (CQF), cauda quebrada na porção inicial (CQI), cauda quebrada na porção intermediária (CQIN), cauda quebrada junto à cabeça (CQJC), edema de colo (EDCO) e macrocefalia (MACRO) não foram influenciadas pelos tratamentos ( $P>0,05$ ).

Segundo Mies Filho (1987), as patologias espermáticas são classificadas em primárias e secundárias. As primeiras ocorrem durante o processo de espermatogênese e as segundas afetam o espermatozóide depois de formado. Dentre as patologias, de acordo com Mies Filho (1987), as primárias são: cabeça periforme, raquetiforme, estreita, pequena (microcefalia), grande (macrocefalia), curta e grossa, cabeça normal com cauda muito enrolada, inserção abaxial e cauda bifurcada (Figura 8 A).



Tabela 5 – Diferentes níveis de selenometionina sobre as patologias espermáticas em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Table 5 - Different selenomethionine levels on spermatic pathologies in New Zealand White rabbits with six months of age

PAT*		Selenometionina (mg/kg ração)									
		Selenomethionine (mg/kg ration)									
		0		150		300		450		600	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	Means	SD	Means	SD	Means	SD	Means	SD	Means	SD	
NO	57,514	15,637	53,670	15,307	52,482	20,453	48,964	21,577	54,206	16,514	
PT	42,596	15,612	46,330	15,307	47,518	20,453	51,036	21,577	45,794	16,514	
PP	26,186	12,933	29,144	13,356	29,848	15,895	30,379	16,445	27,010	12,839	
PS	16,273	9,461	17,186	9,986	17,665	10,141	20,626	13,745	18,814	10,763	
Primárias	CAB	0,077	0,561	0,191	0,782	0,160	0,610	0,112	0,494	0,119	0,560
	CABI	0,060	0,239	0,077	0,286	0,086	0,280	0,117	0,455	0,124	0,484
	CAPE	0,538	1,242	0,526	0,928	2,904	10,899	2,000	6,793	0,497	1,319
	CARE	0,044	0,275	0,093	0,422	0,225	1,133	0,087	0,376	0,062	0,333
	CDE	0,473	1,091	0,686	1,182	1,118	2,285	0,556	1,087	0,850	1,589
	CEN	0,841	1,878	1,155	2,520	1,139	2,848	0,893	2,601	1,114	2,497
	CENF	0,170	0,457	0,263	0,718	0,251	0,692	0,204	0,563	0,415	0,915
	CQF	0,302	0,707	0,320	0,769	0,294	0,786	0,469	1,020	0,404	0,824
	CQI	0,604	0,884	0,603	1,130	0,754	1,197	0,964	1,383	0,699	1,669
	CQIN	1,544	2,866	1,588	3,372	1,449	3,357	1,464	2,659	1,389	2,323
	CQJC	2,956	3,075	3,129	3,162	3,246	3,611	2,786	2,948	3,663	3,671
	MACRO	0,429	0,823	0,387	0,675	0,422	0,977	0,306	0,693	0,332	0,657
	MICRO	3,352	2,849	3,830	2,837	5,594	7,699	9,194	16,723	3,332	2,783
Secundárias	CD	13,192	11,004	14,015	11,091	10,091	9,291	9,668	8,099	12,233	10,741
	CAPS	0,027	0,305	0,000	0,000	0,016	0,163	0,015	0,159	0,031	0,202
	CASO	7,451	4,730	9,278	7,361	8,914	6,467	9,668	8,889	8,808	6,741
	CAUSO	4,643	3,646	5,397	3,942	6,449	6,172	7,980	9,364	5,544	4,194
	CDF	1,643	2,167	2,036	2,386	1,936	2,776	1,520	1,955	1,902	2,661
	EDCO	0,011	0,105	0,015	0,124	0,000	0,000	0,026	0,188	0,010	0,102
	GODI	0,385	1,144	0,531	1,775	0,396	1,292	0,321	0,957	0,699	2,737
	GOPR	3,473	6,579	2,129	3,821	2,203	4,187	2,679	5,418	3,560	5,875

\* Patologias Espermáticas: NO – normais (%); PT – patologias totais (%); PP – patologias primárias (%); PS – patologias secundárias (%); CD – cauda dobrada; CAB – cauda abaxial; CABI – cauda bifurcada; CAPE – cabeça periforme; CAPS – capuchão solto; CARE – cabeça raquetiforme; CASO – cabeça solta; CAUSO - cauda solta; CDE – cauda degenerada; CDF – cauda dobrada na porção final; CEN – cauda enrolada; CENF – cauda enrolada na porção final; CQF - cauda quebrada na porção final; CQI – cauda quebrada na porção inicial; CQIN – cauda quebrada na porção intermediária; CQJC – cauda quebrada junto à cabeça; EDCO – edema de colo; GODI – gota citoplasmática distal; GOPR – gota citoplasmática proximal; MACRO – macrocefalia; MICRO – microcefalia.

\* Spermatic Pathologies: NO – normal (%); PT – total pathologies (%); PP – primary pathologies (%); PS – secondary pathologies (%); CD - bent tail; CAB - abaxial tail; CABI - forked tail; CAPE - pyriform head; CAPS - free cap; CARE - raquetiform head; CASO - tailless; CAUSO - headless; CDE - degenerate tail; CDF - final bent tail; CEN - coiled tail; CENF - final coiled tail; CQF - Final broken tail; CQI – initial broken tail; CQIN - mid-piece broken tail; CQJC - tail broken close head; EDCO – swollen neck; GODI - distal droplet; GOPR – proximal droplet; MACRO – macrocephalic sperm; MICRO – microcephalic sperm.

Entre as secundárias estão: cabeça normal solta (CASO), gota citoplasmática proximal (GOPR), gota citoplasmática distal (GODI), cauda dobrada (CD), capuchão solto (CAPS). De acordo com Hafez & Hafez (2004), o índice de patologias totais que não prejudica a fertilidade é de 20%. Bilbao (1996) reportou valores de até 25% de patologias espermáticas para a espécie de coelhos.

Tabela 6 – Diferentes níveis de vitamina C sobre as patologias espermáticas em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Table 6 - Different vitamin C levels on spermatic pathologies in New Zealand White rabbits with six months of age

PAT*		Vitamina C (mg/kg ração)									
		Vitamin C (mg/kg ration)									
		0		75		150		225		300	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	Means	SD	Means	SD	Means	SD	Means	SD	Means	SD	
NO	51,021	20,123	54,043	17,650	53,853	15,494	50,250	18,797	57,349	18,273	
PT	48,979	20,123	45,957	17,650	46,147	15,494	49,750	18,797	42,754	18,252	
PP	29,128	14,955	27,585	15,290	29,084	12,220	31,181	15,468	25,785	13,693	
PS	19,846	11,839	18,319	11,028	17,147	9,950	18,590	12,051	16,790	9,943	
Primárias	CAB	0,087	0,390	0,081	0,388	0,257	0,958	0,124	0,431	0,113	0,656
	CABI	0,067	0,250	0,075	0,284	0,162	0,502	0,065	0,247	0,097	0,449
	CAPE	1,944	6,817	0,441	0,863	0,707	1,679	2,362	10,474	1,015	3,527
	CARE	0,087	0,416	0,043	0,309	0,131	0,542	0,124	0,984	0,123	0,523
	CDE	0,667	1,303	0,597	1,112	1,005	1,712	0,762	2,002	0,651	1,340
	CEN	0,985	2,360	1,016	3,209	1,230	2,517	0,973	1,993	0,944	2,241
	CENF	0,272	0,720	0,183	0,529	0,288	0,621	0,335	0,876	0,231	0,668
	CQF	0,287	0,673	0,403	0,926	0,372	0,797	0,432	0,948	0,308	0,792
	CQI	0,769	1,721	0,694	1,044	0,691	1,043	0,784	1,305	0,697	1,204
	CQIN	1,554	3,000	1,269	2,660	1,382	2,560	1,805	3,570	1,426	2,801
	CQJC	3,072	3,353	3,070	3,408	3,120	3,156	3,551	3,538	2,985	3,105
	MACRO	0,267	0,528	0,328	0,593	0,466	0,813	0,405	1,054	0,405	0,763
	MICRO	6,682	10,836	6,473	14,028	3,691	3,308	3,676	3,984	4,882	6,842
	Secundárias	CD	10,554	9,828	11,231	9,663	13,513	10,433	13,681	11,551	10,277
CAPS		0,005	0,072	0,027	0,219	0,016	0,161	0,005	0,074	0,036	0,311
CASO		9,349	6,876	9,296	7,522	7,586	6,440	9,249	7,739	8,749	6,413
CAUSO		7,738	7,421	6,801	7,362	5,094	4,041	5,508	4,723	4,954	5,167
CDF		1,774	2,475	1,591	1,969	2,110	3,009	1,995	2,439	1,574	1,976
EDCO		0,021	0,142	0,005	0,073	0,021	0,176	0,011	0,104	0,005	0,072
GODI		0,415	1,250	0,392	1,407	0,880	2,900	0,351	1,230	0,297	1,022
GOPR		2,364	3,808	1,887	3,519	3,403	5,790	3,649	7,462	2,728	4,815

\* Patologias Espermáticas: NO – normais (%); PT – patologias totais (%); PP – patologias primárias (%); PS – patologias secundárias (%); CD – cauda dobrada; CAB – cauda abaxial; CABI – cauda bifurcada; CAPE – cabeça periforme; CAPS – capuchão solto; CARE – cabeça raquetiforme; CASO – cabeça solta; CAUSO - cauda solta; CDE – cauda degenerada; CDF – cauda dobrada na porção final; CEN – cauda enrolada; CENF – cauda enrolada na porção final; CQF - cauda quebrada na porção final; CQI – cauda quebrada na porção inicial; CQIN – cauda quebrada na porção intermediária; CQJC – cauda quebrada junto à cabeça; EDCO – edema de colo; GODI – gota citoplasmática distal; GOPR – gota citoplasmática proximal; MACRO – macrocefalia; MICRO – microcefalia.

\* Spermatic Pathologies: NO – normal (%); PT – total pathologies (%); PP – primary pathologies (%); PS – secondary pathologies (%); CD - bent tail; CAB - abaxial tail; CABI - forked tail; CAPE - pyriform head; CAPS - free cap; CARE - raquetiform head; CASO - tailless; CAUSO - headless; CDE - degenerate tail; CDF - final bent tail; CEN - coiled tail; CENF - final coiled tail; CQF - Final broken tail; CQI – initial broken tail; CQIN - mid-piece broken tail; CQJC - tail broken close head; EDCO – swollen neck; GODI - distal droplet; GOPR – proximal droplet; MACRO – macrocephalic sperm; MICRO – microcephalic sperm.

Dentre as patologias espermáticas, a cauda dobrada (CD), classificada como secundária, foi a que se apresentou em maior quantidade. A vitamina C teve um efeito significativo ( $P < 0,05$ ), apresentando o ponto máximo com 160 mg de VC/kg de ração (Figuras 11 e 12).



Figura 11 – Espermatozoides com cauda dobrada, patologia secundária em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtido de fotografia em microscópio de contraste de fase, aumento de 100X

*Figure 11 - Spermatozoa with bent tail, secondary pathology in New Zealand White rabbits with six months of age, picture obtained in microscope of phase contrast, in 100X*

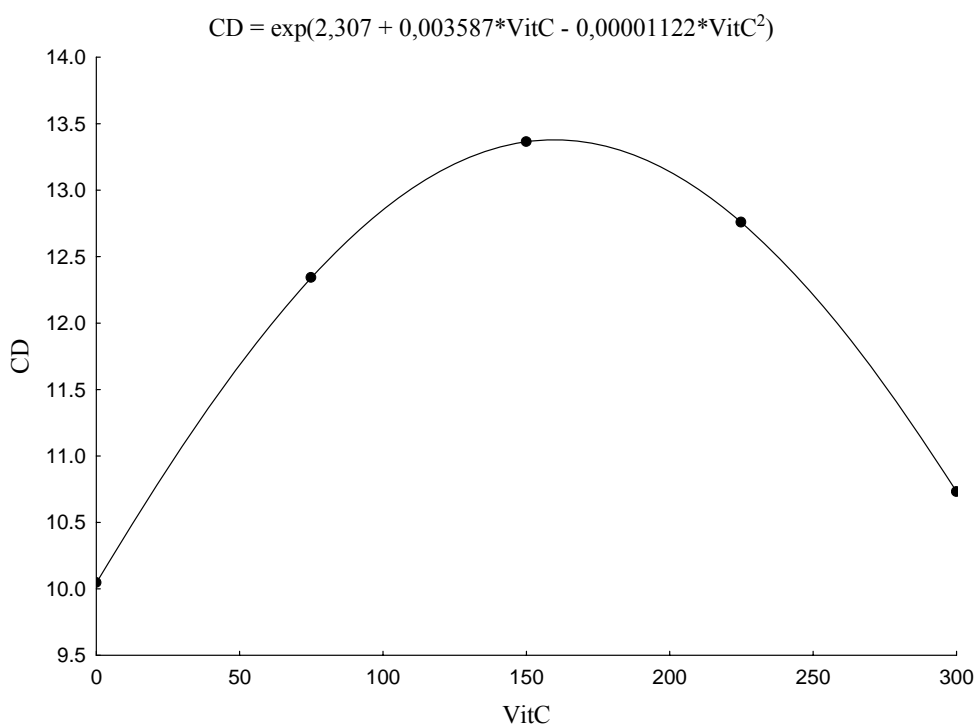


Figura 12 – Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cauda dobrada (CD) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 12 - Different vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on bent tail (CD) in New Zealand White rabbits with six months of age*

O efeito observado na figura 12 assumiu um comportamento em que os animais do tratamento com 0 mg de VC/kg de ração apresentaram 10 células de CD, tendo aumentado conforme o aumento e inclusão de vitamina C, e depois de 150 mg de VC/kg de ração a patologia voltou a diminuir, atingindo a 10,5 células no tratamento com 300 mg de VC/kg de ração. Este comportamento não tem, ainda, fundamentação teórica, pois não foi visualizado este comportamento até o momento na literatura pesquisada.

Com relação a cauda abaxial (CAB), que é classificada como primária, observou-se um efeito significativo ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos com vitamina C (Figura 13), em que o comportamento foi o mesmo observado na CD. O ponto máximo encontrado foi em 169 mg de VC/kg de ração (0,18), tendo a partir daí voltado a decrescer até atingir valores próximos aos dos controles.

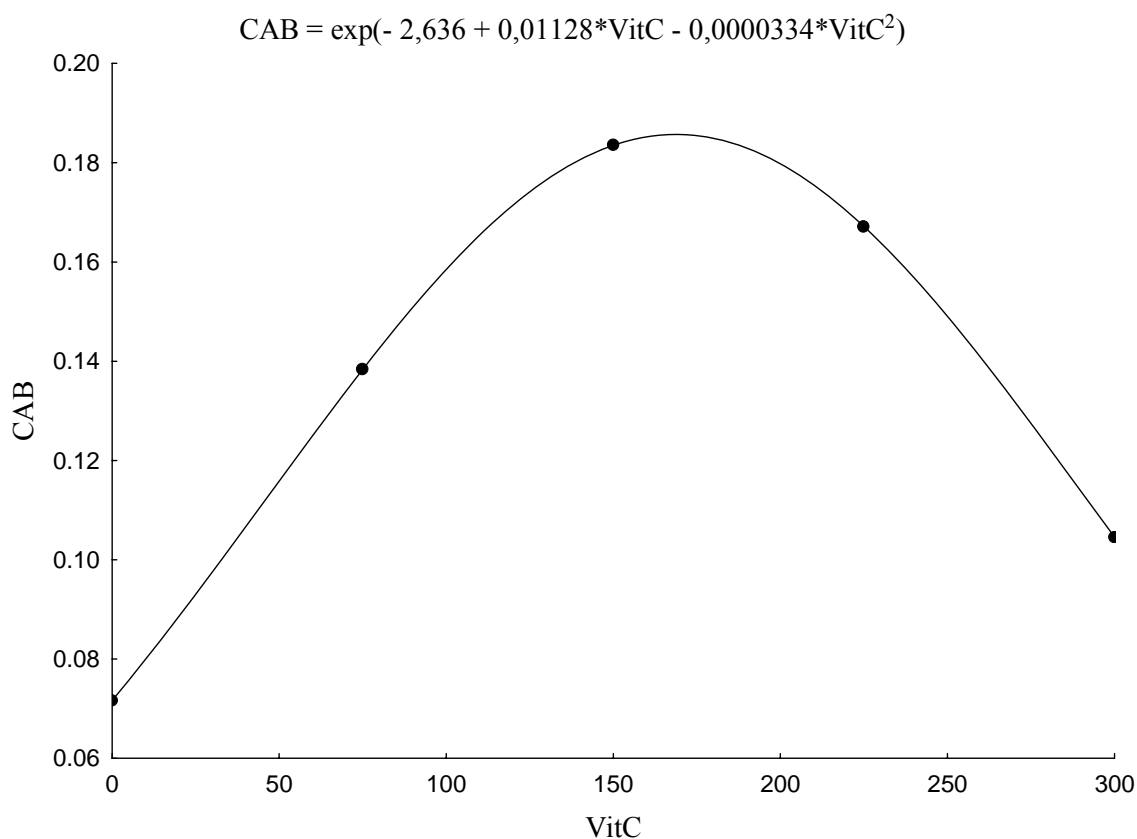


Figura 13 – Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cauda abaxial (CAB) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade  
*Figure 13 - Different vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on abaxial tail (CAB) in New Zealand White rabbits with six months of age*

A cabeça periforme (CAPE), uma das patologias primárias, foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pela selenometionina, em que o ponto máximo ocorreu em 337 mg de SeM/kg de ração (Figura 15), ilustrado pela figura 14. O comportamento foi idêntico as patologias CD e CAB. O número máximo de CAPE foi de 2,4 células no tratamento com 300 mg de SeM/kg de ração, tendo a partir daí voltado a decrescer até atingir valores próximos aos controles, não tendo sido encontrado explicação biológica para tal.

Na patologia secundária de capuchão solto (CAPS) foi observado efeito linear significativo ( $P < 0,05$ ) com relação à vitamina C, em que o tratamento 0 mg de VC/kg de ração foi o melhor, pois conforme ocorreu a adição de vitamina C, houve um aumento linear de CAPS (Figura 16), mas com relação aos tratamentos com selenometionina encontrou-se o menor valor a 273 mg de SeM/kg de ração, aproximando-se de 0 (zero), passando a se elevar a partir de 300 mg de SeM/kg de ração, provavelmente, devido os níveis elevados de selenometionina que poderiam se tornar tóxico para os espermatozoides.

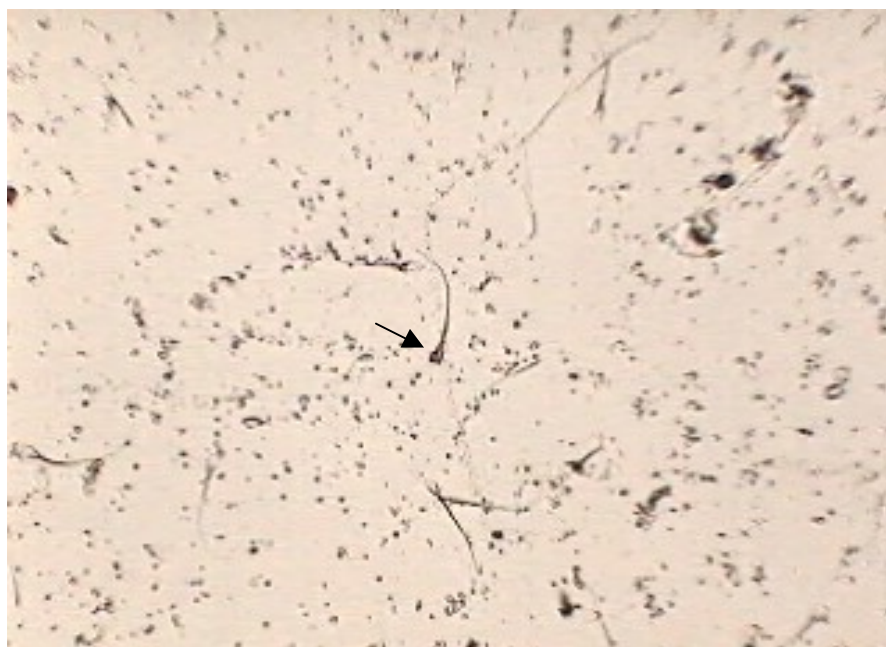


Figura 14 – Espermatozóide com cabeça periforme em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, em fotografia obtida em microscópio de contraste de fase, aumento 40X

*Figure 14 - Spermatozoa with pyriform head in New Zealand White rabbits with six months of age, in picture from phase contrast microscope, increase 40X*

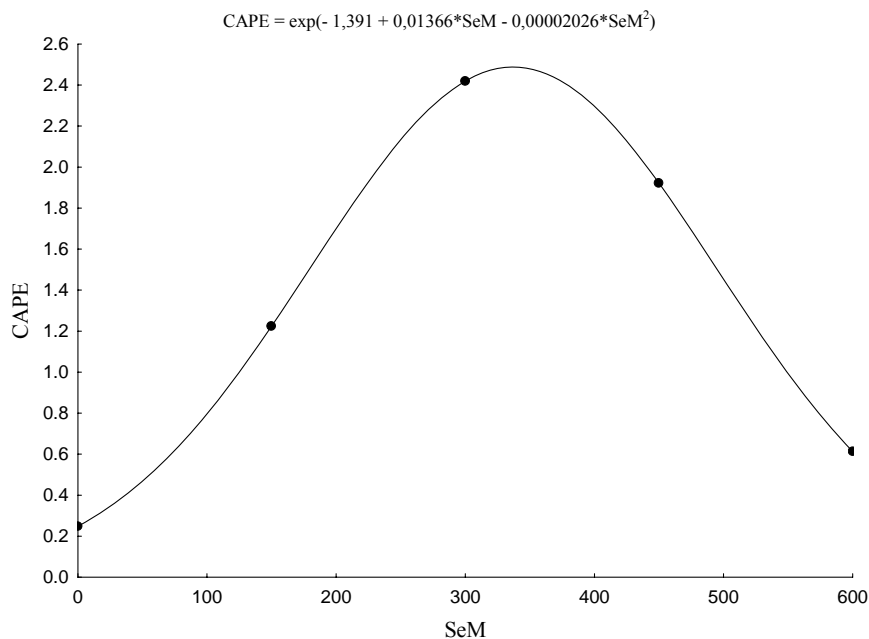


Figura 15 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre o número de espermatozoides com cabeça piriforme (CAPE) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 15 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on number of spermatozoa with pyriform head (CAPE) in New Zealand White rabbits with six months of age

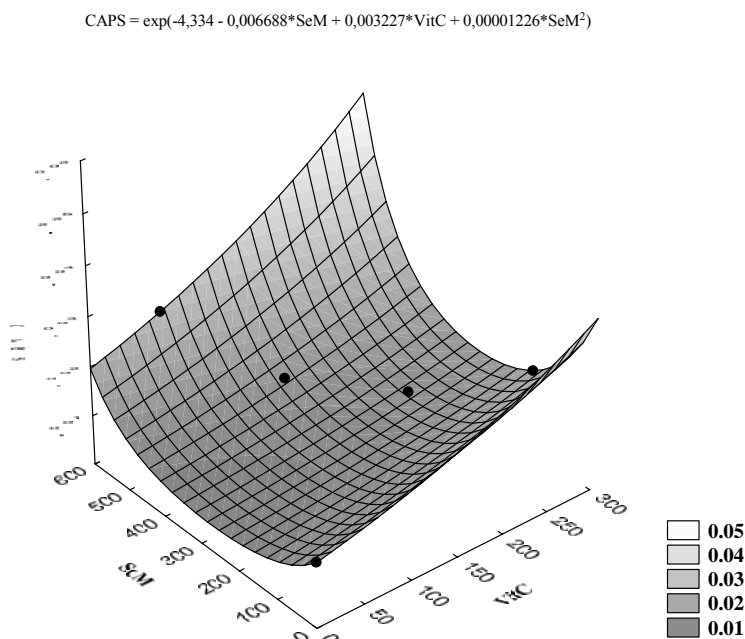


Figura 16 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre capuchão solto (CAPS) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 16 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on free cap (CAPS) in New Zealand White rabbits with six months of age

A cabeça raquetiforme (CARE), foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pelos tratamentos contendo selenometionina (Figura 17), tendo se elevado até em 311 mg de SeM/kg de ração, onde o valor foi 0,17 células, reduzindo depois para valores próximo aos do controle.

Para cauda solta (CAUSO) houve influência ( $P < 0,05$ ) da selenometionina e da vitamina C (Figura 19), ilustrada na figura 18. O ponto de maior valor da patologia foi em 380 mg de SeM/kg de ração, havendo melhora a partir deste nível. Já, nos tratamentos com Vitamina C (VC) foi observado uma diminuição linear significativa à medida que houve o aumento da VC aos tratamentos. Apesar da CAUSO ser uma patologia secundária, houve uma influência positiva da VC, melhorando esta patologia.

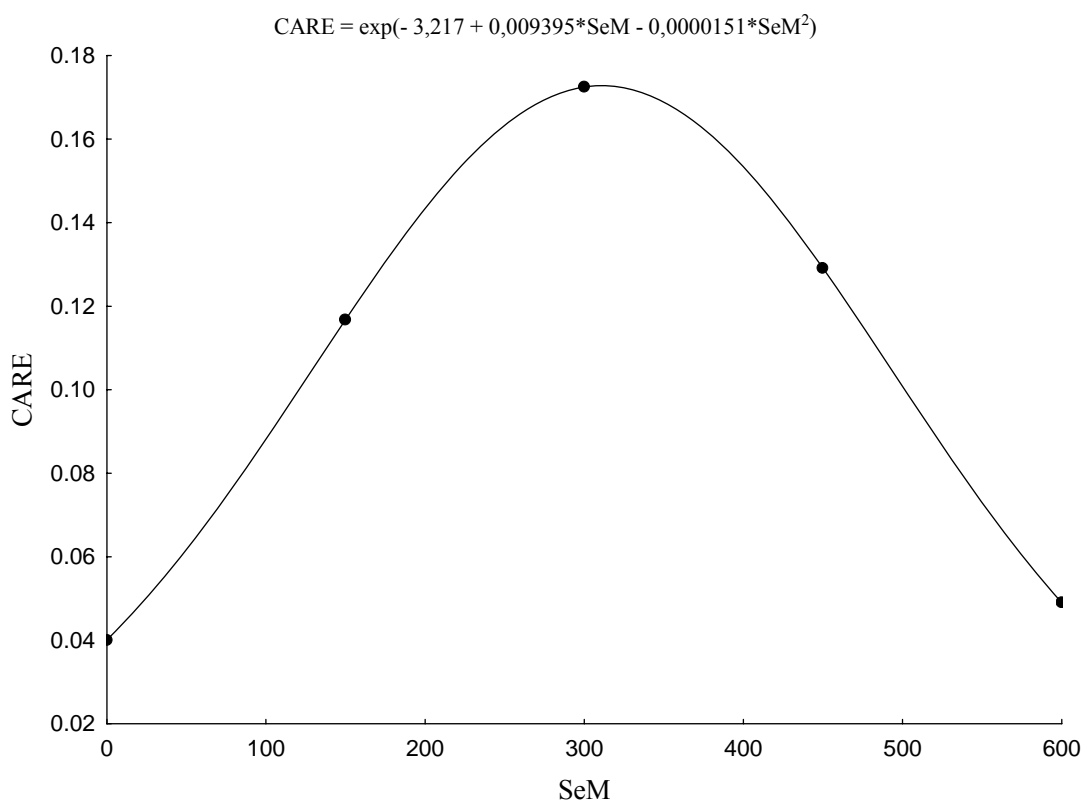


Figura 17 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre cabeça raquetiforme (CARE) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 17 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on raquetiform head (CARE) in New Zealand White rabbits with six months of age*



Figura 18 – Espermatozóide com cauda solta em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtido em microscopia de contraste de fase, aumento 40X

Figure 18 - Spermatozoa with tailless in New Zealand White rabbits with six months of age, obtained in microscope of phase contrast, in 40X

$$CAUSO = \exp(1,679 + 0,002567*SeM - 0,001518*VitC - 0,000003379*SeM^2)$$

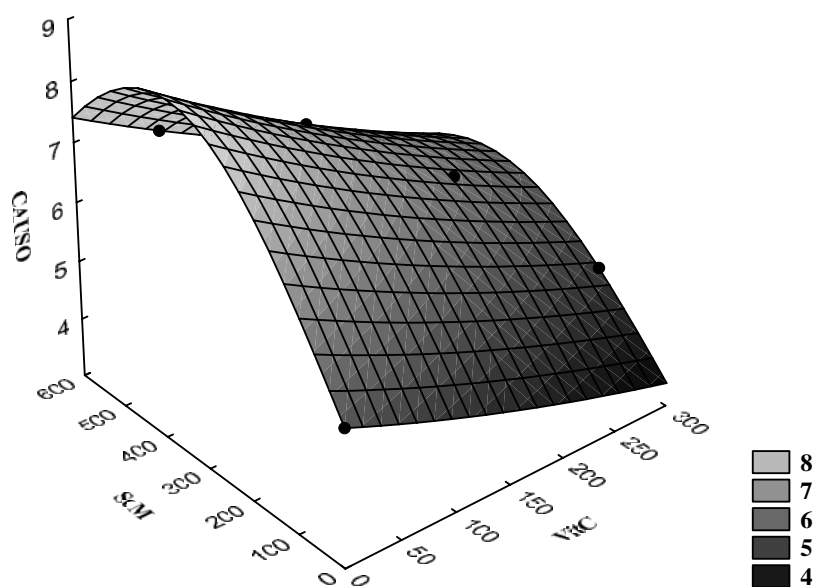


Figura 19 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a patologia cauda solta (CAUSO) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 19 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on pathology tailless(CAUSO) in New Zealand White rabbits with six months of age

Foi notado um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) com relação aos tratamentos com selenometionina sobre cauda enrolada na porção final (CENF), verificando-se valores de



0,36 células com 600 mg de SeM/kg de ração (Figura 20). Para Mies Filho (1987), o total de anormalidades espermáticas pode chegar a 20% com um máximo de 10% de anormalidades primárias ou 30%, desde que todas anormalidades sejam secundárias. O número de CENF encontrado neste estudo foi muito pequeno, não influenciando a capacidade fecundante do sêmen, se observada isoladamente.

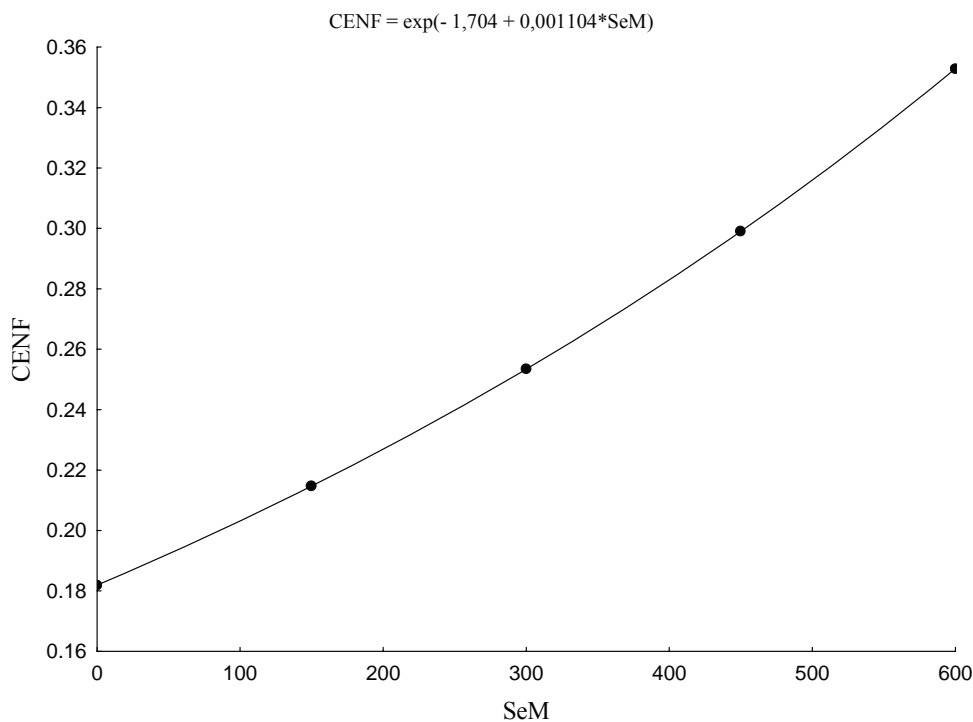


Figura 20 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre cauda enrolada (CENF) na porção final em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 20 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on final coiled tail (CENF) in New Zealand White rabbits with six months of age*

A maioria dos espermatozoides, ao entrarem no epidídimo, apresentam gota citoplasmática proximal. Esta gota representa a falta de maturação completa do espermatozoide; à medida que o espermatozoide amadurece a gota citoplasmática move-se para a região distal, no final da cauda do espermatozoide. No momento da ejaculação, muitos dos espermatozoides apresentam gota citoplasmática distal, mas esta não teria tanta importância, sendo classificada como uma patologia secundária (Axner et al., 1999). Neste estudo, os achados de gota citoplasmática (GODI) foram influenciados ( $P < 0,05$ ) pelos diferentes níveis de vitamina C (Figura 21). Até os 134 mg de VC/kg de ração, onde

o número de GODI atingiu 0,65, houve aumento desta patologia, mas deste ponto para frente houve redução progressiva, atingindo o menor valor com 300 mg de VC/kg de ração (0,25 células), revelando que doses altas de vitamina C poderiam contribuir para o amadurecimento dos espermatozóides no epidídimo.

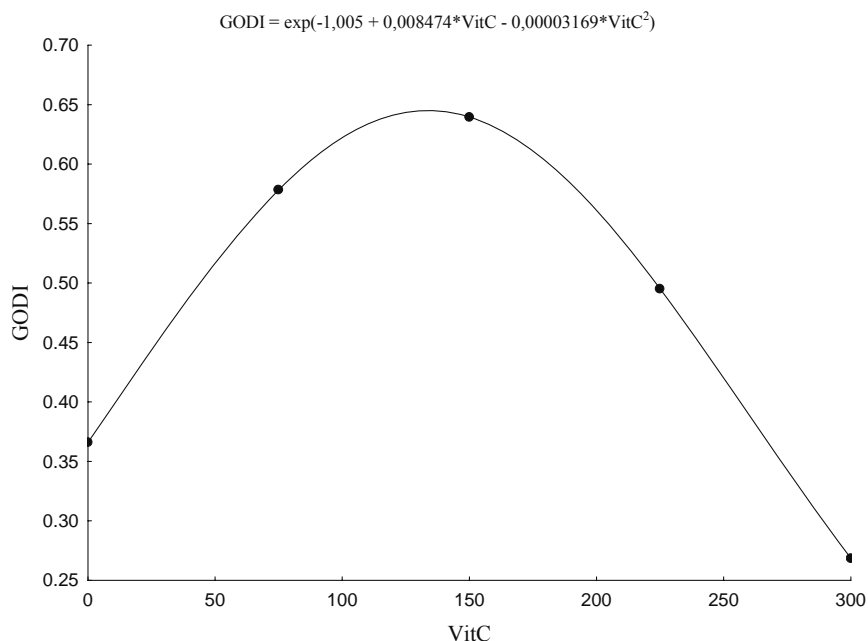


Figura 21 – Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre gota citoplasmática distal (GODI) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

*Figure 21 - Different vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on distal droplet (GODI) in New Zealand White rabbits with six months of age*

A gota citoplasmática proximal (GOPR), segundo Axner et al. (1999), pode permanecer na porção proximal da peça intermediária, mesmo depois da ejaculação, provavelmente diminuindo a capacidade fecundante deste espermatozóide. Na figura 22 é mostrada uma GOPR. Foi observada, neste trabalho, uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) das GOPR com relação aos tratamentos contendo diferentes níveis de selenometionina. O ponto de melhor resultado foi com 286 mg de SeM/kg de ração (Figura 23), chegando a 2,2 células com GOPR. Após este nível, provavelmente, por se tornar tóxico, elevou-se. Isto possivelmente demonstra que a selenometionina poderia atuar na maturação do espermatozóide, melhorando a capacidade fecundante dos mesmos.

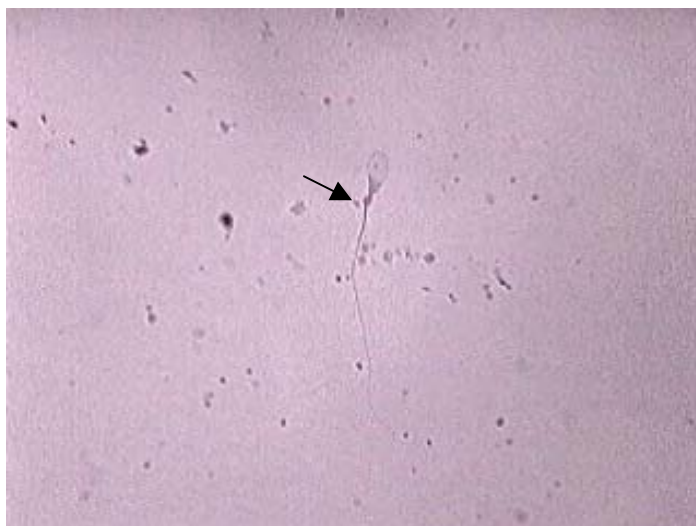


Figura 22 – Espermatozóide com gota citoplasmática proximal em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, obtida de microscópio de contraste de fase, aumento 100X

Figure 22 - Spermatozoa with proximal droplet in New Zealand White rabbits with six months of age, got from phase contrast microscope, increase of 100X

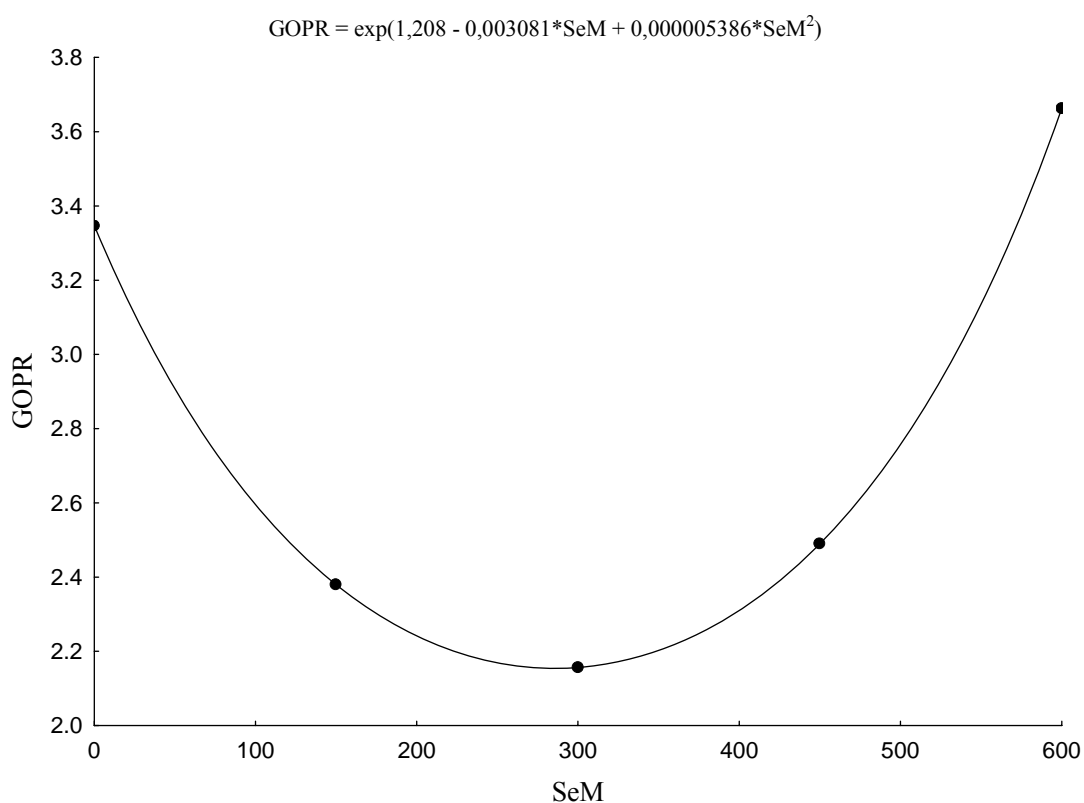


Figura 23 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) sobre gota citoplasmática proximal (GOPR) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 23 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) levels on proximal droplet (GOPR) in New Zealand White rabbits with six months of age

A microcefalia (MICRO) é uma patologia classificada como primária, que se forma durante a espermatogênese (Mies Filho, 1987) (Figura 24).

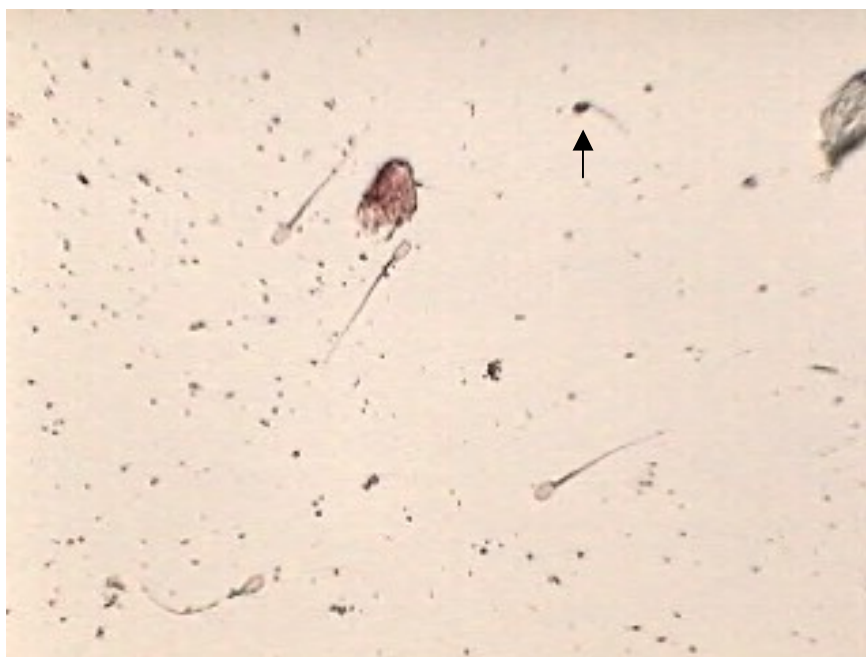


Figura 24 – Espermatozóide com microcefalia em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade. Foto obtida em microscópio de contraste de fase, aumento 40X

*Figure 24 - Microcephalic sperm in New Zealand White rabbits with six months of age. Photo obtained from phase contrast microscope, increase of 40X*

Foi observado um efeito significativo com relação a selenometionina e a vitamina C. Notou-se que a medida que foi adicionado mais SeM/kg de ração aumentaram as microcefalias espermáticas, atingindo o máximo com 360 mg de SeM/kg de ração, voltando a reduzir a partir daí até o nível de 600 mg de SeM/kg de ração. Nos tratamentos com a vitamina C encontrou melhora significativa ( $P < 0,05$ ) à medida que houve um aumento do nível de inclusão de VC aos tratamentos (Figura 25). Resultados benéficos para o sêmen eram esperados, pois a vitamina C é um dos principais antioxidantes das membranas dos espermatozóides, protegendo a célula dos danos oxidativos e formação de EROs (Nordberg & Árner, 2001). Por outro lado, era esperado melhora significativa tanto com relação à SeM quanto com relação à VC, na maioria das patologias, o que não foi

visualizado. Não era esperado, principalmente, aumento desta patologia ou de outras em consequência da suplementação com SeM.

$$\text{MICRO} = \exp(1,172 + 0,005582 * \text{SeM} - 0,001654 * \text{VitC} - 0,000007761 * \text{SeM}^2)$$

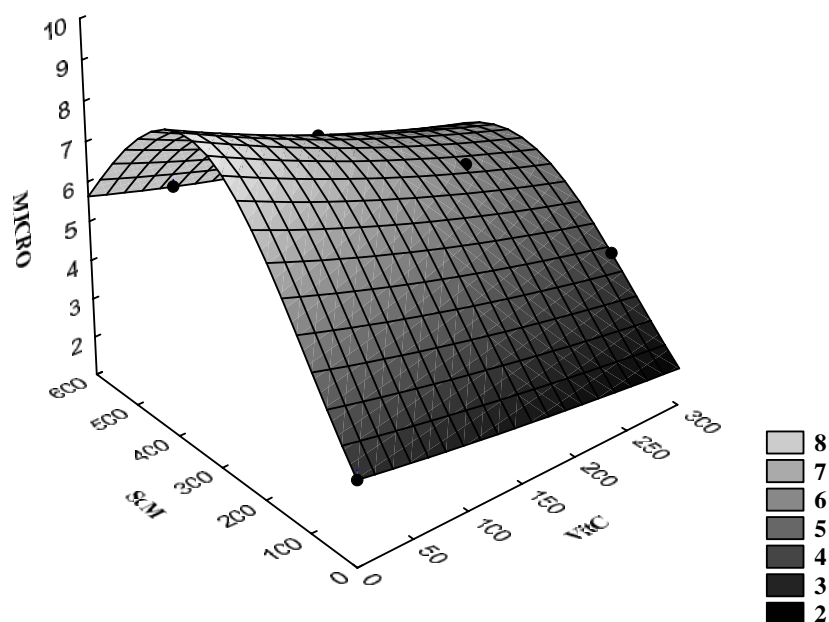


Figura 25 – Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre microcefalia (MICRO) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade

Figure 25 - Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on microcephalic sperm (MICRO) in New Zealand White rabbits with six months of age

Não foi possível encontrar, na literatura, trabalhos a respeito da influência de selenometionina e vitamina C sobre as patologias espermáticas em coelhos, o que dificultou a discussão.

## Conclusões

As patologias totais e primárias assumiram o comportamento fisiológico, de se elevarem com o aumento de adição de SeM na ração e depois de certo nível voltaram a

melhorar, mas as patologias secundárias pioraram progressivamente com aumento de selenometionina.

Os resultados mostraram, neste experimento, que as patologias espermáticas como: cauda dobrada, cauda abaxial, cabeça raquetiforme, cauda solta, gota citoplasmática distal assumiram um comportamento fisiologicamente fora do esperado, havendo piora de valores com níveis iniciais até intermediários de selenometionina e vitamina C, voltando a melhorar com níveis mais elevados. A gota citoplasmática proximal melhorou em tratamentos contendo níveis intermediários de selenometionina (300 mg de SeM/kg de ração) e a microcefalia melhorou à medida que se adicionou vitamina C na ração, demonstrando os efeitos benéficos sobre os espermatozóides, talvez por protegerem as membranas celulares dos radicais livres (EROs).

### Literatura Citada

- AEC. **Recomendações para nutrição animal**. 5 ed. France: Rhone – Poulenc, 1987. 86p.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- AITKEN, R.J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v.16, p.259-267, 1994.
- ALLTECH'S GLOBAL FOODS DIVISION. Dossiê técnico – SEL-PLEX<sup>®</sup>, 2001. Disponível em: <<http://www.alltech-bio.com/>>. Acesso em: 14 jun. 2003.
- ALVAREZ, J.G; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v.23, p.77-79, 1989.
- ALVARIÑO, J.R.M. Reproductive performance of male rabbits. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 7, 2000, Valencia. **Proceedings...** Valencia: ACAF, p.13-35, 2000.
- ANDREAZZI, M.A. **Avaliação reprodutiva de matrizes e coelhos reprodutores alimentados com ração, contendo diferentes fontes de óleos vegetais**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2002. 93p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2002.

- AXNÉR, E.; FORSBERG, C.L.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v.52, p.767-778, 1999.
- BARBOSA, F.A.; SOUZA, G.M. Influência dos principais microminerais na reprodução de bovinos (Parte final). Seções técnicas/ Reprodução e Melhoramento Genético, 2004. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/>>. Acesso em: 07 jun. 2005.
- BILBAO, M.M. Manejo en inseminación artificial: factores que afectan a la calidad seminal y al índice de fertilidad. In: SIMPOSIO CUNICULTURA, 21, 1996, Amposta. **Proceedings...**Amposta: ASESCU, p.1-9, 1996.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, v.58, p.1034–1039, 1992.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa : a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, n.1, p.15-21, 1995.
- EDENS, F. Involvement of Sel-Plex in physiological stability and performance of broiler chickens. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY. Procc. Alltech's 17<sup>th</sup> Annual Symposium. Nottingham University Press, 2001.
- EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH. Human Kinetics, Champaign, Illinois, p.35-42, 1994.
- ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004.513p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: New York, 1999.936p.
- LAGERLÖFF, N. Morphologische unterprecheegen uber veranderugon in spermabild und in deuhoclen bei bullen mit vermindeter oder aufgehobenor fertilitat. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. Uppsala, 1934, 254p.
- LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLES, R.A. Minireview : ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v.52, p.262-266, 1995.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5 ed. Porto Alegre: Sulina, v.2, 1987.783p.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society A**, v.135, n.3, p.370-384, 1972.

- NOGUCHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **Journal of Nutrition**, v.103, p.1502-1511, 1973.
- NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- SCAPINELLO, C.; MORAES, G.V.; SOUZA, M.L.R. et al. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Unimar**, v.19, n.3, p.923-931, 1997.
- SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, (Prelo), 2005.
- STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 6. <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2003>.
- WILLIAMS, W.W. Technique of collection semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. **Cornell Veterinary**, v. 10, p.87-94, 1920.
- YOUSEF, M.I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. **Toxicology**, v.207, p.81-89, 2005.



## V – Conclusões Gerais

Nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir o seguinte sobre a utilização de selenometionina e vitamina C nas rações de coelhos:

A vitamina C melhorou a cor do sêmen, a concentração espermática, tendo também aumentado linearmente o consumo de ração.

O volume, o pH, a motilidade progressiva, o vigor espermático não foram influenciados pelos diferentes níveis de selenometionina e vitamina C.

As patologias totais e primárias assumiram o comportamento fisiológico, de se elevarem com o aumento de adição de SeM na ração e depois de certo nível voltaram a melhorar, mas as patologias secundárias pioraram progressivamente com aumento de selenometionina.

Os resultados mostraram, neste experimento, que as patologias espermáticas como cauda dobrada, cauda abaxial, cabeça raquetiforme, cauda solta, gota citoplasmática distal assumiram um comportamento fisiologicamente fora do esperado, havendo piora de valores com níveis iniciais até intermediários de selenometionina e vitamina C, voltando a melhorar com níveis mais elevados. A gota citoplasmática proximal melhorou em tratamentos contendo níveis intermediários de selenometionina (300 mg de SeM/kg de ração) e a microcefalia melhorou à medida que se adicionou vitamina C na ração, demonstrando os efeitos benéficos sobre os espermatozóides, talvez por protegerem as membranas celulares dos radicais livres (EROs).

