

Efeito da vitamina E (α -Tocoferol) e de diferentes temperaturas na viabilidade de sêmen suíno refrigerado

Effect of vitamin E (α -Tocopherol) and different temperatures on cooled porcine semen viability

Camilla Pereira de Souza Labêta^{1*}, Marco Roberto Bourg de Mello², Lara Nogueira Silenciato³, Aline Matos Arrais³ & Bruno da Silva de Vasconcelos⁴

¹Zootecnista, Bolsista CAPES. Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

²Médico veterinário, Dr. Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

³Médicas veterinárias, MSc, Bolsista CAPES. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

⁴Técnico auxiliar de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição do α -tocoferol a doses de sêmen suíno refrigeradas a 5 e 15 °C durante um período de 72 horas. Amostras de sêmen (n = 9) coletadas de três cachorros adultos da raça Pietrain foram tratadas com 0 ou 200 μ g/mL de α -Tocoferol. Os tratamentos testados foram: T1: α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T2: α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C; T3: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T4: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C. Todas as amostras foram avaliadas por um período de 72 horas sendo que a motilidade e intensidade de movimentos (vigor) foram observadas a cada 12 horas, e o teste hiposmótico (HOST) a cada 24 horas. A motilidade média, o vigor e o teste hiposmótico foram analisados pelo teste do qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a motilidade, quando foram comparadas as temperaturas de 5 e 15 °C independentemente do uso do α -Tocoferol durante o período entre 12 e 72 horas. Os valores mais altos de motilidade foram obtidos com a temperatura de 15 °C. Observou-se também diferença ($p < 0,05$) para a motilidade entre temperaturas de 5 e 15 °C quando comparado apenas com as amostras acrescidas de α -Tocoferol, bem como as amostras sem esta substância. A maior motilidade foi obtida novamente com a temperatura de 15 °C. Não foi observada diferença no vigor e na integridade da membrana (teste hiposmótico) entre as amostras adicionadas ou não de α -Tocoferol, em qualquer uma das temperaturas e tempos estudados. Conclui-se que a temperatura de 15 °C foi mais eficiente para a conservação de sêmen de cachorros durante 72 horas. Conclui-se também que a adição de 200 μ g/mL de α -Tocoferol não melhorou a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração.

Palavras-chave: ejaculado, refrigeração, cachorro.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the addition of α -Tocopherol to swine insemination doses stored at 5 and 15 °C for a period of 72 hours. Semen samples (n=9) collected from three adult Pietrain boars were treated with or without 200 μ g/mL of α -Tocopherol. The treatments were: T1: α -Tocopherol + cooling to 5 °C; T2: α -Tocopherol + cooling to 15 °C; T3: no α -Tocopherol + cooling to 5 °C; T4: no α -Tocopherol + cooling to 15 °C. All samples were evaluated up to 72 hours for sperm motility and intensity of movements every 12 hours, and the hiposmotic test was performed every 24 hours. The average of the motility, the intensity of movements and hiposmotic test (HOST) were analyzed by chi-square test (χ^2) with 5% significance level. There was a significant difference ($p < 0.05$) for motility when comparing the temperatures of 5 and 15 °C regardless of α -Tocopherol during the period between 12 and 72 hours. The highest motility values were obtained at 15 °C. It was also observed a difference ($p < 0.05$) for sperm motility between temperatures of 5 to 15 °C when compared only the samples with α -Tocopherol, as well as the samples without this substance. The higher motility was obtained with 15 °C. No difference was observed for the intensity of movements and membrane integrity between samples added or not of α -Tocopherol, in any of the temperatures and times evaluated. We concluded that the temperature of 15 °C was more efficient for boar semen preservation over 72 hours. It is also concluded that the addition of 200 μ g/mL of α -Tocopherol showed no improvement in the viability of cooled porcine semen.

Keywords: ejaculate, cooling, boar.



Como citar: Labêta, C. P. S., Mello, M. R. B., Silenciato, L. N., Arrais, A. M., & Vasconcelos, B. S. (2017). Efeito da vitamina E (α -Tocoferol) e de diferentes temperaturas na viabilidade de sêmen suíno refrigerado. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 39(3), 152-159. doi:10.29374/2527-2179.bjvm011616

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses que precisam ser informados.

Recebido: Julho 21, 2016.

Aceito: Dezembro 14, 2016.

O estudo foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

*Correspondência

Camilla Pereira de Souza Labêta
Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ
Rod. BR 465, Km 47
CEP 23890-000 - Seropédica (RJ), Brasil
E-mail: labetacps@outlook.com

Copyright Labêta et al. Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution Non-Commercial, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que sem fins comerciais e que o trabalho original seja corretamente citado.

Introdução

A Inseminação Artificial (IA) é a biotécnica de reprodução assistida que mais contribuiu, e que continua contribuindo para o melhoramento genético na espécie suína (Knox, 2016). Esta biotécnica consiste na utilização de aplicadores que depositam mecanicamente o sêmen na porção cervical do trato reprodutivo feminino, sendo que para atingir melhores taxas de prenhez, é recomendável que seja feita a repetição da IA de uma a duas vezes durante o período de estro da porca (Roca et al., 2006).

Existem muitos protocolos para congelamento de sêmen de varrão, no entanto a viabilidade espermática após descongelamento é pouco satisfatória, o que vêm inviabilizando sua utilização na rotina das granjas. Assim a maioria das inseminações realizadas em suínos atualmente, é feita com sêmen refrigerado, previamente diluído, e armazenado em temperaturas que variam de 15 a 20 °C (Roca et al., 2006). Embora a preservação do sêmen através do resfriamento seja o método mais utilizado para armazenar o sêmen dos varrões (Weitze, 1991) possibilitando melhor viabilidade espermática quando comparado ao sêmen congelado, existe ainda uma grande dificuldade em manter a viabilidade do sêmen refrigerado durante prolongados períodos de tempo, o que vêm limitando a utilização da IA nas granjas de maneira mais eficiente (Watson, 2000).

Nesse contexto, manter a qualidade do sêmen por mais de 48 horas, sendo que este é o tempo máximo em que se têm conseguido manter o sêmen refrigerado viável, seria um grande avanço para os programas de inseminação artificial em suínos (Mendez et al., 2013).

Na conservação do sêmen por resfriamento, os espermatozoides de outros mamíferos são geralmente refrigerados à temperatura de 5 °C, enquanto que o sêmen suíno ainda é refrigerado entre 15 e 17 °C devido a sua sensibilidade a baixas temperaturas (Batista et al., 2012; Vidament et al., 2012). A sensibilidade do espermatozoide suíno ao resfriamento abaixo de 15 °C e sua susceptibilidade ao choque térmico pode estar relacionada à sua composição da membrana, que possui menor porcentagem de moléculas de colesterol e uma distribuição assimétrica na membrana, tendo uma quantidade maior de glicerol na monocamada interna em relação à monocamada externa, uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolípidos que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis* (Johnson et al., 2000). Outra particularidade do sêmen suíno que está associada à rápida redução da viabilidade do sêmen durante o armazenamento, é a atividade oxidativa (Ball et al., 2001). Em suínos, o sêmen é bastante suscetível à peroxidação lipídica devido ao maior teor de ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, e sua capacidade antioxidante é inferior em comparação com o sêmen de outros animais, como o de bovinos (Cerolini et al., 2000). Durante o armazenamento de sêmen suíno, foi observado que o uso de antioxidantes como a vitamina E (α -Tocoferol), parece ser capaz de suprimir a peroxidação lipídica pela captura de radicais de peroxila envolvidos na peroxidação (Wolf et al., 1998). O α -Tocoferol é um antioxidante bastante conhecido, lipossolúvel, que protege as células de radicais livres de oxigênio, *in vitro* e *in vivo*, pois se acredita que ela seja o inibidor primário das espécies reativas ao oxigênio (ROS) encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal humano (Sikka, 2004) e suíno (Satorre et al., 2007; Moraes et al., 2010a, 2010b). Sabe-se que a utilização do α -Tocoferol em concentrações ideais tem efeito antioxidante sobre o sêmen de suíno e possibilita o aumento da velocidade espermática e do percentual de motilidade dos espermatozoides (Brezezińska-Slebodzińska et al., 1995; Jeong et al., 2009). Desta forma, a adição de α -Tocoferol aos diluentes apresenta uma alternativa na tentativa de aumentar a resistência dos espermatozoides dos cachorros à peroxidação lipídica durante sua preservação (Cerolini et al., 2000; Peña et al., 2003; Breininger et al., 2005), mantendo de maneira satisfatória a viabilidade do sêmen refrigerado durante um maior intervalo de tempo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a preservação do sêmen suíno na presença ou não de α -Tocoferol em duas diferentes temperaturas de refrigeração, 5 e 15 °C, durante um período de 72 horas.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura vinculado à Coordenadoria Especial de Produção Integrada ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, Rio de Janeiro, no período de outubro a novembro

de 2014. O mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária sob número 9074210316.

Foram utilizados três cachacos adultos da raça Pietrain, com aproximadamente 350 kg, condicionados previamente ao procedimento de coleta de sêmen pelo método da mão enluvada. Os animais foram mantidos durante todo experimento em baias individuais, recebendo de 2,0-2,5 kg de concentrado diariamente por animal e água *ad libitum*.

Foram realizadas três coletas de cada cachaco, totalizando nove ejaculados. Antes das coletas os animais foram previamente submetidos ao esvaziamento manual do divertículo prepucial e higiene externa com água corrente. Os ejaculados foram obtidos através da técnica de mão enluvada com auxílio de manequim para execução de monta, sendo o sêmen coletado em saco plástico introduzido previamente em uma garrafa térmica, contendo papel filtro em sua borda para reter a fração gelatinosa liberada durante a ejaculação. As frações gelatinosas foram desprezadas e as amostras seminais obtidas foram imediatamente levadas ao laboratório no próprio Setor de Suinocultura, sendo mantidas em banho-maria a 37 °C, até o término das análises laboratoriais.

Na avaliação dos parâmetros seminais de acordo com Mies Filho (1987), foram previamente analisados o volume e concentração dos ejaculados obtidos. O volume (mL) foi determinado pela pesagem do ejaculado em balança analítica considerando-se a densidade do sêmen igual a um grama por mililitro, e a concentração espermática (sptz/mL) realizada pela diluição do sêmen *in natura* em água na proporção de 1:100, sendo posteriormente depositado em câmara de Neubauer procedendo-se a contagem da quantidade de células com auxílio de microscópio óptico.

A motilidade e vigor de todas as amostras seminais (sêmen *in natura* e refrigerado) foram submetidas à avaliação dos parâmetros físicos. Ambas as avaliações foram realizadas de maneira subjetiva, através da deposição de uma gota de sêmen puro entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37 °C, posteriormente avaliadas em microscópio óptico com aumento de 400X. A motilidade foi expressa em percentagem (%) de acordo com a proporção de espermatozoides móveis no campo avaliado, e vigor em escore de zero a cinco (0-5), onde zero significou ausência de movimento dos espermatozoides e cinco movimento intenso (Hafez & Hafez, 2004).

Foi realizado o teste hiposmótico, na qual a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada. Para tanto, uma alíquota de 30 μ L de sêmen diluído foi adicionada a 300 μ L de solução 100 mOsm (9g de frutose mais 4,9 g citrato de sódio diluídos em um litro) e mantida a 37 °C por 30 minutos. Foram realizadas preparações úmidas, adicionando uma gota do sêmen após a incubação entre lâmina e lamínula. Em seguida foi realizada a contagem de 100 células, em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000X, considerando células com a cauda linear como lesadas e células com cauda leve ou fortemente enrolada como íntegras (Vazquez et al., 1997). Para esse parâmetro foi atribuído um valor expresso em porcentagem (%).

A diluição do sêmen foi realizada apenas nos ejaculados que apresentaram um padrão mínimo de concentração espermática (1×10^8 sptz/mL), de motilidade (70%) e de vigor (3), e posteriormente feita refrigeração. Os ejaculados foram diluídos de maneira que a concentração espermática após a diluição fosse de aproximadamente 30 milhões de espermatozoides viáveis por mililitro (Hafez & Hafez, 2004). Para isso foi utilizado diluidor comercial MR-A[®]3, onde 49,5g deste reagente foram diluídos em 1 litro de água destilada e deionizada pré-aquecida a 37 °C. Para avaliar o efeito do α -Tocoferol (Sigma T3251), parte do diluidor foi acrescida do α -Tocoferol na concentração de 200 μ g/mL. Os ejaculados diluídos foram armazenados em frascos plásticos de 100 mL, totalizando quatro frascos para cada ejaculado obtido, dois com e dois sem acréscimo de α -Tocoferol, sendo estes posteriormente submetidos à refrigeração.

Após a diluição, os frascos foram submetidos a um tempo de bancada de 70 minutos para que o sêmen chegasse à temperatura ambiente. Posteriormente foram refrigeradas em duas diferentes temperaturas, 5 °C ou 15 °C, com auxílio de duas geladeiras convencionais monitoradas durante todo o período de resfriamento por termômetro.

Foram realizados quatro tratamentos para cada ejaculado obtido (n=9) de acordo com a presença ou ausência de α -Tocoferol no diluidor e a temperatura de resfriamento (5 °C ou 15 °C), sendo o Tratamento 1: α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; Tratamento 2: α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C, Tratamento 3: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; Tratamento 4: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C.

As amostras refrigeradas foram avaliadas quanto aos parâmetros físicos de motilidade e de vigor a cada 12 horas, em um período total de 72 horas. As avaliações de funcionalidade dos espermatozoides foram realizadas sempre pelo mesmo técnico a cada 24 horas, até que se fosse observada ausência total de motilidade dos espermatozoides da amostra. Ambas as avaliações se iniciaram no tempo zero (TO), sendo este determinado pelo término do tempo de bancada, ou seja, antes das amostras serem levadas à refrigeração. Durante as avaliações com o sêmen refrigerado uma alíquota de 1mL de cada tratamento foi depositada em microtubo de centrífuga previamente identificado, em seguida armazenada em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos, procedendo-se as avaliações conforme citado acima.

Os valores médios de motilidade, de vigor e de número de células no teste hiposmótico, foram analisados pelo Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%, sendo para isso utilizado o programa estatístico GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows.

Resultados

Inicialmente foram comparados os parâmetros avaliados (motilidade, vigor e número de células no teste hiposmótico) entre os três cachos sendo que não foi observada diferença ($p>0,05$) para nenhum desses parâmetros entre os três animais. Desta maneira foi demonstrada apenas a média geral das repetições, conforme cada tratamento. Portanto, a Tabela 1 apresenta as médias de motilidade e seus respectivos desvios padrões das amostras submetidas à refrigeração, acrescidas ou não de α -Tocoferol, pelo período de 72 horas, nas temperaturas de 5 e 15 °C.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) para motilidade, no tempo zero (TO) entre todas as amostras, independente do acréscimo ou não do α -Tocoferol, refrigeradas nas temperaturas de 5 e 15 °C. Porém houve diferença significativa ($p<0,05$) para motilidade a partir de 12 horas até às 72 horas, sendo os maiores valores de motilidade obtidos nas amostras refrigeradas a 15 °C (Figura 1) quando comparada às amostras refrigeradas a 5 °C.

Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras refrigeradas nas temperaturas de 5 e 15 °C acrescidas ou não de α -Tocoferol. Em ambos os casos, foram observados que a temperatura de 15 °C sempre apresentou maior motilidade, quando comparado à temperatura de 5 °C (Figuras 2 e 3).

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) para vigor nem para integridade de membrana em nenhum dos tempos avaliados entre as amostras, independentes do acréscimo ou não do α -Tocoferol, refrigeradas nas temperaturas de 5 ou 15 °C. Também não houve diferença significativa ($p>0,05$) para os mesmos parâmetros, físico ou funcional, em nenhum dos tempos avaliados, nem entre as amostras acrescidas ou não de α -Tocoferol, nem entre as temperaturas de 5 ou 15 °C de refrigeração. As Tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, as médias de vigor e integridade de membrana e os respectivos desvios padrões das amostras submetidas à refrigeração acrescidas ou não de α -Tocoferol, avaliadas durante o período de 72 horas, nas temperaturas de 5 e 15 °C.

Tabela 1. Médias \pm desvios padrões referentes à motilidade do sêmen submetido à refrigeração, avaliado durante o período de 72 horas, com acréscimo ou não de α -Tocoferol em diluidor, nas temperaturas de 5 e 15 °C.

Tratamento	Tempo de resfriamento (horas)						
	0	12	24	36	48	60	72
T1	71,1 \pm 1,92	33,3 \pm 15,28 ^x	31,1 \pm 17,11 ^x	25 \pm 10,93 ^x	20 \pm 11,67 ^x	20 \pm 11,67 ^x	12,78 \pm 12,29 ^x
T2	71,1 \pm 1,92	54,4 \pm 1,92 ^y	50,56 \pm 4,19 ^y	45,56 \pm 1,92 ^y	36,67 \pm 8,82 ^y	33,33 \pm 8,82 ^y	23,33 \pm 12,02 ^y
T3	70 \pm 3,33	32,78 \pm 13,37 ^a	26,10 \pm 14,37 ^a	22,78 \pm 10,84 ^a	17,78 \pm 9,18 ^a	15,56 \pm 7,52 ^a	8,33 \pm 7,64 ^a
T4	70 \pm 3,33	53,33 \pm 0 ^b	47,78 \pm 3,47 ^b	43,33 \pm 6,67 ^b	36,7 \pm 10 ^b	31,1 \pm 13,47 ^b	18,89 \pm 13,47 ^b

^{a,b}Médias na mesma coluna, seguidas por letras sobscritas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$); ^{x,y}Médias na mesma coluna, seguidas por letras sobscritas diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$); T1: α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T2: α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C; T3: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T4: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C.

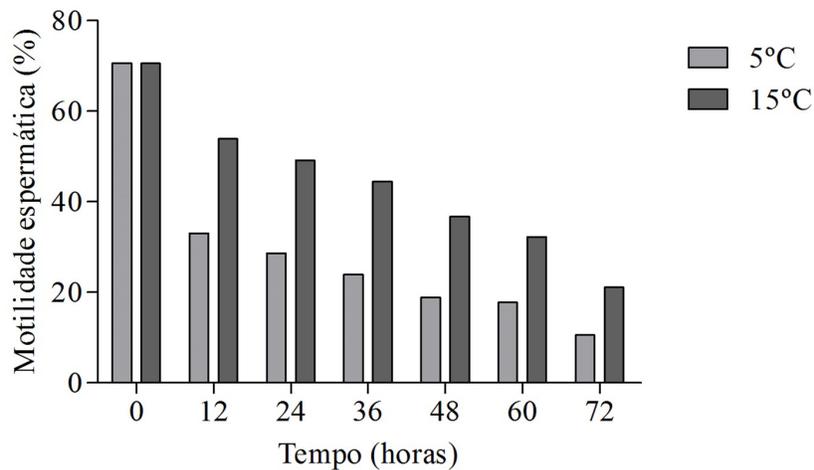


Figura 1. Médias de motilidade (%) das amostras de sêmen submetido à refrigeração nas temperaturas de 5 ou 15 °C, independente do acréscimo ou não de α -Tocoferol, avaliados durante o período de 72 horas.

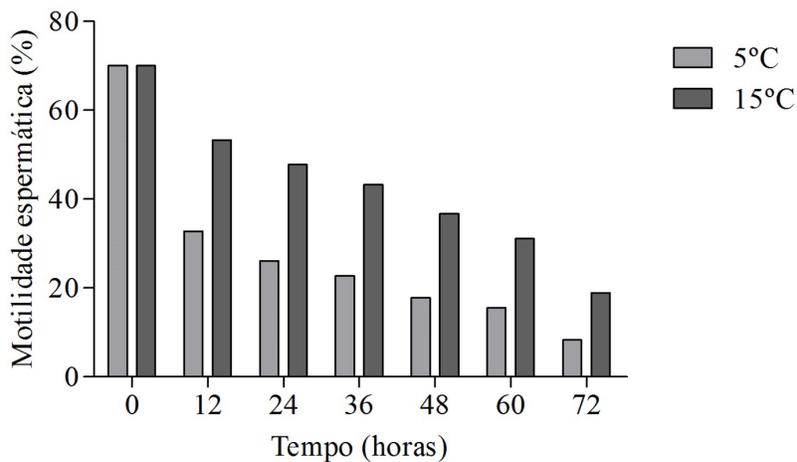


Figura 2. Médias de motilidade (%) das amostras de sêmen submetido à refrigeração nas temperaturas 5 ou 15 °C, com diluidor acrescido de α -Tocoferol, sendo avaliados durante o período de 72 horas.

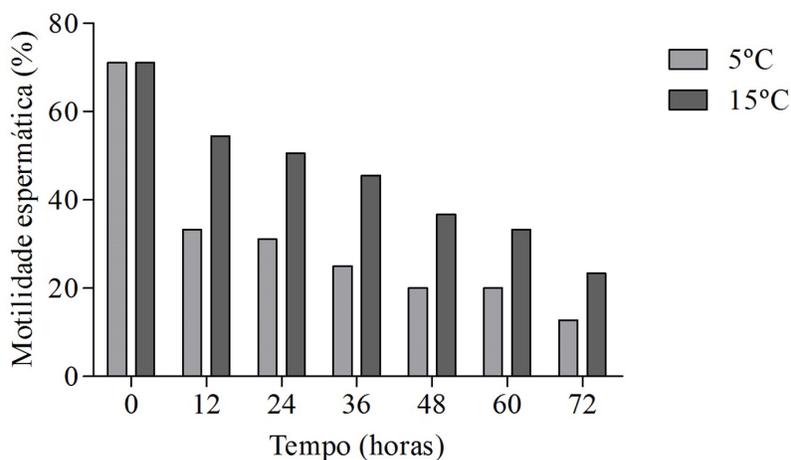


Figura 3. Médias de motilidade (%), das amostras de sêmen submetido à refrigeração nas temperaturas 5 ou 15 °C, com diluidor sem acréscimo de α -Tocoferol, avaliados durante o período de 72 horas.

Tabela 2. Médias \pm desvios padrões de vigor do sêmen submetido à refrigeração, avaliados durante o período de 72 horas, com acréscimo ou não de α -Tocoferol em diluidor, nas temperaturas de 5 e 15 °C.

Tratamento	Tempo de resfriamento (horas)						
	0	12	24	36	48	60	72
T1	3 \pm 0	2,22 \pm 0,19	2 \pm 0,58	1,78 \pm 0,51	1,44 \pm 0,19	1,33 \pm 0	1,11 \pm 0,38
T2	3 \pm 0	2,67 \pm 0	2,67 \pm 0	2,44 \pm 0,38	2,11 \pm 0,51	1,89 \pm 0,19	1,89 \pm 0,51
T3	2,78 \pm 0,19	2 \pm 0,58	2 \pm 0,58	1,78 \pm 0,51	1,56 \pm 0,19	1,44 \pm 0,19	0,89 \pm 0,38
T4	2,78 \pm 0,19	2,67 \pm 0,33	2,44 \pm 0,51	2 \pm 0,33	2 \pm 0,33	2 \pm 0,33	1,44 \pm 0,19

T1: α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T2: α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C; T3: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T4: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C.

Tabela 3. Médias \pm desvios padrões referentes à integridade de membrana do sêmen submetido à refrigeração, avaliados durante o período de 72 horas, com acréscimo ou não de α -Tocoferol em diluidor, nas temperaturas de 5 e 15 °C.

Tratamento	Tempo de resfriamento (horas)							
	0		24		48		72	
	Cauda							
	Enrolada	Linear	Enrolada	Linear	Enrolada	Linear	Enrolada	Linear
T1	40,28 \pm 12,29	59,72 \pm 8,76	39,24 \pm 8,90	60,76 \pm 7,59	29,67 \pm 6,69	70,33 \pm 6,69	30,56 \pm 4,86	69,44 \pm 4,86
T2	42,61 \pm 3,79	57,39 \pm 8,76	38,31 \pm 2,59	62,69 \pm 9,55	36 \pm 5,78	64 \pm 7,43	42,61 \pm 3,18	57,39 \pm 1,67
T3	34,22 \pm 3,79	65,78 \pm 1,11	32,89 \pm 2,59	67,11 \pm 5,50	28,33 \pm 5,78	71,67 \pm 1,40	36,00 \pm 3,18	64 \pm 4,57
T4	36,06 \pm 1,11	63,94 \pm 8,76	37,56 \pm 5,50	62,44 \pm 9,55	30,61 \pm 1,40	69,39 \pm 7,43	39,81 \pm 7,92	60,19 \pm 1,67

T1: α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T2: α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C; T3: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 5 °C; T4: ausência de α -Tocoferol + refrigeração a 15 °C.

Discussão

Muitas pesquisas têm sido realizadas para a obtenção de resultados mais consistentes na refrigeração do sêmen suíno, baseando-se na utilização de substâncias como α -Tocoferol, que reduz o estresse oxidativo do sêmen, sendo este apontado como um dos principais fatores de redução da viabilidade espermática durante a refrigeração do sêmen. O acréscimo de α -Tocoferol na concentração 200 μ g/mL em diluidor na tentativa de melhorar a viabilidade do sêmen suíno submetido à refrigeração, não se mostrou vantajoso neste estudo, independente da temperatura utilizada, corroborando com Mendez et al. (2013), que avaliaram diferentes concentrações de α -tocoferol (100, 200, 400 μ g/mL) e também não observaram nenhuma ação sobre a motilidade espermática, entre essas concentrações ao longo de 72 horas de refrigeração a 15 °C.

No presente estudo, esperava-se encontrar maiores valores de motilidade, nas amostras acrescidas de α -Tocoferol, em ambas as temperaturas (5 e 15 °C), já que Breininger et al. (2005) submeteram o sêmen suíno a temperaturas ainda mais baixas que 5 °C, para realização de congelamento, com concentrações α -Tocoferol de 200, 500 e 1000 μ g/mL e observaram maiores valores de motilidade quando comparados com amostras congeladas sem o uso desta substância. A diferença observada entre os resultados do presente estudo e os de Breininger et al. (2005) pode ser explicada pelas diferentes técnicas de preservação do sêmen (congelamento versus refrigeração). Talvez o estresse oxidativo seja mais prejudicial para os espermatozoides durante os processos de congelamento, do que ao de refrigeração, já que a utilização do α -Tocoferol no presente trabalho, com sêmen refrigerado, não trouxe melhorias a motilidade, em nenhuma das temperaturas utilizadas (5 ou 15 °C). Desta maneira o fator mais importante durante o processo de refrigeração ainda parece ser a sensibilidade dos espermatozoides a temperatura de preservação, sendo os melhores resultados de motilidade observados entre todas as amostras refrigeradas a 15 °C.

Katzer et al. (2005) avaliaram a viabilidade do sêmen suíno refrigerado a temperaturas de 5 e 17 °C em meio BTS ("Beltsville Thawing Solution") e observaram motilidade superior quando o sêmen foi preservado a 17 °C. Da mesma forma, Althouse et al. (1998) compararam as temperaturas de 8, 10, 12, 14 e 17 °C, do sêmen suíno diluído em meio ANDROHEP e observaram motilidade

superior a 75% nas amostras preservadas entre 12 e 17 °C, durante 48 horas de refrigeração, e motilidade inferior a 70% nas amostras mantidas entre 8 e 10 °C, sugerindo que a temperatura crítica para resfriamento do sêmen suíno encontra-se a abaixo de 12 °C.

Esses resultados corroboram com Mendez et al. (2013), que também não observaram nenhum efeito sobre o vigor dos espermatozoides, ao utilizar α -Tocoferol no sêmen refrigerado a 15 °C ao longo de 72 horas, e também com Satorre et al. (2012) que observaram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) para quantidade de espermatozoides com membrana íntegra de amostras de sêmen congelados em diluidor acrescido ou não de α -Tocoferol, o que é contraditório uma vez que se esperava uma redução do estresse oxidativo resultando na melhor preservação de membranas com o uso dessa substância. Talvez haja necessidade de se testar outras concentrações de α -Tocoferol assim como avaliar maiores tempos de incubação do sêmen nos diluidores com antioxidante. Desta maneira mais estudos devem ser realizados sobre os mecanismos de ação do α -Tocoferol em espermatozoides, já que não foi observado, no presente estudo, nenhum benefício relacionado ao seu acréscimo juntamente ao diluidor para refrigeração. No entanto existem trabalhos que apontam melhorias na motilidade quando α -Tocoferol é utilizado para o congelamento do sêmen suíno.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostraram que, a temperatura de 15 °C preservou de maneira mais eficiente o sêmen suíno refrigerado ao longo das 72 horas; e o uso de α -Tocoferol na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ não trouxe benefícios ao sêmen suíno refrigerado ao longo das 72 horas.

Referências

- Althouse, G. C., Wilson, M. E., Kuster, C., & Parsley, M. (1998). Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extender porcine semen. *Theriogenology*, 50(4), 535-543. PMID:10732145.
- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., & Baumbe, J. (2001). Effect of antioxidants on the preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology*, 56(4), 577-589. PMID:11572439.
- Batista, M., Santana, M., Alamo, D., Gonzalez, F., Nino, T., Cabrera, F., & Gracia, A. (2012). Effects of incubation temperature and semen pooling on the viability of fresh, chilled and freeze-thawed canine semen samples. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 1049-1055. PMID:22458911.
- Breining, E., Beorlegui, N. B., O'Flaherty, C. M., & Beconi, M. T. (2005). Alphatocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63(8), 2126-2135. PMID:15826678.
- Brezezińska-Slebodzińska, E., Sleboziński, A. B., Pietras, B., & Wiczorek, G. (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*, 47(1-3), 69-74. PMID:7779577.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., & Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 58(1-2), 99-111. PMID:10700648.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2004). *Reprodução animal* (7. ed., p. 509). São Paulo: Manole.
- Jeong, Y. J., Kim, M. K., Song, H. J., Kang, E. J., Ock, S. A., Kumar, B. M., Balasubramanian, S., & Rho, G. J. (2009). Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58(2), 181-189. PMID:19141297.
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 143-172. PMID:10924823.
- Katzer, L. H., Bernardi, M. L., Bortolozzo, F. P., & Wentz, I. (2005). Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5 °C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. *Ciência Rural*, 35, 138-144.
- Knox, R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93. PMID:26253434.
- Mendez, M. F. B., Zangeronimo, M. G., Rocha, L. G. P., Faria, B. G., Pereira, B. A., Fernandes, C. D., Chaves, B. R., Murgas, R. V., & Sousa, L. D. S. (2013). Effect of the addition of IGF-1 and vitamin E to stored boar semen. *Animal*, 7(5), 793-798. PMID:23211508.
- Mies Filho, A. (1987). *Inseminação artificial* (6. ed., Vol. 2, p. 750). Porto Alegre: Sulina.
- Moraes, E. A., Torres, C. A. A., Guimarães, J. D., Carvalho, G. R., Murgas, L. D. S., & Costa, E. P. (2010a). Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5 °C. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1460-1468.
- Moraes, E. A., Torres, C. A. A., Guimarães, J. D., & Murgas, L. D. S. (2010b). Efeito de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características físicas e morfológicas do sêmen in natura de suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 521-527.

- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78(1-2), 85-98. PMID:12753785.
- Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Cuello, C., Parrilla, I., & Martínez, E. A. (2006). Challenges in pig artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(Supl 2), 43-53. PMID:16984468.
- Satorre, M. M., Breininger, E., & Beconi, M. T. (2012). Cryopreservation with α -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 78(7), 1548-1556. PMID:22925635.
- Satorre, M. M., Breininger, E., Beconi, M. T., & Beorlegui, N. B. (2007). α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 68(7), 958-965. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.021>. PMID:17765961.
- Sikka, S. C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, 25(1), 5-18. PMID:14662779.
- Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., & Roca, J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47(4), 913-922. PMID:16728040.
- Vidament, M., Magistrini, M., Le Foll, Y., Levillain, L., Yvon, J. M., Duchamp, G., & Blesbois, E. (2012). Temperatures from 4 to 15 °C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. *Theriogenology*, 78(2), 297-307. PMID:22578619.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. PMID:10844218.
- Weitze, K. F. (1991). Long-term storage of extender boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 26, 231-253.
- Wolf, R., Wolf, D., & Ruocco, V. (1998). Vitamin E: the radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 10(2), 103-117. PMID:9553906.