

**ADIÇÃO DE TROLOX AO DILUENTE LEITE EM PÓ DESNATADO,
DURANTE A CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO A 10 °C**

*(Addition of Trolox into skimmed milk powder extender
during the boar semen storage at 10 °C)*

Ricardo Toniolli¹; Luciana de Souza Toniolli¹; Lina Raquel Santos Araújo²; Aline
Viana Dias²; Tatyane Bandeira Barros²; Daianny Barboza Guimarães²;
Ludymila Furtado Cantanhêde²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (Labsuís) – FAVET/UECE; ²Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV /UECE; Av. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi,
Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-000.

RESUMO

Os antioxidantes são capazes de proteger as células do estresse oxidativo, podendo ser utilizados em diluentes de refrigeração, a fim de aumentar a viabilidade do sêmen. O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da adição de diferentes concentrações de trolox sobre espermatozoides suínos diluídos e conservados em leite em pó desnatado (LPD) a 10 °C. Foram utilizados 63 ejaculados, submetidos a 4 tratamentos: T1 = LPD (controle); T2 = LPD+25.000µg de trolox/100mL; T3 = LPD+50.000µg de trolox/100mL; e T4 = LPD+75.000µg de trolox/100mL. Foram realizadas análises diárias (D0 a D4) de vigor e motilidade e nos D0 e D4 foi realizado o teste hiposmótico, vitalidade espermática e integridade acrossomal. As médias de vigor e motilidade do T1 foram superiores em relação aos demais tratamentos, embora não diferentes do T2 e T3 (D0 a D2). O T4 apresentou as piores médias de vigor e motilidade, não diferindo do T3. O percentual de espermatozoides vivos e integridade de membranas plasmática e acrossomal, não foram diferentes entre os tratamentos, tanto no D0 quanto no D4. A adição de trolox ao diluente LPD não promoveu efeitos benéficos sobre a conservação do sêmen. Elevadas concentrações de trolox prejudicaram a qualidade espermática, não sendo aplicáveis na preparação de doses inseminantes. A ausência de efeitos positivos sugere uma possível interferência do diluente LPD sobre a ação antioxidante do trolox. Maiores estudos são necessários, a fim de se poder evidenciar a ação do trolox; bem como sua possível interação com o diluente do sêmen.

Palavras-chave: sêmen suíno, leite em pó desnatado, trolox, antioxidante.

ABSTRACT

Antioxidants are able to protect cells from oxidative stress and may be used in refrigeration extenders to increase the sperm viability. The present study aimed to

Endereço para correspondência:
ricardo.toniolli@uece.br

determine the effects of adding different concentrations of trolox on boar spermatozoa diluted and stored in skimmed milk powder (LPD) at 10 °C. In 63 ejaculates were used and subjected to four treatments: T1 = LPD (control); T2 = LPD+25.000µg of trolox/100mL; T3 = LPD+50.000µg of trolox/100mL; and T4 = LPD+75.000µg of trolox/100mL. Analyzes of vigor and sperm motility were performed daily (D0 to D4). At D0 and D4 hiposmotic, sperm vitality and acrosomal integrity tests were performed. The mean vigour and motility of T1 were higher compared to the other treatments, although not different from T2 and T3 (D0 to D2). The T4 had the worst average vigour and motility, not differing from T3. The percentages of live sperm and integrity of plasma and acrosomal membranes were not different between treatments, both D0 and in D4. The addition of the trolox in LPD diluent did not promote beneficial effects on the preservation of semen. High concentrations of trolox impaired sperm quality, not being an applicable option in the preparation of insemination doses. The absence of positive effects suggests a possible interference of LPD on the antioxidant activity of trolox. Further studies are necessary to demonstrate the antioxidant activity of trolox, as well its possible interaction with the semen extender.

Keywords: boar semen, skimmed milk powder, trolox, antioxidant

INTRODUÇÃO

O sêmen suíno difere em vários aspectos do sêmen de outros animais domésticos, sendo mais vulnerável ao choque térmico, após sua coleta. Usualmente, a sua temperatura de conservação varia entre 15 a 20 °C (JOHNSON *et al.*, 2000); entretanto, já foi verificado que essa faixa de temperatura é imprópria à preservação do sêmen por períodos prolongados de tempo (BRAGA, 2007).

O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) é um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, que foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado por suas propriedades antioxidantes no uso, visando a

preservação de óleos e gorduras. A ação desta substância é eficaz, tanto em gordura animal quanto vegetal (SCOTT *et al.*, 1974). Os antioxidantes são inibidores de radicais livres, que suprimem a formação de espécies reativas ao oxigênio e/ou suas ações. A sua adição ao diluente de sêmen tem sido avaliada quanto à capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico dos metabólitos reativos do oxigênio (MAIA, 2006). Estudos têm mostrado que a vitamina E (α -tocoferol) foi capaz de interagir diretamente com radicais oxidantes (GIULIVI *et al.*, 1992), protegendo as células do estresse oxidativo (TIRADO e BROWN, 2005) e minimizando os possíveis danos às membranas plasmática e acrossomal

(MAIA, 2006); bem como ao DNA (DONNELLY *et al.*, 1999). Ela pode ser utilizada em diluentes de refrigeração, a fim de aumentar o tempo da viabilidade espermática no sêmen diluído (BORBA NETO *et al.*, 2010), possibilitando melhora da motilidade dos espermatozoides (MAIA, 2006).

Sabe-se que a escolha do diluente interfere diretamente sobre os resultados de fertilidade. A literatura apresentou o leite desnatado como um diluente alternativo para o sêmen de diversas espécies de mamíferos. Utilizado como diluente de sêmen, foi de uso prático e efetivo na proteção do espermatozoide, quando estocado a baixas temperaturas (4 °C) (GARCIA e GRAHAN, 1987; MEIRELLES *et al.*, 1998), sendo mesmo capaz de melhor preservar a motilidade espermática, do que outros diluentes (KULAKSIZ *et al.*, 2012). Provavelmente, sua ação benéfica para o gameta foi devido ao fato de possuir componentes (BARTELLIER *et al.*, 1998), como a caseína (LUSIGNAN *et al.*, 2011) lipoproteínas e lecitinas, que promovem a proteção da célula espermática contra o choque térmico, quando adicionadas ao sêmen, antes do resfriamento (FOOTE, 1974; MEMON e OTT, 1981).

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da adição de

diferentes concentrações de Trolox sobre espermatozoides suínos diluídos e conservados à temperatura de 10 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

01. Animais e colheita do sêmen

O sêmen de sete reprodutores suínos, em sistema rotineiro de trabalho, foi colhido uma vez por semana, durante 9 semanas consecutivas (n = 63), por meio da técnica da mão enluvada, em recipiente coberto por filtro e protegido por copo térmico. Foi utilizado o ejaculado total, após a separação da parte gelatinosa retida em filtro (HANCOCK e HOVELL, 1959). Foram utilizados animais com idade variando entre 12 e 36 meses, provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen – FAVET/UECE. Os animais eram alojados em baias individuais, arraçoados uma vez ao dia com 2,5 Kg de ração de reprodução e água à vontade.

O presente estudo atendeu aos critérios solicitados pela CEUA-UECE, com o projeto de pesquisa (processo nº 11223066-0/48), aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 29 de setembro de 2011.

02. Avaliação dos ejaculados *in natura*

A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada pelas seguintes características: concentração espermática

($\times 10^6$ sptz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz), vigor espermático (notas de 0 a 5) (TONIOLLI, 1996) e motilidade espermática (valores de 0 a 100%) (MARTIN-RILLO *et al.*, 1996). Apenas os ejaculados que apresentaram vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 85\%$ foram utilizados no experimento.

03. Diluição do sêmen e tratamentos experimentais

Foi separado, de cada ejaculado, um total de $2,1 \times 10^9$ sptz, distribuído entre quatro tratamentos a uma concentração de 35×10^6 sptz/mL, com um volume final de 15 mL (sêmen+diluyente) por tratamento. Este volume foi repartido em cinco tubos de ensaio por tratamento (3 mL = 105×10^6 sptz/tubo). O dia da colheita foi considerado dia zero (D0), e o sêmen foi conservado até quatro dias após colheita (D4), com análises diárias no D0, D1, D2, D3 e D4. O meio de diluição/conservação testado neste experimento foi o leite em pó desnatado (LPD), preparado em água destilada nas seguintes proporções: 10g de LPD + 0,194g glicose +100mL de água destilada + sulfato de gentamicina (80mg/100mL). Os tratamentos experimentais testados

foram os seguintes: 01) o LPD, como tratamento controle (T1); 02) o LPD + 25.000 μ g de Trolox/100 mL (1000μ M) (T2); 03) o LPD + 50.000 μ g de Trolox/100 mL (2000μ M) (T3); 04) o LPD + 75.000 μ g de Trolox/100 mL (3000μ M) (T4). A composição do leite desnatado utilizado no presente experimento encontra-se na Tab. 1 e o nível de vitamina E incluso no produto foi desconsiderada (1,8 mg em 10 g).

Os diluentes foram sempre preparados no dia da colheita e mantidos a 30 °C; em seguida à entrada do sêmen no laboratório e respectivas análises, de cada ejaculado, retirou-se quatro amostras de sêmen *in natura*, que eram colocadas em banho-maria a 30 °C por 10 minutos. Após esse tempo, cada amostra foi diluída com o diluyente correspondente à cada tratamento, até atingir o volume final/tratamento (15 mL). Esse volume foi fracionado em 5 tubos, sendo cada um deles correspondente a um dia de análise.

Após a diluição a 30 °C, as amostras foram colocadas em geladeira a 17 °C, onde permaneceram por mais uma hora, antes de serem transferidas à temperatura de 10 °C (conservação).

Tabela 1. Composição do leite em pó desnatado utilizado para compor um dos tratamentos do experimento.

Composição	Quantidade em 10 g
Carboidratos	5600 mg
Proteínas	2100 mg
Sódio	30 mg
Cálcio	200 mg
Ferro	1,7 mg
Vitamina A	56,4 µg
Vitamina D	0,6 µg
Vitamina E	1,8 mg
Vitamina C	9,2 mg
Ácido fólico	48 µg

04. Conservação e análises do sêmen após diluição

O sêmen diluído foi conservado durante 5 dias (D0, D1, D2, D3 e D4). A cada dia de análise, foram retirados os tubos de cada ejaculado/tratamento, incubados a 37 °C por 10 minutos, para, em seguida, a realização das devidas análises. Foram verificadas as seguintes características: vigor espermático, motilidade espermática (percentagem de células móveis); integridade acrossomal, vitalidade espermática (células vivas) e espermatozoides reativos ao teste hiposmótico.

4.1. Vigor espermático e motilidade espermática (% células móveis)

Visando a avaliação da qualidade espermática, foram analisados o vigor espermático (0 a 5) (TONIOLLI, 1996) e a percentagem de células móveis (0 a 100%) (MARTINRILLO *et al.*, 1996) em microscopia óptica, colocando-se uma gota de sêmen de 15mL, entre lâmina e lamínula, com avaliação em três campos do microscópio, em aumento de 200 vezes. As análises destas características foram realizadas diariamente, durante todo o período de conservação (D0, D1, D2, D3 e D4).

4.2. Morfologia acrossomal e vitalidade espermática (% células vivas)

As amostras para avaliação destas características foram

processadas, visando as análises em D0 (≥ 6 horas após colheita e diluição - Exame 1) e no D4 (após 10 minutos de reaquecimento a 37 °C - Exame 2), avaliando-se as duas características em uma mesma lâmina. Foram feitos esfregaços de sêmen, corados pelo azul de bromofenol, contando-se 200 células/lâmina em microscopia óptica com lente de imersão (1000x). A solução corante foi composta de: azul de bromofenol (0,1g); citrato de sódio (0,4g); água destilada (10mL), separando-se células vivas de mortas (MEDEIROS *et al.*, 2006). Juntou-se uma gota de sêmen (15 μ L) com outra de corante (15 μ L), sendo, em seguida, homogeneizada. Após 30 segundos, procedeu-se ao esfregaço, sendo secado à temperatura ambiente (25 °C). Para esta análise, os espermatozoides foram classificados em quatro categorias: 1) Vivos, com acrossoma intacto; 2) Vivos, com acrossoma danificado; 3) Mortos, com acrossoma intacto; 4) Mortos, com acrossoma danificado (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

4.3. Teste hiposmótico

Este teste também foi realizado nos dias D0 e D4, visando a avaliação da funcionabilidade da membrana

espermática, através de uma prova de resistência ao choque osmótico. A técnica consistiu da adição de 0,5 mL de sêmen diluído em 7,5 mL de água destilada, mantidos por 15 minutos em banho-maria a 37 °C (solução A). Após este período de incubação, em 1 mL da solução A, foi adicionado 0,5 mL de formol salino a 1% (solução B). Da solução B, foi retirada uma alíquota de 15 μ L, colocada em uma lâmina, recoberta por laminula e, em seguida, levada ao microscópio óptico, com um aumento de 400x, sendo contado um total de 200 células/lâmina (GRAHAM e MOCÉ, 2005). Um espermatozoide com cauda reta era indicativo de perda de função da membrana e os que permaneceram com membrana íntegra (células reativas) apresentaram diferentes níveis de enrolamento e/ou dobramento da cauda. Considerou-se um bom sêmen, aquele que apresentou, como resultado do teste, no mínimo 50% de espermatozoides com cauda enrolada e/ou dobrada (BARIL *et al.*, 1993).

05. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso, onde

cada ejaculado foi considerado uma repetição ($r = 63$), sendo submetido aos 4 tratamentos. Aplicaram-se os testes Mann-Whitney, para a comparação de médias entre grupos e Qui-quadrado, para os resultados expressos em percentagem, em que se realizou

contagem de células. Usou-se o Programa *StatView* (versão 5.0.1; SAS Institute Inc, 1992-1998) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 2. Análise do vigor espermático do sêmen suino conservado em LPD a 10 °C, adicionado de Trolox em diferentes concentrações.

Tratamentos (μM)	Dias de Conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
0	2,9 \pm 1,1 ^a	2,7 \pm 1,0 ^a	2,5 \pm 0,9 ^a	2,0 \pm ,8 ^a	1,6 \pm 0,8 ^a
1000	2,9 \pm 1,0 ^a	2,6 \pm 1,1 ^{ab}	2,3 \pm 0,9 ^a	2,0 \pm 0,8 ^a	1,2 \pm 0,7 ^b
2000	2,7 \pm 1,0 ^a	2,5 \pm 1,1 ^{ab}	2,2 \pm 0,9 ^{ab}	1,7 \pm 0,6 ^b	1,1 \pm 0,5 ^b
3000	2,7 \pm 1,0 ^a	2,3 \pm 1,1 ^b	1,9 \pm 0,8 ^b	1,5 \pm 0,7 ^b	1,0 \pm 0,5 ^b

a, b - letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) – Teste de Mann-Whitney

Resultados semelhantes foram obtidos com concentrações intermediárias de Trolox (500, 1000 e 1500 $\mu\text{M}/100\text{mL}$) em LPD, não sendo observado efeito do referido produto na melhoria ou na manutenção do vigor espermático, durante o período de conservação (FREITAS *et al.*, 2011). Em contrapartida, adição de 1000 μM de Trolox ao diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) foi benéfica, na conservação do sêmen suino, apresentando melhores resultados médios de vigor espermático, em relação ao tratamento controle (TONIOLLI *et al.*, 2011). Como foi verificado, este efeito

não se repetiu quando se utilizou o LPD como meio de conservação para o sêmen suino, com este diluente parecendo mascarar ou impedir a ação antioxidante do Trolox. Aparentemente, a ação do mesmo pode estar na dependência do tipo de diluente de sêmen utilizado.

Concentrações mais baixas de vitamina E (100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), adicionadas ao diluente BTS, não promoveram efeitos positivos sobre vigor espermático em suínos (MENDEZ, 2011). Ainda existe uma grande variabilidade nas respostas da qualidade espermática, quando adicionado o antioxidante Trolox ao meio de diluição,

sendo, desta forma, necessários estudos adicionais, no sentido de se poder determinar se realmente existe uma influência positiva desta substância sobre o vigor espermático do sêmen conservado e qual a melhor concentração para que estes resultados sejam obtidos.

Os resultados de porcentagem de células móveis (Tab. 3) apresentaram a mesma tendência, observada com vigor espermático, com o tratamento controle apresentando as maiores medias para essa característica. Entretanto, o tratamento

controle não foi estatisticamente diferente das amostras tratadas com 1000 μ M de Trolox, durante todo o periodo de conservação. As amostras tratadas com 2000 e 3000 μ M não foram diferentes estatisticamente do D0 ao D4. Mais uma vez, as amostras com 3000 μ M de Trolox apresentaram resultados médios mais baixos para motilidade, quando comparados aos obtidos com o tratamento sem adição do antioxidante aqui avaliado ($p < 0,05$).

Tabela 3. Análise da motilidade espermática do sêmen suíno conservado em LPD a 10°C, adicionado de Trolox em diferentes concentrações.

Tratamentos (μ M)	Dias de conservação				
	D0	D1	D2	D3	D4
0	64,4 \pm 24,7 ^a	58,4 \pm 22,6 ^a	50,5 \pm 20,8 ^a	38,3 \pm 20,6 ^a	29,1 \pm 19,0 ^a
1000	64,0 \pm 23,0 ^a	52,4 \pm 24,8 ^{ab}	46,5 \pm 21,5 ^{ab}	34,9 \pm 19,1 ^{ab}	23,0 \pm 18,0 ^{ab}
2000	59,1 \pm 23,6 ^{ab}	50,0 \pm 22,3 ^b	40,5 \pm 19,9 ^{bc}	30,9 \pm 16,5 ^{ab}	20,9 \pm 14,6 ^b
3000	55,5 \pm 24,7 ^b	46,8 \pm 23,6 ^b	35,3 \pm 19,4 ^c	28,5 \pm 16,3 ^b	18,9 \pm 15,6 ^b

a, b, c - letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) - Teste de Mann-Whitney

Trabalhos recentes, inclusive com o mesmo meio de conservação (LPD), também não demonstraram efeitos positivos da adição de Trolox (500, 1000 e 1500 μ M) sobre a motilidade espermática do sêmen suíno, conservado a 17 °C (FREITAS *et al.*, 2011). Concentrações baixas (100, 200, 300 e 400 μ g/mL) de vitamina E, adicionadas ao BTS, também não

promoveram efeitos benéficos (MENDEZ, 2011). No sêmen humano, o Trolox, mesmo utilizado em baixas concentrações (20, 40 e 60 μ M), apresentou um efeito prejudicial sobre a motilidade espermática em meio *Biggers, Whitten and Wittingham* (BWW), apesar de ter apresentado uma redução de espécies reativas ao

oxigênio (EROs) pelos espermatozoides (DONNELLY *et al.*, 1999).

Embora o estresse oxidativo tenha sido muito maior após a criopreservação do sêmen (MAIA, 2006), a ação do Trolox também não foi notória, na manutenção da motilidade após descongelação do sêmen ovino, conservado em meio Tris (MAIA, 2006) e gema de ovo (RODELLO, 2010). Em discordância com estes estudos, a adição de 1000 μ M de Trolox ao diluente BTS foi benéfica na conservação do sêmen suíno, apresentando melhores resultados médios de motilidade espermática, em relação ao tratamento sem essa substância (TONIOLLI e TONIOLLI, 2010). Dessa forma, tanto o meio utilizado como diluente, quanto a espécie animal em questão, pareceram ter influência sobre a ação antioxidante do produto sobre as células

espermáticas, proporcionando, assim, esta diversidade de resultados.

Devido à natureza lipídica da vitamina E (α -tocoferol) e de seus análogos, é possível que esta possa afetar a composição da membrana, quando presente em elevadas quantidades, interferindo nas trocas iônicas e, conseqüentemente, no metabolismo espermático (MENDEZ, 2011); dessa forma, prejudicando a motilidade espermática.

Conforme apresentado na Tab. 4, o total de espermatozoides vivos em D0 e D4 não diferiu entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$). Da mesma forma, a adição de Trolox ao diluente não produziu efeito sobre o percentual de espermatozoides com acrossoma intacto, apresentando-se semelhante entre os tratamentos (Tab. 5), durante todo o período de conservação do sêmen ($p<0,05$).

Tabela 4. Análise do total de espermatozoides vivos (vitalidade - %) do sêmen suíno, conservado durante 5 dias no diluente LPD a 10 °C, adicionado de Trolox em diferentes concentrações.

Tratamentos (μ M)	Dias de conservação	
	D0	D4
0	67,2 \pm 19,7 ^a	25,8 \pm 16,1 ^a
1000	65,4 \pm 20,1 ^b	25,3 \pm 17,0 ^a
2000	65,8 \pm 19,1 ^b	23,9 \pm 17,6 ^a
3000	62,3 \pm 24,2 ^a	17,6 \pm 13,7 ^a

a - letras iguais na mesma coluna indicam diferenças não significativas ($p>0,05$) – Teste Qui-quadrado

Tabela 5. Análise do total de espermatozoides com acrossoma intacto (%) do sêmen suíno, conservado durante 5 dias no diluente LPD a 10 °C, adicionado de Trolox em diferentes concentrações.

Tratamentos (μM)	Dias de conservação	
	D0	D4
0	94,0 \pm 5,3 ^a	91,3 \pm 7,0 ^a
1000	93,6 \pm 5,6 ^a	86,8 \pm 16,3 ^a
2000	93,9 \pm 5,5 ^a	90,0 \pm 8,8 ^a
3000	94,3 \pm 5,0 ^a	88,6 \pm 8,5 ^a

a - letras iguais na mesma coluna indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) – Teste Qui-quadrado

Diferente dos resultados encontrados neste estudo, em relação a estas duas características, a adição de Trolox em diluentes TRIS ou BTS foi benéfica. Quando se utilizou BTS como diluente adicionado de Trolox (400 μM), observou-se maior percentagem de espermatozoides vivos, com acrossoma intacto, durante o período de conservação do sêmen suíno (D0 = 62,9% e D4 = 62,6%), indicando melhor ação protetora da substância nesta concentração, que se manteve estável entre o primeiro e último dia de conservação. Quando se utilizou uma concentração maior do antioxidante (600 μM), obteve-se maior percentual de células vivas (72,6%) (GUIMARÃES e TONIOLLI, 2010). Entretanto, no presente estudo, concentrações ainda mais elevadas de Trolox (1000, 2000 e 3000 μM) não proporcionaram aumento desta ação protetora, que poderia ser

traduzida por melhores resultados médios destas características, durante a conservação do sêmen. Mas uma vez, os resultados indicam uma possível interação entre o Trolox e o diluente do sêmen utilizado.

Em estudo utilizando 200 $\mu\text{g/mL}$ da vitamina E no diluente BTS, manteve-se um maior percentual de células vivas, durante cinco dias de estocagem a 19 °C, em relação ao diluente sem vitamina E (CEROLINI *et al.*, 2000). Ela estava presente, tanto na membrana celular, quanto no plasma seminal (SIKA, 2004), sendo a alimentação dos animais capaz de influenciar esse parâmetro (MORAES *et al.*, 2010). A concentração de vitamina E na membrana é muito baixa, geralmente igual ou inferior a 0,05-0,1 nmol/mg de proteína. Por outro lado, a taxa de geração de radicais na membrana lipídica pode ser muito elevado, sob

determinadas circunstâncias (SIKA, 2004). Portanto, a adição de antioxidantes traria benefícios, uma vez que o sistema antioxidante celular não é potente o bastante para prevenir a peroxidação lipídica, principalmente durante a estocagem *in vitro*, quando a produção de radicais livres pode ser resultante de mudanças metabólicas.

Além desse aspecto, a vitamina E disponibilizada via diluente, devido às suas propriedades lipofílicas, pode ser incorporada à membrana espermática, aumentando sua resistência à peroxidação lipídica (CEROLINI *et al.*, 2000). Com as características bioquímicas melhoradas, os espermatozoides mantiveram a integridade de membrana, durante todo o período de armazenamento (cinco dias); o que, mais uma vez, sugeriu a existência de interferência do diluente utilizado no presente estudo sobre a ausência de efeitos benéficos.

A adição do α -tocoferol no diluente de sêmen caprino teve efeito positivo sobre a integridade da membrana plasmática do espermatozoide congelado, sendo a concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$ a melhor para essa finalidade (WAHJUNINGSIH e RACHMAWATI, 2012). Resultados positivos também foram obtidos com sêmen ovino descongelado, onde o

Trolox apresentou um efeito benéfico sobre a manutenção da integridade da membrana acrossomal de espermatozoides, em relação ao controle em diluente Tris (MAIA, 2006). Entretanto, em meio Tris-gema, a Vitamina E, mesmo em associação com outros antioxidantes, não proporcionou maior integridade acrossomal no sêmen ovino (SOARES *et al.*, 2010). Possivelmente, o meio à base de LPD, por já exercer ação protetora sobre a célula espermática (FOOTE, 1974; MEMON e OTT, 1981; LUSIGNAN *et al.*, 2011a), não possibilitou o aumento dessa resposta, quando da adição do produto antioxidante.

Em relação ao teste hiposmótico (Tab. 6), os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), ou seja, o Trolox, nas diferentes concentrações estudadas, não produziu efeitos benéficos sobre a integridade de membrana. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por outros pesquisadores, quando se adicionou a vitamina E ao diluente de ressuspensão do sêmen descongelado (SOARES *et al.*, 2010). Em estudo com sêmen caprino, concentrações de 25, 50 e 100 μM não afetaram o percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, ou seja, a adição de vitamina E não melhorou a

funcionabilidade da membrana espermática (PENITENTE FILHO, 2011).

Por outro lado, os antioxidantes são inibidores de radicais livres que suprimem a formação de espécies reativas ao oxigênio e/ou suas ações. Estudos têm mostrado que a vitamina E (α -tocoferol) foi capaz de proteger as células de estresse oxidativo (TIRADO e

BROWN, 2005) e de danos das membranas plasmática e acrossomal (MAIA, 2006), podendo ser utilizado em diluentes de refrigeração, a fim de aumentar a viabilidade do sêmen (BORBA NETO *et al.*, 2010). Tais benefícios não foram observados, quando se utilizou Trolox em leite em pó desnatado, como diluente para sêmen suino, acondicionado a 10 °C.

Tabela 6. Análise do total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (%) do sêmen suino, conservado durante 5 dias no diluente LPD a 10 °C, adicionado de Trolox em diferentes concentrações.

Tratamentos (μ M)	Dias de conservação	
	D0	D4
0	57,7 \pm 19,9 ^a	24,4 \pm 11,8 ^a
1000	55,3 \pm 20,9 ^a	24,5 \pm 11,2 ^a
2000	55,0 \pm 19,5 ^a	24,2 \pm 11,7 ^a
3000	52,7 \pm 21,1 ^a	21,8 \pm 10,5 ^a

a - letras iguais na mesma coluna indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) – Teste Qui-quadrado

Essa ausência de efeito Trolox pode ter sido devido à presença de caseína, α -lactalbumina, β -lactoglobulina (LUSIGNAN *et al.*, 2011a), lipoproteínas e lecitinas do leite, que segundo FOOTE (1974) e MEMON e OTT (1981), promoveram a proteção da célula espermática contra o choque térmico, quando adicionadas ao sêmen antes do resfriamento e que, possivelmente, mascararam sua ação antioxidante.

Efeitos negativos de altas concentrações de vitamina E

($\geq 6000 \mu\text{g/mL}$) também foram observados por WAHJUNINGSIH e RACHMAWATI (2012), quando adicionaram ao diluente de sêmen caprino criopreservado. Efeitos negativos de antioxidantes fenólicos sobre a integridade da membrana plasmática puderam ser devidos ao estresse pelo frio e às elevadas concentrações, que tornam sua ação antioxidante ineficaz, podendo alterar sua função e causando mais danos aos ácidos graxos insaturados da membrana. Essa situação acelerou ainda mais a

peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides, com perda de alguns ácidos graxos insaturados essenciais que compõem a membrana (NUR *et al.*, 2005).

A vitamina E foi capaz de retardar o curso das reações de peroxidação, por causa da sua capacidade para capturar radicais livres e quebrar a reação de peroxidação. A reação em cadeia de peroxidação lipídica continua pode afetar a integridade da membrana, porque os radicais livres puderam reagir com os componentes estruturais da membrana, tais como as proteínas, de modo que o dano ocorreu, não só na membrana externa, como também no interior da célula (FONSECA *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

A adição de Trolox ao diluente leite em pó desnatado não promoveu efeitos benéficos sobre a qualidade espermática do sêmen conservado. Elevadas concentrações desta substância prejudicaram a qualidade espermática das amostras, não sendo aplicáveis na preparação de doses inseminantes, onde a motilidade e o vigor são essenciais. A ausência de efeitos positivos frente à adição de Trolox sugere uma possível interferência do diluente leite em pó

desnatado (LPD) sobre a ação antioxidante desta substância. Maiores estudos são necessários, a fim de se poder evidenciar a ação antioxidante do Trolox, bem como sua possível interação com o diluente do sêmen.

REFERÊNCIAS

- BARIL, G.; CHEMINEAU, Y.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. 3^a ed., Nouzilly, INRA, 216., 1993. 137p.
- BARTELLIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAUD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 °C under aerobic conditions. *Theriogenology*, v.50, p.229-236, 1998.
- BORBA NETO, A.V.; SOARES, F.A.P.; ARRUDA, L.C.P.; SANTOS JÚNIOR, D.A.; SILVA, E.C.B da; SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; CARVALHO, C.C.D.; GUERRA, M.M.P.; SOARES, P.C. Efeito da Refrigeração e da adição de trolox e glutathione reduzida na lipoperoxidação, estresse oxidativo e viabilidade de espermatozoides ovinos. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 10, 2010, Recife; Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 1, 2010, Recife; Semana Estadual de Ciência e Tecnologia, 1,

- 2010, Recife. Anais..., Recife: UFRPE/SBPC, 2010.
- BRAGA, C.S.R. Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5 °C ou 17 °C. 2007. 172p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Brasil; 2005. 185p.
- CEROLINI, S, MALDJIAN, A, SURAI, P, NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.99-111, 2000.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA Jr T, DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.
- 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.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILL, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Journal of Animal Reproduction*. v.2, p.139-144, 2005.
- FOOTE, R.H. Artificial Insemination. In: HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*, Philadelphia: Ed. Lea and Lebiger, p.409-431, 1974.
- FREITAS, E.N.; NUNES, T.G.P.; RODRIGUES, I.C.S.; MARTINS, L.A.; BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Leite em pó desnatado adicionado de diferentes concentrações de antioxidante sintético análogo da vitamina E. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 38, 2011, Florianópolis. Anais eletrônicos... Acesso em: 22/04/2012. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/189.pdf>>
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effects on fresh and freeze - thawed spermatozoa. *Cryobiology*, v.24, p.446-454, 1987.
- GIULIVI, C.; ROMERO, F.J.; CADENAS, E. The Interaction of Trolox C, a Water-Soluble Vitamin E Analog, with Ferrylmyoglobin: Reduction of the Oxoferryl Moiety. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.299, n.2, p.302-312, 1992.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.

- GUIMARÃES, D.B.; TONIOLLI, R. Proteção morfológica da célula espermática suína em diferentes concentrações de trolox. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 15, 2010. Fortaleza. Anais eletrônico... Acesso em: 22/04/2012. Disponível em: <<http://semanauniversitaria.uece.br/anais/paginas/trabalhos.jsf>>
- HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. *Veterinary Record*, v.71, p.664-665, 1959.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.
- KULAKSIZ, R.; ÇEBİÇ.; AKÇAY, E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turk. Journal of Veterinary and Animal Science*; v.36, n.2, p.177-182, 2012.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biology of Reproduction*, v.85, p.457-464, 2011a.
- MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase. 2006, 147f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.519-526, 1996.
- MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIRÊDO; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para a avaliação do espermatozoide ovino. *Revista Ciência Agrária*, v.46, p.287-297, 2006.
- MEIRELLES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A.P.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A. de; GARBADÉ, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para a preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. *Veterinária Ciência Rural*, v.28, n.3, p.467-470, 1998.
- MEMON, M.A.; OTT, R.S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Review of Animal Production*. v.17, n.1, January - March. 1981.
- MENDEZ, M.F.B. Qualidade do sêmen suíno resfriado adicionado de vitamina E e IGF-1. 2011, 69 f. Dissertação (Mestrado

- em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras: UFLA, Lavras, 2011.
- MORAES, E.A.; TORRES, C.A.A.; GUIMARÃES, J.D.; MURGAS, L.D.S. 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, v.62, p.521-527, 2010.
- NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U.; SOYLU, M.K. Relationships between Sperm Membrane Integrity and other Semen Quality Characteristics of the Semen of Saanen Goat Bucks. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, v.49, p.183-187, 2005.
- PENITENTE FILHO, J.M. Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino, 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa: UFV, Viçosa, 2010.
- RODELLO, L. Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de trolox, catalase e glutathione no processo de congelamento de sêmen ovino. 2010, 131p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010. Acesso em: 22/04/2012. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064022P3/2010/rodello_1_dr_botfmvz.pdf>
- SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; PARRISH, D.R.; SAUCY, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. Journal of the American Oil Chemist's Society, v.51, p.200-203, 1974.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. Journal of Andrology, v.25, p.5-18, 2004.
- SMITAL, J. Effects influencing boar semen. Animal Reproduction Science, v.110, p.335-346, 2009.
- SOARES, F.A.P.; BORBA NETO, A.V.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, E.C.B.; SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; CARVALHO, C.C.D.; GUERRA, M.M.P.; SOARES, P.C. Efeito da adição de antioxidantes (Trolox e Glutathione Reduzida) na lipoperoxidação, estresse oxidativo e viabilidade de espermatozoides ovinos submetidos à congelamento. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e extensão, 10, 2010, Recife; Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 1, 2010, Recife; Semana Estadual de Ciência e Tecnologia, 1, 2010, Recife. Anais..., Recife: UFRPE/SBPC, 2010.
- TIRADO, E.E.; BROWN, D.B. Oxidative Stress: Protective Effects of 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid (Trolox) on Human Sperm

Activation. Fertility and Sterility, Abstracts. v.84, Suppl.1, p.226-227, 2005.

TONIOLLI, R. Pouvoir fécondant des spermatozoides de verrat: amélioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Université François Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsi dt=182303>.

TONIOLLI, L.S.; TONIOLLI, R. Diferentes concentrações de trolox e sua ação sobre parâmetros qualitativos do sêmen suíno. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 15, 2010. Fortaleza. Anais eletrônicos.... Acesso em: 22/04/2012. Disponível em: <<http://semanauniversitaria.uece.br/anais/paginas/trabalhos.jsf>>

TONIOLLI, L.S.; GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B; ARAÚJO, L.R.S.; TONIOLLI, R. Vigor espermático do sêmen suíno avaliado em diferentes concentrações de trolox adicionado ao diluente BTS. In: Congresso da ABRAVES, 15, 2011. Anais..., Fortaleza, ABRAVES, 2011. CD-ROM. WAHJUNINGSIH, S.; RACHMAWATI, A. The Effect of α -tocopherol on Plasma Membrane Integrity of Goat Spermatozoa. Journal of Basic and Applied Scientific Research, v.2, n.9, p.8857-8860, 2012.