



MANUEL FERNANDO BOBADILLA MENDEZ

**QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO
ADICIONADO DE VITAMINA E E IGF-1**

**LAVRAS-MG
2011**

MANUEL FERNANDO BOBADILLA MENDEZ

**QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO RESFRIADO ADICIONADO DE
VITAMINA E E IGF-I**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientador

Dr. Luis David Solis Murgas

**LAVRAS-MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Bobadilla Mendez, Manuel Fernando.

Qualidade do sêmen suíno resfriado adicionado de vitamina E e IGF-1 / Manuel Fernando Bobadilla Mendez. – Lavras : UFLA, 2011.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.

Bibliografia.

1. Varrões. 2. Espermatozoides. 3. Ativadores metabólicos. 4. Proteção antioxidante. 5. Hormônio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408245

MANUEL FERNANDO BOBADILLA MENDEZ

**QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO RESFRIADO ADICIONADO DE
VITAMINA E E IGF-I**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de dezembro de 2011.

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli UFLA

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Orientador

**LAVRAS-MG
2011**

-

*Vocês são a força do meu coração,
O sonho que faz sentido na minha vida,
Vocês são a luz que iluminam a minha caminhada*

Ofereço e dedico

Isabella e Chary

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Chary Rojas, pela paciência, apoio, fortaleza, e determinação.

A minha filha Isabella, presente abençoado que o meu Deus deu para mim.

Ao Meu pai Victor Bobadilla e minha mãe Aliria Mendez, pelo incentivo e apoio incondicional e por vocês acreditarem sempre.

Aos meus sogros Jorge Rojas e Luz Marina Granados, pelo imenso apoio e confiança.

Aos meus irmãos Raul e Zuly, pelo carinho e amizade até hoje.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos, por ter acreditado no meu trabalho, pela oportunidade de me permitir desenvolver este projeto, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas e pela concessão da bolsa junto ao CNPq.

A CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudo e financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Luis David Murgas pela oportunidade de realizar o mestrado na UFLA, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, pela amizade, apoio e sugestões em todas as etapas desse trabalho.

Aos colegas de república, Silas Pinto Greca, Jose Rodolfo Carvalho e Izac Leopoldino Júnior, por me acolher e me fazer sentir em casa.

À Fazenda São Paulo, pela disponibilização dos animais, em especial aos funcionários da central da inseminação: Thiago Augusto Souza Santos, Antonio Marcelo Ferreira, Alessandra Aparecida Lima, Marcelo Monteiro Avelar e Heli Carlos Alves.

Aos integrantes do grupo de reprodução em suínos da UFLA, agradecimento especial para o Luiz Gustavo Pessoa Rocha e Bruno Generoso Faria.

À Vivian de Oliveira Silva pela valiosa colaboração na realização das análises bioquímicas.

Aos amigos Diego, Eduardo e Henrique, pela amizade.

À Teresinha por tomar conta de mim os primeiros seis meses da minha estadia no Brasil.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária, Willian César Cortez, pelo auxílio e amizade.

RESUMO

Um experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a adição de IGF-I em doses inseminantes de suínos armazenadas a 15 °C, processadas em diferentes níveis de adição de vitamina E (DL- α -tocoferol). Foram utilizados 12 ejaculados de quatro varrões. O sêmen foi diluído em (Beltsville Thawing Solution[®]) BTS, formando doses inseminantes de 100 mL com três bilhões de espermatozoides. Durante o processamento, as doses inseminantes foram adicionadas de diferentes concentrações de vitamina E (0, 100, 200, 300 e 400 μ g/mL) e mantidas em geladeira a 15 °C. Após diferentes tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas), as doses foram incubadas a 37 °C recebendo ou não 30 ng/mL de IGF-I humano recombinante. Avaliações seminais foram feitas aos 10 e 120 minutos de incubação. Foi observada interação entre vitamina E e IGF-I na motilidade espermática, total de alterações espermáticas e concentração de dialdeído malônico. A vitamina E influenciou a motilidade espermática somente nas doses inseminantes que receberam adição de IGF-I. Quanto a este hormônio, efeitos positivos foram observados somente depois de 48 e 72 horas de armazenamento do sêmen contendo níveis de adição de vitamina E entre 100 e 300 μ g/mL. A vitamina E também influenciou o vigor até 24 horas de armazenamento e reduziu de forma linear o total de alterações espermáticas neste mesmo tempo de avaliação. Porém, em períodos superiores de armazenamento, houve efeito negativo desta vitamina no total de alterações. O IGF-I aumentou o número total de células anormais quando baixas concentrações de vitamina E foram utilizadas no sêmen armazenado até 24 horas e elevadas concentrações de vitamina E no sêmen armazenado por tempo superior. Tanto a vitamina E quanto o IGF-I reduziram a concentração de dialdeído malônico, porém esta redução não foi suficiente para afetar a viabilidade espermática nos diferentes tempos de armazenamento. Conclui-se que a adição de 235 μ g/mL de vitamina E durante o processamento de doses inseminantes de 100 mL de suínos contendo três bilhões de espermatozoides diluídos em BTS é viável para garantir melhor qualidade do sêmen até 72 horas de armazenamento a 15 °C e que a adição de 30 ng/mL de IGF-I neste nível de vitamina melhora a motilidade após 120 minutos de incubação.

Palavras-chave: α -tocoferol. Antioxidante. Ativador metabólico.
Espermatozoide. Reprodução. Varrão.

ABSTRACT

An experiment was conducted to evaluate the addition of IGF-I in pig insemination doses stored at 15 °C, processed at different levels of addition of vitamin E (DL- α -tocopherol). Twelve ejaculates obtained from four boars were used. Semen was diluted in (Beltsville Thawing Solution[®]) BTS, constituting insemination doses of 100 mL with three billion of spermatozoa. During processing, the insemination doses were added of different concentrations of vitamin E (0, 100, 200, 300 and 400 μ g/mL) and kept in refrigerator at 15 °C. After different storage periods (0, 24, 48 and 72 hours), the doses were incubated at 37 °C receiving or not 30 ng/mL of recombinant human IGF-I. Evaluations of seminal quality were made at 10 and 120 minutes of incubation. Interaction between vitamin E and IGF-I on sperm motility, total sperm damages and concentration of malondialdehyde was observed. The vitamin E influenced the sperm motility only in insemination doses that were added of IGF-I. With regard to this hormone, positive effects were observed only after 48 and 72 hours of storage of semen containing addition levels of vitamin E between 100 and 300 μ g/mL. Vitamin E also influenced the intensity of movements until 24 hours of storage and decreased in linear form the total sperm damages in the same evaluation time. However, in periods of more storage, there was negative effect of this vitamin in the total abnormalities. The IGF-I increased the total number of abnormal cells when low concentrations of vitamin E were used in the semen stored for 24 hours and high concentrations of vitamin E in semen stored for a longer period. Both vitamin E and IGF-I reduced the malondialdehyde concentration, but this reduction was not enough to affect sperm viability in the different storage times. It is concluded that the addition of 235 μ g/mL of vitamin E during the processing of insemination doses of 100 mL of pigs containing three billion spermatozoa diluted in BTS is feasible to ensure better quality of semen within 72 hours of storage at 15 °C and that the addition of 30 ng/ml of IGF-I in this vitamin level improves the sperm motility after 120 minutes of incubation.

Keywords: α -tocopherol. Antioxidant. Metabolic activity. Sperm. Reproduction. Boar.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 Estrutura química dos isômeros com atividade biológica da vitamina E	24
---	----

SEGUNDA PARTE

Figura 1 Motilidade espermática (%) 10 minutos após adição de 30 ng.mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). NS: não significativo. Q: quadrático. CV = 9,69%.....	48
Figura 2 Motilidade espermática (%) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{A,B} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05); * Com e sem IGF diferem pelo teste F. CV = 9,69%.....	49
Figura 3 Motilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg/mL) avaliada 10 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa	51

Figura 4 Motilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg/mL) avaliada 120 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa	52
Figura 5 Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg /mL) avaliada 10 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa	56
Figura 6 Anormalidades espermáticas totais (%) 10 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05). * Efeito linear (P<0,05). CV = 12,42%.....	57
Figura 7 Anormalidades espermáticas totais (%) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05). * Efeito linear (P<0,05). CV = 12,42%.....	58
Figura 8 Concentração de MDA (µM/mL) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes e após o resfriamento (n = 6). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05). * Efeito linear (P<0,05). CV = 34,45%.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Vigor espermático (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento (n=24) e ativado com ou sem adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento (n = 60), avaliado em diferentes períodos de incubação (média ± DP) ¹	53
Tabela2 Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento (n=24) e ativado com ou sem adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento (n = 60), avaliado em diferentes períodos de incubação (média ± DP) ¹	55
Tabela 3 Cosumo de glicose (mg/dL) antes do armazenamento e 72 horas de armazenamento após adição ou não de IGF-1 ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol.....	60

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEORICO	16
2.1 Inseminação artificial na suinocultura	16
2.2 Metabolismo espermático	18
2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS)	20
2.4 Peroxidação lipídica na célula espermática	22
2.5 Vitamina E (α-tocoferol)	24
2.6 Fator de crescimento semelhante à insulina na função reprodutiva dos machos (IGF-I)	27
REFERÊNCIAS	30
SEGUNDA PARTE Growth Hormone and IGF Research Journal	38
ARTIGO 1 Qualidade de sêmen suíno resfriado adicionado de vitamina E e IGF-I	39
ANEXOS	73

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por proteínas de origem animal pela população humana está relacionada ao aumento do poder aquisitivo do consumidor, principalmente em países em desenvolvimento. Este fato tem exigido maior atenção em relação ao desenvolvimento da pecuária.

Neste cenário, a suinocultura é a maior atividade pecuária praticada no mundo. Segundo a Food and Agriculture Organization - FAO (2010), esta representa cerca de 36% do mercado mundial de carnes, de um total de 261 milhões de toneladas e, juntamente com a avicultura, deve continuar sendo um dos principais responsáveis pelo crescimento da produção total de carnes.

Nos últimos anos, a suinocultura vem se tornando cada vez mais industrializada. Aspectos como a tecnologia e a especialização dos funcionários são importantes para o produtor envolvido nesta atividade. Avanços recentes em áreas como a sanidade, genética, nutrição, os sistemas de produção e a reprodução são parte fundamental das mudanças na indústria suinícola para cumprir as demanda de consumidores cada vez mais exigentes.

Com relação à reprodução como base do sistema da produção animal, tem-se enfatizado, nos últimos anos, no melhor aproveitamento do potencial genético da matriz e principalmente dos varrões, que representam 50% do material genético do rebanho. Neste caso, a difusão da técnica de inseminação artificial apresenta como grande vantagem o melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e a garantia de sêmen de melhor qualidade em relação à monta natural.

Atualmente, esta biotecnologia vem sendo utilizada em todos os sistemas de produção tecnificados. No entanto, a sua principal limitação é a dificuldade na preservação do sêmen resfriado, que fica normalmente restrito a três ou cinco dias. Neste sentido, diversos estudos têm sido conduzidos para

assegurar melhores taxas de fertilidade do sêmen armazenado por período superior. Além de novas técnicas de manipulação do sêmen em laboratório e protocolos de inseminação, a adição de substâncias às doses inseminantes tem recebido especial atenção nos últimos anos. Dentre estas substâncias, destacam-se o IGF-I, um hormônio com capacidade de acelerar o metabolismo energético da célula espermática durante o reaquecimento das doses inseminantes e a vitamina E, com seu elevado potencial antioxidante e protetor de membranas. A associação destas substâncias em níveis adequados poderia estar relacionada à melhora da qualidade do sêmen após períodos maiores de armazenamento.

Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de IGF-I após o período de armazenamento do sêmen suíno resfriado a 15 °C adicionado de diferentes níveis de vitamina E durante o processamento das doses inseminantes.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Inseminação artificial na suinocultura

Os primeiros relatos sobre a Inseminação artificial (IA) em suínos no mundo datam do final da década de 40, sendo, atualmente, uma técnica amplamente praticada no mundo, especialmente nos países com uma intensiva exploração de suínos (BORTOLOZZO; WENTZ, 1995). Na Europa Ocidental, por exemplo, mais de 90% das marrãs têm sido submetidas a IA por mais de duas décadas, onde esta técnica provocou um grande impacto sobre o incremento da população suína (GERRITS et al., 2005).

No Brasil, a IA em suínos desenvolveu-se somente a partir de 1975, quando houve um desenvolvimento efetivo com a criação de centrais de inseminação na região sul do país. Em 1990, apenas 2% (cerca de 90 mil fêmeas) do rebanho nacional foram inseminados, porém, como consequência do crescimento tecnológico na suinocultura. Atualmente, mais de 70% das fêmeas é inseminada no Brasil, colocando o país em primeiro lugar na América Latina em número de fêmeas inseminadas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS - ABCS, 2011).

Na indústria suinícola a maioria das inseminações são feitas com sêmen resfriado diluído e usualmente armazenado a 15-20°C por três dias (ROCA et al., 2005). Oitenta e cinco por cento de todas as inseminações no mundo tudo são conduzidas no dia da coleta ou no dia seguinte (JOHNSON et al., 2000), com um protocolo que envolve a diluição seminal e posterior deposição cervical de um grande número de espermatozoides, geralmente com uma concentração maior de $2-3 \times 10^9$ células por dose inseminante (KRUEGER; RATH; JOHNSON, 1999), com um volume de 80-100 mL, duas ou três vezes durante o período de estro (ROCA et al., 2005), por tanto, a preservação líquida é ainda o

método preferido de armazenar sêmen de varrão (WEITZE, 1991), não obstante, o sêmen líquido sofre uma grande perda da sua capacidade fertilizante através do decorrer do tempo (FRYDRYCHOVÁ et al., 2010).

A grande importância da IA reside no fato de permitir que machos geneticamente superiores produzam descendentes com até 200 matrizes por ano, em vez de apenas 20, normalmente servidas via monta natural; redução do custo das instalações, manutenção de um menor número de machos e um aumento na eficiência reprodutiva da granja (FÁVERO; FIGUEIREDO, 2009). Assim, a difusão dos genes melhoradores pode ser aumentada em até 1000%, representando um avanço considerável na melhoria genética dos animais destinados ao abate. Além disso, a IA contribui para um maior controle sanitário e cuidados higiênicos entre os acasalamentos. Também permite um melhor controle da qualidade do sêmen ao rejeitar ejaculados inadequados. Outro aspecto importante é que os parâmetros reprodutivos podem ser iguais ou superiores que aos obtidos com o acasalamento natural (BAILEY et al., 2008).

A chave para a aplicação da IA com sêmen fresco diluído é a habilidade de manter essas células estocadas em diluidores em temperaturas de refrigeração (GERRITS et al., 2005). Portanto, nos últimos anos, linhas de pesquisa com diluidores têm sido desenvolvidas, objetivando o prolongamento do tempo de estoque de sêmen resfriado de três dias para cinco ou sete dias (MURGAS et al., 2002). A maioria dos diluidores, no entanto, permite o armazenamento do sêmen por no máximo 72 horas após a colheita do sêmen.

Porém, o êxito da inseminação artificial não está relacionado somente à capacidade do diluente em conservar os espermatozoides em condições adequadas durante este tempo de estocagem do sêmen, mas também na manutenção da capacidade fecundante do mesmo após sua utilização. Assim, os diluidores de sêmen suíno devem possuir a capacidade de preservar as células espermáticas, garantir para os espermatozoides uma fonte de energia, pH

adequado e uma pressão osmótica ideal, além também de prevenir o choque térmico e inibir o crescimento bacteriano (VYT et al., 2004).

2.2 Metabolismo espermático

A manutenção da motilidade espermática depende do consumo de substratos energéticos obtidos a partir do plasma seminal, sendo importantes vias metabólicas a via glicolítica e a fosforilação oxidativa. Neste sentido, os monossacarídeos representam uma importante fonte energética destas células, podendo ser utilizados tanto a glicose quanto a frutose e a manose, além do lactato e do citrato (RIGAUD et al., 2002; EDDY; TOSHIMORI; OBRIEN, 2003; FORD, 2006), cujas concentrações podem ser indicativo do metabolismo energético dos espermatozoides (MIAH et al., 2008; SELVARAJU et al., 2009; SILVA et al., 2011).

O espermatozoide suíno tem a capacidade de metabolizar eficientemente os açúcares presentes no plasma seminal como a glicose (MARIN et al., 2003) e a frutose (JONES; CONNOR, 2000). Apenas 5,7% dos substratos energéticos entram na via da fosforilação oxidativa, de modo que a principal via para obtenção de energia é a via glicolítica (MARIN et al., 2003).

Miki et al. (2004) demonstraram o papel predominante da glicólise no espermatozoide de ratos geneticamente modificados, com baixa atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, importante enzima da via glicolítica. Os autores observaram acentuada diminuição na produção de ATP (cerca de 90%) comparada com o rato normal, associada a uma motilidade espermática significativamente reduzida.

Por outro lado, Mukai e Okuno (2004) avaliaram a contribuição da atividade mitocondrial na motilidade do espermatozoide desta mesma espécie através da supressão da fosforilação oxidativa da mitocôndria. Os autores

observaram que soluções de lactato e piruvato isentas de glicose resultaram em baixa produção de ATP e conseqüentemente motilidade reduzida, o que não ocorreu com a adição da glicose. Desta forma, sugere-se que a atividade espermática seja dependente da via glicolítica para o fornecimento de ATP. Além disso, é provável que esta via ocorra também na parte distal da cauda, já que as enzimas como hexoquinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e aldolase podem ser detectadas na bainha fibrosa do espermatozoide de várias espécies de mamíferos (MUKAI; OKUNO, 2004).

Além dos monossacarídeos importantes citados anteriormente, os espermatozoides suínos têm a habilidade de utilizar também o lactato (MEDRANO et al., 2006), o piruvato (BROOKS; MANN, 1973), o glicerol (JONES; CHANTRILL; COKINAKIS, 1992) e o citrato (MEDRANO et al., 2006).

O glicerol é oxidado a dióxido de carbono, mesmo na ausência de atividade de glicerol quinase, indicando que o glicerol pode entrar na via glicolítica por uma via diferente que a sequência glicerol-glicerol-3-fosfato-diidroacetona fosfato, sendo convertidos gliceraldeído-3-fosfato por vias alternativas e, desta forma, até lactato pela via glicolítica (JONES; CHANTRILL; COKINAKIS, 1992).

Por outro lado o piruvato pode ser utilizado tanto em situações de ausência como na presença de oxigênio, resultando na formação de lactato, acetato, succinato e acetoacetato anaerobicamente. Sob estas condições a taxa de utilização de piruvato, por parte do espermatozoide, pode ser até maior que a própria utilização de frutose (BROOKS; MANN, 1973).

O lactato e citrato exógeno são também metabolizados pelo espermatozoide suíno, neste caso na via da fosforilação oxidativa por meio da lactato desidrogenase, enzima encontrada principalmente na peça intermediária

da cauda, ou indiretamente convertendo citrato em lactato através da piruvato carboxilase (MEDRANO et al., 2006).

A habilidade do espermatozoide suíno em utilizar diferentes substratos energéticos é um fator determinante na manutenção de sua taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização, principalmente quando armazenado por períodos prolongados. Desta forma, o uso de substâncias que acelerem estas rotas metabólicas durante os períodos que antecedem o uso de doses inseminantes pode ser importante para melhorar a qualidade do sêmen utilizado em programas de inseminação artificial.

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção de energia oxidativa, inevitavelmente, está associada com a geração de espécies reativas de oxigênio, os quais em excessivas concentrações podem levar a patologias celulares (TAYLOR, 2001). Estas moléculas são produtos do metabolismo celular normal, sendo constituído de uma molécula de oxigênio contendo um ou mais elétrons desemparelhados (KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

As ROS envolvidos na biologia reprodutiva incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais peroxila (ROO^\cdot) e os muito reativos radicais hidroxilo (OH^\cdot) (SIKKA, 1996). Estas substâncias são altamente reativas, tendo um tempo de meia-vida média de nanosegundos (OH^\cdot) a milissegundos (O_2^-). Consistem em potentes oxidantes, sendo produzidas fisiologicamente em todas as células durante o metabolismo (HENKEL, 2005).

O ânion superóxido (O_2^-) é um radical livre formado de forma espontânea na membrana da mitocôndria a partir de oxigênio molecular adicionado de um elétron. É um metabolito pouco reativo em relação aos demais

ROS e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo somente no local onde é produzido (NORDBERG; ARNER, 2001).

O radical hidroxila ($\text{OH} \cdot$) é considerado o mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar maiores danos celulares. É formado a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005), como se mostra a continuação:



O peróxido de hidrogênio reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (NORDBERG; ARNER, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o radical $\text{OH} \cdot$. É gerado a partir da dismutação enzimática do O_2 pelo superóxido dismutase, tem meia-vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (NORDBERG; ARNER, 2001).

Estes metabolitos induzem dano celular quando passam um elétron desemparelhado às estruturas celulares, resultando principalmente em oxidação dos lipídios da membrana celular, aminoácidos e ácidos nucleicos (OCHSENDORF, 1999). Os ROS têm sido implicados em aberrações esperáticas causando múltiplas patologias incluindo a infertilidade (BROWERS et al., 2005) em diversas espécies. O estresse oxidativo pode interferir de forma negativa na fluidez da membrana plasmática e na integridade do DNA do espermatozoide, levando à apoptose e diminuição da capacidade fecundante do sêmen (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003).

2.4 Peroxidação lipídica na célula espermática

O estresse oxidativo acontece no espermatozoide quando os níveis de radicais livres dentro e fora da célula excedem a capacidade total antioxidante da mesma. O espermatozoide tem uma quantidade limitada de citoplasma celular, na qual as enzimas antioxidantes são encontradas. Disto resulta a elevada sensibilidade da célula à presença de ROS (SIKKA 2001; HENKEL, 2005).

Considerando também a elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados, a membrana plasmática do espermatozoide é particularmente susceptível ao estresse oxidativo, uma vez que as duplas ligações podem ser facilmente oxidadas pelos ROS. Este processo é conhecido como peroxidação lipídica (HENKEL, 2011).

A peroxidação lipídica induzida pelos ROS é considerada um importante fator que afeta a função espermática. Em geral, os dois tipos mais comuns de peroxidação lipídica são: a não enzimática (promovida pelo íon ferroso e íon cúprico) e a enzimática (dependente de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e ADP) (SIKKA, 2001).

A peroxidação lipídica ocorre em três fases denominadas iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada por um ataque a um lipídio de membrana por qualquer radical livre que tenha reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, criando um radical lipídico e água (HENKEL, 2011). Na fase de propagação, a molécula reativa de um radical peróxilo reage com outro ácido graxo vizinho, produzindo ácido graxo radical, o qual reage com o oxigênio molecular formando outro peróxido de lipídio, processo chamado reação de radicais em cadeia. E como resultado deste processo pelo menos 60% dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana plasmática pode ser oxidado (KOTHARI et al., 2010). A fase de terminação começa quando um radical reage com outro radical, produzindo assim, um não radical (HENKEL, 2011).

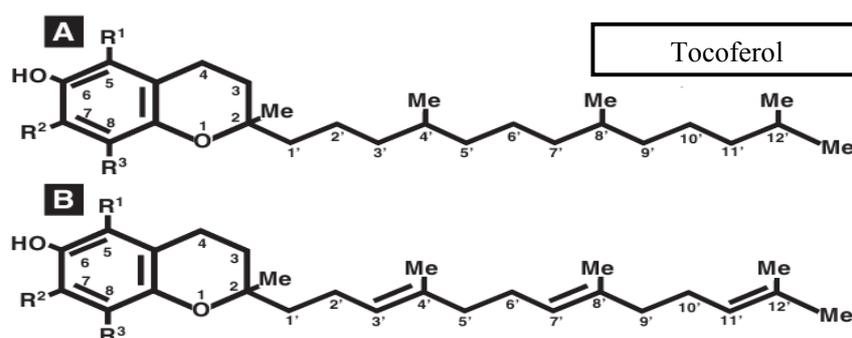
O dialdeído malônico (MDA) é o produto da peroxidação dos lipídios que têm em sua estrutura, ácidos graxos poliinsaturados com três ou mais ligações duplas, separadas por grupos metileno, principalmente, o ácido araquidônico (20:4) e ácido docosaenoico (ESTERBAUER; ZOLLNER; SCHAUR, 1990). No espermatozoide, a produção de MDA é o produto final da peroxidação lipídica induzida pelos íons ferrosos (Fe^{++}) (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALIWELL, 1995). Assim, o dano causado pela peroxidação lipídica pode ser quantificado indiretamente pela mensuração de MDA (AITKEN; CLARKSON; FISHER, 1989; AGARWAL; PRABAKARAN, 2005) através do método do ácido tiobarbitúrico ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (SHARMA; AGARWAL, 1996).

A mensuração da peroxidação lipídica no espermatozoide é importante, uma vez que esta afeta a estrutura da membrana, tais como a fluidez, a gradiente de íons, os receptores de transdução, os processos de transporte e as enzimas de membrana (SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995). Neste caso, ficam comprometidos até mesmo os eventos de fusão de membranas entre o espermatozoide e o ovócito, necessários para o processo de fertilização (STOREY, 1997). Além disso, a peroxidação pode interferir na integridade do DNA, levando a ligações cruzadas da cromatina, mudanças de bases nitrogenadas e quebra da molécula (HUGHES et al., 1998), contribuindo assim para a redução da qualidade espermática (LEWIS; AITKEN, 2005; ERENPREISS et al., 2006).

2.5 Vitamina E (α -tocoferol)

A vitamina E, descoberta em 1922, é o nome dado a um grupo de antioxidantes naturais lipídeo-solúveis presentes na natureza, os tocoferóis e os tocotrienóis, que são encontrados em determinadas plantas oleaginosas (SIKKA, 2004). Atualmente, a vitamina E representa um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados, com atividade biológica de RRR- α -tocoferol, o composto estereoisômero de origem natural com atividade de vitamina E (TRABER; PACKER, 1995). Na natureza, oito substâncias têm sido encontradas com atividade da vitamina E: α , β , γ e δ -tocoferol e α , β , γ e δ -tocotrienol (Figura 1) (SEN; KHANNA; ROY, 2006).

A maior área de interesse relacionada à vitamina E reside essencialmente no seu papel de prevenir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). A vitamina E atua como um agente antioxidante, sacrificando uma molécula com a qual os peroxirradicais preferencialmente reagem, ao invés das membranas biológicas, evitando danos às estruturas



celulares (WOLF; WOLF; RUOCCO, 1998).

Figura 2 Estrutura química dos isômeros com atividade biológica da vitamina E
Fonte: Sen, Khanna e Roy (2006)

Tocotrienol

No que diz respeito ao controle da peroxidação lipídica, o alfa-tocoferol é o maior agente antioxidante que protege contra as ROS nas membranas e lipoproteínas de baixa densidade (THAKUR; SRIVASTAVA, 1996). O tocoferol suprime a peroxidação lipídica prendendo os radicais peroxila envolvidos na cadeia da peroxidação. Nestas reações, um átomo de hidrogênio é abstraído do grupo OH no tocoferol por um radical peroxila (LOO), estabilizando a molécula, e assim, desta maneira interromper a propagação da peroxidação lipídica (WOLF; WOLF; RUOCCO, 1998). Segundo Burton, Joyce e Ingold (1983) apenas uma molécula de alfa-tocoferol é suficiente para proteger cerca de 1000 moléculas de lipídios.

A vitamina E está presente como um componente menor entre os lipídios e lipoproteínas constituintes das membranas celulares, no entanto, está amplamente disseminada entre estas estruturas (WANG; QUINN, 1999). O comprimento da reação em cadeia de radicais livres depende de muitos fatores, sendo o principal deles a concentração de vitamina E na bicamada lipídica (BARCLAY et al., 1984). A concentração de vitamina E nas membranas celulares normalmente é muito baixa, menos de 0.05-0.10 nmol/mg de proteína (menos que 1 por 1000-2000 fosfolipídios de membrana) (SIKKA, 2004). Além disso, este antioxidante de membrana não é sintetizado pelas células dos mamíferos. Assim, uma vez que o tocoferol tenha sido consumido na membrana celular durante períodos de estresse oxidativo, os lipídios celulares estão sujeitos a peroxidação, o qual pode resultar em danos significativos à integridade da célula espermática (ZHANG et al., 2001). Neste sentido, a taxa de geração de ROS nas membranas pode ser elevada, cerca de 1-5 nmol/mg de proteína sob determinadas circunstâncias (SIKKA, 2004), tais como o de estocagem de sêmen fresco processado (CEROLINI et al., 2000) e a criopreservação (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009).

Neste contexto, a vitamina E é o componente primário do sistema antioxidativo da célula espermática, sendo um dos maiores protetores de membrana contra os ROS e a peroxidação lipídica (HU et al., 2011). Porém, não o único inibidor da reação em cadeia da peroxidação lipídica das células animais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além da vitamina E, o espermatozoide conta com um sistema enzimático de defesa, o qual inclui superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, glutathione transferase, ceruplasmina ou hemoxigenase que controlam os radicais de oxigênio e seus subprodutos (TREMELLEN, 2008; HENKEL, 2011), porém são encontradas em concentrações diminuídas no citoplasma espermático. Portanto, apresentam uma função antioxidante limitada (KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

Segundo Peña et al. (2003) e Ghiuru et al. (2010), a adição de vitamina E ao diluente de congelamento ou resfriamento tem um efeito benéfico sobre a motilidade espermática após o congelamento-descongelamento do sêmen de varrão, ao proteger o potencial de membrana mitocondrial. De acordo com Breininger (2005) e Satorre (2007), a adição deste composto no diluidor de resfriamento, durante o processo de congelamento, melhora as funções da célula espermática em suínos devido ao aumento de espermatozoides viáveis com acrossomas intatos. No entanto, a vitamina E pode desencadear a peroxidação lipídica através dos ROS quando esteja presente em baixas concentrações (WALDECK; STOCKER, 1996).

2.6 Fator de crescimento semelhante à insulina na função reprodutiva dos machos (IGF-I)

Os fatores de crescimento têm um importante papel no processo de espermatogênese, motilidade espermática e fertilidade (SELVARAJU et al., 2010). Sabe-se que os fatores de crescimento desempenham um importante papel no controle parácrino e autócrino da função testicular (SPITERI-GRECH; NIESCHLAG, 1992; LIN, 1995), sendo capazes de estimular a síntese de DNA em vários tipos de células, incluindo células de Sertoli nos homens e células da granulosa em mulheres (COLOMBO; NAZ, 1999).

O IGF-I é uma proteína mitogênica de cadeia simples, encontrada na maioria das células altamente proliferativas. No testículo, o IGF-I é secretado pelas células de Sertoli e células de Leydig sob controle do FSH e LH, respectivamente (LEJEUNE et al., 1996). Receptores podem ser encontrados em espermatogônias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides (HENRICKS et al., 1998; HOEFLICH et al., 1999). Neste sentido, é sugerido que o IGF-I possa ser um importante fator envolvido não só no desenvolvimento, mas também na maturação e na ativação da motilidade dos espermatozoides (HENRICKS et al., 1998; VICKERS et al., 1999). Além disso, tem sido verificada uma associação entre a produção de IGF-I pelas células do oviduto e a capacidade fecundante dos espermatozoides (SMITH, 1997; SUAREZ, 1998). Desta forma, acredita-se que as concentrações deste hormônio possam estar relacionadas com as taxas de fertilização do rebanho.

Uma associação na concentração no plasma seminal de IGF-I, com a motilidade e morfologia espermática foi relatada em equinos (CHAMPION et al., 2002; MACPHERSON et al., 2002) e bovinos (BRITO et al., 2007; HENRICKS et al., 1998; HOEFLICH et al., 1999). Além disso, foram relatados eventos envolvendo a maturação e a capacitação dos espermatozoides no trato

reprodutivo feminino, mais especificamente no oviduto (SMITH, 1997; SUAREZ, 1998).

Segundo Macpherson et al. (2002), as concentrações seminais de IGF-I também podem estar relacionadas à capacidade fecundante dos espermatozoides, já que estariam envolvidas com a continuidade da motilidade após a ejaculação. Esta hipótese surgiu a partir dos estudos conduzidos por Henricks et al. (1998) com bovinos. Neste trabalho, os autores verificaram que a adição *in vitro* de IGF-I em concentrações fisiológicas estimulou a motilidade espermática em amostras de sêmen e sugeriram que este hormônio poderia manter esta taxa devido à facilitação do uso da energia (aceleração do metabolismo) ou ao seu efeito antioxidante, atuando como protetor de membrana.

Selvaraju et al. (2009) estudaram o efeito do IGF-I na motilidade, integridade da membrana e do acrossoma, integridade funcional, peroxidação lipídica e utilização de frutose por espermatozoides de búfalos e sugeriram melhora nos parâmetros da motilidade associada à redução da peroxidação lipídica, resultando em melhor integridade da célula espermática no decorrer do tempo. Além disso, houve aumento no consumo de frutose, sugerindo que o IGF-I mantém a motilidade espermática por maior tempo pelo aumento no consumo do carboidrato.

Em espermatozoides de coelhos, foi isolada e purificada a presença de IGF-I no plasma seminal com seus respectivos receptores localizados, principalmente no segmento equatorial da cabeça espermática. Além disso, a adição do IGF-I no espermatozoide desta espécie foi capaz de exercer efeitos benéficos na motilidade e viabilidade espermática (MINELLI et al., 2001). Por outro lado, o IGF-I adicionado no espermatozoide capacitado agiu como indutor da reação acrossomal (MINELLI; MORONI; CASTELLINI, 2001).

Com relação ao suíno, Hirai et al. (2001) demonstraram por meio de radioimunoensaio as concentrações fisiológicas do IGF-I no plasma seminal, que

foi de $14,8 \pm 4,1$ ng/mL. Posteriormente, Miah et al. (2008) adicionando 20 ng/mL de IGF-I no sêmen observaram aumento da motilidade progressiva e das taxas de indução da capacitação e reação acrossomal após quatro horas de incubação. Além disso, o metabolismo energético do espermatozoide foi incrementado pelo maior consumo de glicose. Neste sentido, o IGF-I pode ter atuado como quimiocinético envolvido na regulação do movimento deste tipo de células.

Recentemente, Silva et al. (2011) verificaram que o IGF-I mostrou resultados benéficos no sêmen suíno quando adicionado em doses inseminantes durante o período de reativação após o armazenamento. Os autores observaram aumento da relação vivos:mortos e maior resistência osmótica, porém maior taxa de peroxidação lipídica, sugerindo maior formação de radicais livres em função do aumento do consumo de substratos energéticos pelos espermatozoides. Desta forma, a associação deste hormônio com substâncias antioxidantes como a vitamina E, por exemplo, poderia ser benéfica para a qualidade do sêmen suíno armazenado.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS. Disponível em: <www.abcs.org.br>. Acesso em: 25 mar. 2011.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, New York, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 43, n. 11, p. 963-974, 2005.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function, **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 41, n. 1, p. 183-197, 1989.
- AWDA, B. J.; MACKENZIE-BELL.; BUHR, M. M. Reative oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 553-561, 2009.
- BAILEY, J. L. et al. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1251-1258, 2008.
- BARCLAY, L. R. C. et al. Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble chainbreaking antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 106, n. 8, p. 2479-2481, 1984.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Fatores que interferem nos resultados de inseminação artificial em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: (s. n.), 1995. p. 131-141.
- BREININGER, E. et al. Alpha- tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, May 2005.

BRITO, L. F. C. et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal periodo n serum metabolics hormones, gonadotropin and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, Oxford, v. 33, n.1. p. 1-18, 2007.

BROOKS, D. E.; MANN, T. Pyruvate metabolism in boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 34, n.1, p. 105-119, 1973.

BURTON, G. W.; JOYCE, A.; INGOLD, K. V. Is vitamin E the only lipid soluble, chain breacking in human blood plasma and erythrocyte membranes. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 221, n.1, p. 2818-290, 1983.

CEROLINI, S. et al. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 99-111, 2000.

CHAMPION, Z. J. et al. Growth hormone or inulin-like growth factor-1 extends longevity of equine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 8, p. 1793-1800, 2002.

COLOMBO, J. B.; NAZ, R. K. Modulation of insulinLike Growth Factor-1 in The Seminal Plasma of Infertile Men. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 20, n. 1, p. 118-125, Jan./Feb. 1999.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, V.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.369, n.3, p. 131-135,1995.

EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, New Jersey, v.61, n.1, p. 103-115, 2003.

ERENPREISS, J. et al. A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 8, n. 1, p.11-29, 2006.

ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; SCHAUR, R. J. Aldehydes formed by lipid peroxidation; mechanisms of formation, occurrence and determination. In:

VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane lipid oxidation**. Boca Raton: CRC, 1990. v. 1, p. 239-283.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. FAOSTAT Statistical database 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/ak349s/ak349s00.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2011.

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

FORD, W. C. L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 269-274, May/Jun. 2006.

FRYDRYCHOVÁ, S. et al. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 55, n. 4, p. 160–166, 2010.

GERRITS, R. J. et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 283-299, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford: University, 1999. 936 p.

HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, New Delhi, v. 13, p. 43-52, 2011.

HENKEL, R. R. The impact of oxidants on sperm function. **Andrologia**, Singapore, v. 37, n. 6, p. 205-206, 2005.

HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 330–337, 1998.

HIRAI, M. et al. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus scrofa*): Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 22, n. 1, p. 104-110, Jan./Feb. 2001.

HU, J. H. et al. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. **Animal**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 107-112, 2011.

HUGHES, C. M. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1240–1247, 1998.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p.143-172, 2000.

JONES, A. R.; CHANTRILL, L. A.; COKINAKIS, A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, n. 3, p. 129-134, 1992.

JONES, A. R.; CONNOR, D. E. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v. 12, n. 7, p. 355-359, 2000.

KEFER, C. J.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, Singapore, v. 16, n. 6, p. 449–457, 2009.

KOTHARI, S. et al. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48, n. 5, p. 425-435, 2010.

KRUEGER, C.; RATHL, D.; JOHNSON L. A. Low dose insemination in synchronized gilts. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 8, p. 1363-1373, 1999.

KUMARESAN, A. et al. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 162–171, 2009.

LEJEUNE, H. et al. Paracrine regulation of Leydig cells. **Annales d'Endocrinologie**, Paris, v. 57, n. 1, p. 55–63, 1996.

LEWIS, S. E.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 322, n. 1, p. 33-41, 2005.

LIN, T. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 16, n. 3, p. 193–196, May/June 1995.

MACPHERSON, M. L. et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and-5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 648-654, Aug. 2002.

MARIN, S. et al.. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**, Oxford, v. 554, n. 3, p. 342-346, 2003.

MEDRANO, A. et al. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and atp-regulated pathway in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 3, p. 369–378, 2006.

MIAH, A. G. et al. Effects of relaxin and IGF-I on capacitation, acrosome reaction, cholesterol efflux and utilization of labeled and unlabeled glucose in porcine spermatozoa. **Reproductive Medicine and Biology**, Singapore, v. 7, n. 1, p. 29-36, 2008.

MIKI, K. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase- S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**. Washington, v. 101, n. 47, p. 16501-16506, 2004.

MINELLI, A. et al. Effects of the Purified IGF-I Complex on the Capacitation and Acrosome Reaction of Rabbit Spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology: Part A: Ecological Genetics and Physiology**, Hoboken, v. 290, n. 3, p. 311–317, 2001.

MINELLI, A.; MORONI, M.; CASTELLINI, C. Isolation and purification of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm motility and viability. **Journal of Experimental Zoology: Part A: Ecological Genetics and Physiology**, Hoboken, v. 290, n. 3, p. 279–290, 2001.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 540-547, 2004.

MURGAS, L. D. S. et al. Crioconservación espermática en la especie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospérmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., Porto Alegre, 2001. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001.

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

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 5 p. 399-420, 1999.

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

RIGAUD, T. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 123, p. 579-591, 2002.

ROCA, J. et al. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animal**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 43-53, 2006.

SELVARAJU, S. et al. Improvement in buffalo (*bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and fertility in vitro: Effects of insulin-like growth factor-I. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 1, p. 1-10, 2010.

SELVARAJU, S. et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1/4, p. 60-70, 2009.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 1, n. 1, p. 78-86, 1996.

SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 16, n. 6, p. 464-481, 1995.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, Sharjah, v. 8, n. 7, p. 851-62, 2001.

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

SILVA, D. M. et al. Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its effects on sperm quality. **Growth Hormone and IGF Research**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 325-330, 2011.

SMITH, T. T. Modulation of sperm functions by oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.56, n. 5, p. 1102-1104, 1998.

PITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. **Hormone Research**, Basel, v. 38, n. 1, p. 22-27, 1992.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 203-213, Mar. 1997.

SUAREZ, S. S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 5, p. 1105-1107, 1998.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 189-198, 2001.

THAKUR, M. I.; SRIVASTAVA, U. S. Vitamin e metabolism and its application. **Nutrition Research**, New York, v. 16, n. 10, p. 1767-1809, 1996.
TRABER, M.G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1501-1509, 1995.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 243-258, 2008.

VICKERS, M. H. et al. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. **Growth Hormone and IGF Research**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 236-240, 1999.

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

WALDECK, A. R.; STOCKER, R. Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 9, n. 6, p. 954-964, 1996.

WEITZE, K. F. Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 231-253, 1991.

WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 103-117, 1998.

ZHANG, G. F. et al. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. **Chemico-Biological Interactions**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 267-284, 2001.

SEGUNDA PARTE Growth Hormone and IGF Research Journal

ARTIGO 1 Qualidade de sêmen suíno resfriado adicionado de vitamina E e IGF-I

RESUMO

Um experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a adição de IGF-I em doses inseminantes de suínos armazenadas a 15 °C, processadas em diferentes níveis de adição de vitamina E (DL- α -tocoferol). Foram utilizados 12 ejaculados de quatro varrões. O sêmen foi diluído em (Beltsville Thawing Solution[®]) BTS, formando doses inseminantes de 100 mL com três bilhões de espermatozoides. Durante o processamento, as doses inseminantes foram adicionadas de diferentes concentrações de vitamina E (0, 100, 200, 300 e 400 μ g/mL) e mantidas em geladeira a 15 °C. Após diferentes tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas), as doses foram incubadas a 37 °C recebendo ou não 30 ng/mL de IGF-I humano recombinante. Avaliações seminais foram feitas aos 10 e 120 minutos de incubação. Foi observada interação entre vitamina E e IGF-I na motilidade espermática, total de alterações espermáticas e concentração de malondialdeído. A vitamina E influenciou a motilidade espermática somente nas doses inseminantes que receberam adição de IGF-I. Quanto a este hormônio, efeitos positivos foram observados somente depois de 48 e 72 horas de armazenamento do sêmen contendo níveis de adição de vitamina E entre 100 e 300 μ g/mL. A vitamina E também influenciou o vigor até 24 horas de armazenamento e reduziu de forma linear o total de alterações espermáticas neste mesmo tempo de avaliação. Porém, em períodos superiores de armazenamento, houve efeito negativo desta vitamina no total de alterações. O IGF-I aumentou o número total de células anormais quando baixas concentrações de vitamina E foram utilizadas no sêmen armazenado até 24 horas e elevadas concentrações de vitamina E no sêmen armazenado por tempo superior. Tanto a vitamina E quanto o IGF-I reduziram a concentração de dialdeído malônico, porém esta redução não foi suficiente para afetar a viabilidade espermática nos diferentes tempos de armazenamento. Conclui-se que a adição de 235 μ g/mL de vitamina E durante o processamento de doses inseminantes de 100 mL de suínos contendo três bilhões de espermatozoides diluídos em BTS é viável para garantir melhor qualidade do sêmen até 72 horas de armazenamento a 15 °C e que a adição de 30 ng/mL de IGF-I neste nível de vitamina melhora a motilidade após 120 minutos de incubação.

Palavras-chave: α -tocoferol. Antioxidante. Ativador metabólico. Espermatozoide. Reprodução. Varrão.

1 INTRODUÇÃO

A possibilidade de usar o sêmen resfriado por tempo superior a 48 horas e manter a sua qualidade é fundamental para o sistema produtivo. Neste aspecto, pesquisas vêm sendo conduzidas na tentativa de amenizar o efeito negativo da temperatura durante o resfriamento e a utilização do sêmen suíno.

A atividade oxidativa é um fator associado com um declínio da fertilidade durante o tempo em que o sêmen permanece armazenamento (4). As ROS (espécies reativas de oxigênio) geradas durante este tempo induzem a peroxidação lipídica, causando queda irreversível na motilidade espermática e alterações de proteínas e ácidos nucleicos destas células, além de estimular a apoptose e a morte celular (23,13).

O espermatozoide do varrão é especialmente suscetível à peroxidação lipídica devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular e a menor capacidade antioxidante em relação ao espermatozoide bovino (9). Desta forma, seu uso na inseminação artificial se restringe ao armazenamento de temperaturas de 5 a 15 °C. Durante este tempo em que o sêmen permanece armazenado, antioxidantes como o alfa-tocoferol são capazes de suprimir a peroxidação lipídica das membranas por capturar os radicais peroxilo envolvidos na cadeia da peroxidação (37). Assim, a adição de vitamina E aos diluentes pode estar relacionada ao aumento da resistência do espermatozoide à peroxidação lipídica (9, 31, 7), podendo ser então uma alternativa para aumentar a capacidade fecundante do sêmen suíno resfriado.

Com relação ao metabolismo espermático, sabe-se que este é responsável pelo potencial fertilizante do sêmen. Diversas substâncias químicas têm sido associadas ao controle metabólico da célula espermática, dentre eles o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) (16, 33). Segundo os autores, este hormônio atua como um ativador metabólico do espermatozoide,

estando envolvido no movimento das células (intensidade de movimento e motilidade progressiva) através do aumento no consumo de carboidratos e, conseqüentemente, da capacidade fecundante do espermatozoide. No entanto, o metabolismo celular energético está relacionado à geração de maior quantidade de radicais livres (20), o que também poderia comprometer a qualidade do espermatozoide, principalmente durante seu período de capacitação.

Alguns autores têm identificado o IGF-I no plasma seminal e seus receptores nas células espermáticas (28, 19). Também tem sido verificado que a adição deste hormônio no sêmen melhorou a qualidade espermática logo após sua adição (25, 32, 33). Desta forma, uma alternativa para melhorar a qualidade do sêmen suíno resfriado seria a utilização de um ativador metabólico, tal como o IGF-I associado a um antioxidante como a vitamina E. Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da associação da vitamina E, adicionada antes do resfriamento, com o IGF-I, adicionado após o armazenamento, sobre a qualidade do sêmen suíno resfriado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta do sêmen

Doze ejaculados provenientes de quatro animais (três ejaculados de cada) foram utilizados no mês de julho de 2011. Os varrões eram de fertilidades comprovadas e pertencentes à Fazenda São Paulo, uma granja comercial de aproximadamente 4500 matrizes, localizada no município de Oliveira, MG, Brasil.

Os ejaculados foram obtidos pelo método da mão enluvada durante a rotina da granja, sempre pela manhã. Apenas a fração rica do ejaculado foi utilizada, sendo utilizados aqueles que preencheram os requerimentos mínimos para serem utilizados em inseminação artificial: \square 70% de motilidade, \square 20% de gotas citoplasmáticas e um total de espermatozoides \square 10×10^9 por mL.

Após avaliações iniciais, o sêmen foi diluído 1:1 com o diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*[®]) e transportado até o Laboratório de Reprodução de Suínos do Setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras. No laboratório, a concentração espermática foi determinada com espectrofotômetro (*Spermacue*), calculando-se o volume do sêmen a conter três bilhões de espermatozoides. Neste volume, foi adicionado novamente o diluente BTS, de modo a formar doses inseminantes de 100 mL com $3,0 \times 10^9$ espermatozoides. As doses foram mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz por 90 minutos. De cada ejaculado, foram processadas dez doses inseminantes.

2.2 Procedimento experimental

Após o processamento, diferentes quantidades de vitamina E (DL- α -tocoferol acetato, Sigma-Aldrich) foram adicionadas às doses inseminantes, obtendo concentrações finais de 0, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$ de sêmen. Em seguida, as doses foram armazenadas em geladeira a 15 °C. Antes do armazenamento, duas aliquotas de 10 mL de cada nível de adição de vitamina E foram mantidas em tubos de ensaio em banho-maria a 37°C, as quais foram adicionadas ou não de 30ng/mL de IGF-I humano recombinante (*BioVision USA - Recombinant Human IGF-I 100 mg*). O mesmo procedimento foi realizado às 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

Após a adição de IGF-I, as amostras de sêmen permaneceram incubadas em banho-maria a 37 °C, quando foram feitas avaliações de motilidade e vigor espermáticos, viabilidade e número total de anormalidades espermáticas aos 10 e 120 minutos de incubação. A concentração de MDA (dialdeído malônico) foi realizada somente ao final do período de incubação.

2.3 Avaliações microscópicas

Para avaliar a motilidade, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C. As avaliações foram feitas em microscópio de contraste de fase com aumento de 400x. Um total de dez campos foi avaliado para determinar, de forma subjetiva, a percentagem de espermatozoides móveis. As análises foram feitas em triplicata, de forma cega, por três avaliadores. A intensidade de movimento foi avaliada por sistema de escalas de 0 a 5, sendo 0 intensidade fraca e 5 a intensidade máxima.

A viabilidade espermática (%) foi representada pela porcentagem de células vivas em relação ao número total de células contadas. Para isso, uma

gota do sêmen foi misturada a uma gota de corante eosina-negrosina, seguindo a metodologia de Blom (6). Após esfregaço em lâmina de microscopia, o número de células vivas (sem cor) e células mortas (rosa) foram avaliados em microscópio óptico em aumento de 400x.

O número total de alterações espermáticas (%) foi avaliado após armazenamento de algumas gotas de sêmen em solução formol-citrato a 3% em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Para alterações de acrossoma, foi utilizado um aumento de 1000x. Foram avaliadas as alterações de acrossoma, de cauda, de cabeça e de peça intermediária e a presença de gota citoplasmática proximal.

2.4 Avaliações bioquímicas

Para avaliar a concentração de MDA (grau de peroxidação lipídica) o Kit QuantiChrom™ TBARS ASSAY (DTBA- 100- bioassay Systems) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante. A determinação de glicose foi avaliada por metodologia enzimático-colorimétrica, usando o método de ponto final, seguindo as recomendações do fabricante (ANALISA GLICOSE-PP®).

2.5 Análise estatística

Foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso (ejaculado) em esquema fatorial 2x4x4 (com ou sem adição de 30 ng/mL de IGF-I em quatro níveis de adição de vitamina E, avaliados em quatro tempos de armazenamento) em parcela subdividida no tempo (tempo de incubação) com 12 repetições, representadas por um ejaculado. A parcela experimental foi representada por três avaliações, com exceção das análises bioquímicas, que foram representadas por uma avaliação.

Após o teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk), a análise de variância foi conduzida e os dados obtidos com IGF-I submetidos ao teste F e os de vitamina E à análise de regressão. Todos os desdobramentos dentro de cada tempo de armazenamento e de incubação foram considerados quando significativos ($P < 0,10$). Os dados de morfologia espermática e consumo de glicose foram transformados pela raiz quadrada. O vigor foi avaliado pela análise não paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Alfa foi igual a 0,05. Toda análise estatística foi realizada no programa estatístico SAS (31).

3 RESULTADOS

3.1 Análises microscópicas

Analisando a motilidade espermática, foi observada interação ($P < 0,05$) entre vitamina E e IGF-I nos diferentes tempos de armazenamento e incubação. Antes do resfriamento, a adição de IGF-I ao sêmen contendo diferentes níveis de vitamina E não influenciou a motilidade espermática ($P > 0,05$) após 10 minutos (Figura 1), porém reduziu estes valores ($P < 0,05$) após 120 minutos em doses inseminantes contendo 0 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina E (Figura 2A). Não houve diferença neste mesmo tempo quando doses maiores de vitamina E foram utilizadas ($P > 0,05$). Nestas mesmas amostras, observou-se que a dose de 300 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina E foi a que resultou em maior motilidade.

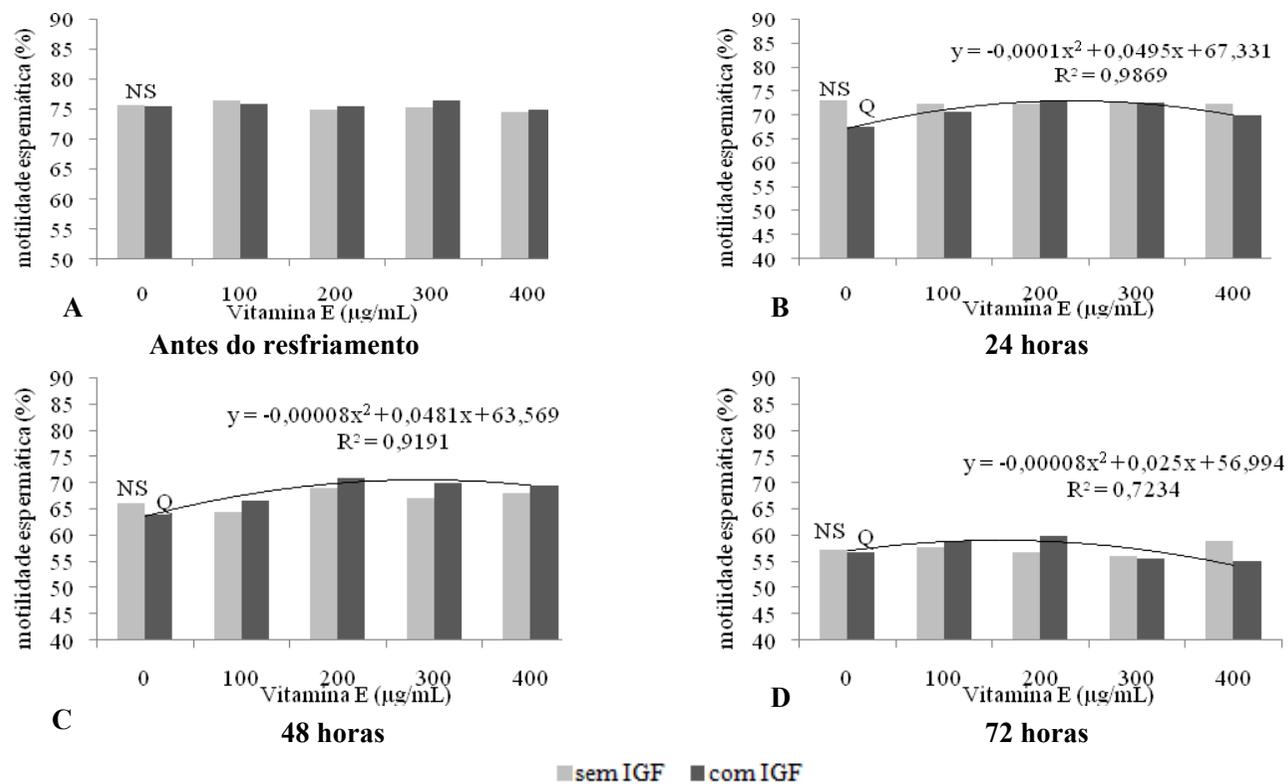


Figura 1 Motilidade espermática (%) 10 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). NS: não significativo. Q: quadrático. CV = 9,69%

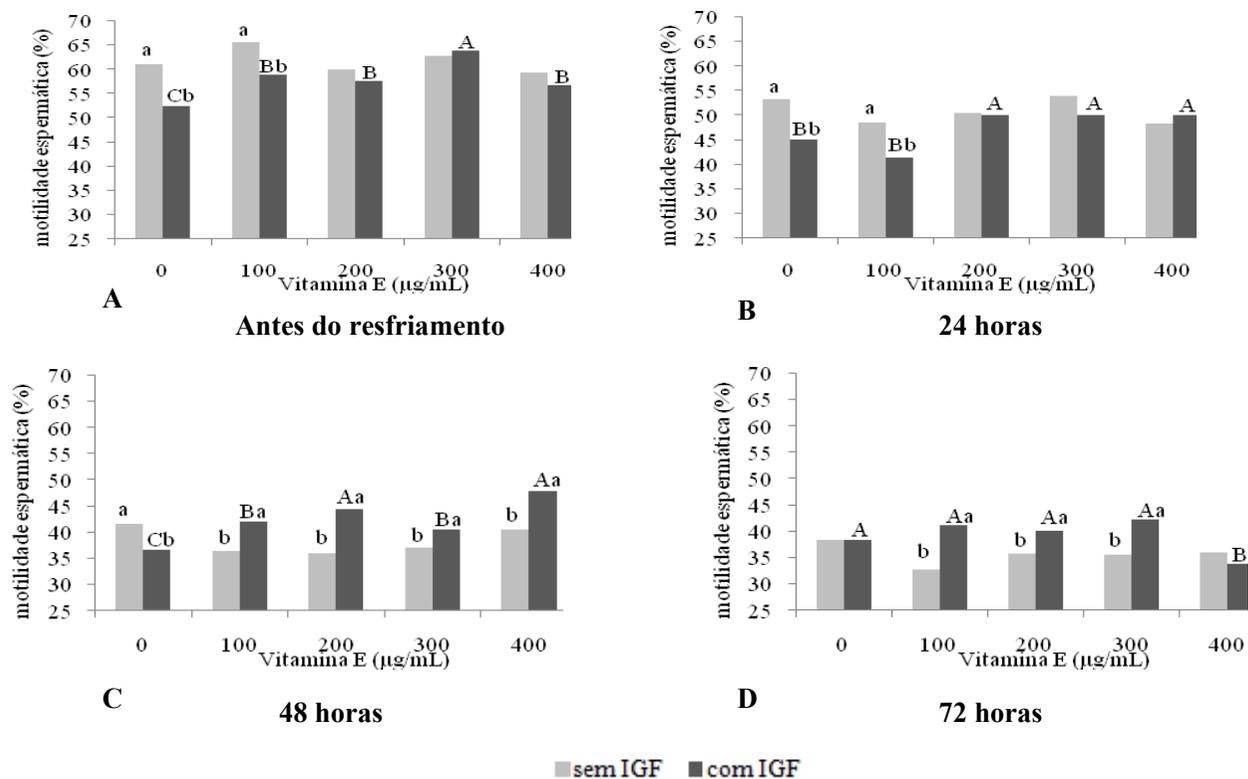


Figura 2 Motilidade espermática (%) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{A,B} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05); * Com e sem IGF diferem pelo teste F. CV = 9,69%

A motilidade não foi influenciada ($P>0,05$) pelo IGF-I 10 minutos após sua adição em doses contendo os diferentes níveis de vitamina E, e que foram armazenadas nos diferentes tempos (24, 48 e 72 horas - Figura 1), porém, após 120 minutos de incubação do sêmen resfriado por 24 horas, este hormônio atuou de forma negativa ($P<0,05$), semelhante ao sêmen pré-resfriado, ou seja, houve redução da motilidade ($P<0,05$) exceto quando níveis maiores que 100 $\mu\text{g/mL}$ de adição de vitamina E foram utilizados (Figura 2B). Por outro lado, em doses inseminantes armazenadas por 48 e 72 horas, a adição de IGF-I aumentou a motilidade ($P<0,05$) somente quando a vitamina E foi utilizada até a dose de 300 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2C e 2D).

Não se observou diferença ($P>0,05$) entre os níveis de adição de vitamina E em doses que não receberam IGF-I durante o reaquecimento. No entanto, efeito quadrático desta vitamina ($P<0,05$) foi observado 10 minutos após a adição do hormônio somente no sêmen que foi resfriado (Figura 1B, 1C e 1D). O nível médio de vitamina E que resultou em maior motilidade 10 minutos após a adição de IGF-I foi de 235 $\mu\text{g/mL}$. Após 120 minutos de incubação, observou-se que a adição de 200 $\mu\text{g/mL}$ foi satisfatória para assegurar maior motilidade espermática e que o uso de 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$ prejudicaram a qualidade do sêmen após 48 e 72 horas de armazenamento, respectivamente (Figura 2B, 2C e 2D).

Considerando o período de armazenamento, observou-se que o uso de vitamina E associada ou não ao uso de IGF-I não prolongou, durante este tempo, a qualidade do sêmen a qual reduziu progressivamente independente do uso destas substâncias (Figuras 3 e 4).

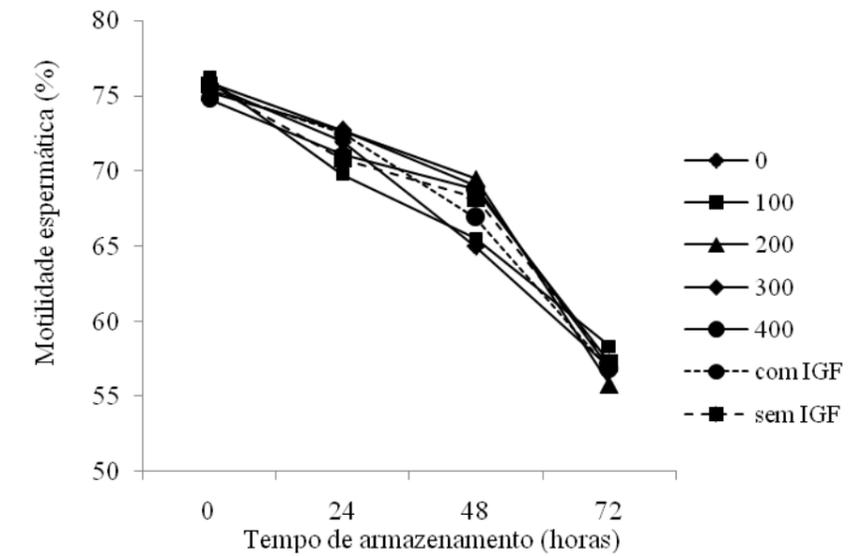


Figura 3 Motilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg/mL) avaliada 10 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa

Com relação ao vigor espermático, não houve interação ($P > 0,05$) entre vitamina E adicionada durante o processamento e IGF-I após o armazenamento (Tabela 1). Também não se observou efeito ($P > 0,05$) da adição de IGF-I sobre o vigor espermático. Com relação à vitamina E, maiores valores ($P < 0,05$) foram obtidos com doses de adição superiores a 100 µg/mL após 120 minutos de incubação de doses inseminantes antes e após o armazenamento por 24 horas, independente da presença de IGF-I. Em tempos superiores de refrigeração, não houve efeito ($P > 0,05$) da vitamina E sobre esta variável.

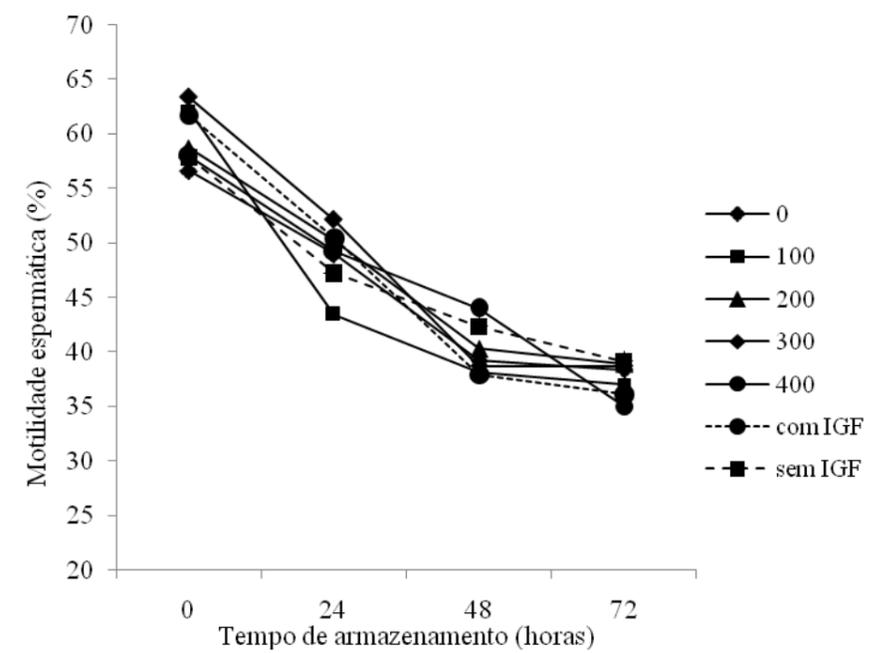


Figura 4 Motilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg/mL) avaliada 120 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa

Tabela 1 Vigor espermático (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento (n=24) e ativado com ou sem adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento (n = 60), avaliado em diferentes períodos de incubação (média ± DP)¹

Incubação (minutos)	Vitamina E (µg/mL)					IGF-I (ng/mL)	
	0	100	200	300	400	0	30
antes do resfriamento							
10	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5
120	2,6 ± 1,0 b	2,9 ± 0,4 a	2,8 ± 0,9 a	2,9 ± 0,7 a	2,8 ± 0,7 a	2,8 ± 0,9	2,9 ± 0,7
24 horas							
10	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3
120	2,5 ± 0,5 b	2,6 ± 0,5 ab	2,7 ± 0,6 a	2,7 ± 0,6 a	2,8 ± 0,4 a	2,7 ± 0,5	2,6 ± 0,5
48 horas							
10	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,5
120	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,6	2,5 ± 0,5	2,3 ± 0,7	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,5	2,4 ± 0,7
72 horas							
10	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,4
120	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,6	2,1 ± 0,5	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,6

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05)

Quanto à viabilidade, nenhum efeito ($P>0,05$) da vitamina E e IGF-I foi observado (Tabela 2). Houve decréscimo da viabilidade a partir do resfriamento das doses inseminantes (24 horas), porém houve estabilidade neste período de armazenamento até 72 horas (Figura 5).

Houve interação ($P<0,05$) entre vitamina E e IGF-I no total de células espermáticas anormais (Figuras 6 e 7). A adição de IGF-I aumentou sua porcentagem ($P<0,05$) no sêmen armazenado até 24 horas, exceto quando a vitamina E foi utilizada nas doses de 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$. No sêmen armazenado por períodos superiores, a adição de IGF-I associada a estes mesmos níveis de vitamina E aumentou ($P<0,05$) o número de células anormais, o que não foi observado com níveis inferiores da vitamina. Os níveis de vitamina E reduziram de forma linear ($P<0,05$) a porcentagem de células anormais em doses armazenadas até 24 horas, porém aumentaram também de forma linear ($P<0,05$) em amostras armazenadas acima deste período. Apenas não houve influência ($P>0,05$) da vitamina E sobre o número total de células amorfas em amostras de sêmen armazenadas por 24 horas.

Tabela 2 Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento (n=24) e ativado com ou sem adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento (n = 60), avaliado em diferentes períodos de incubação (média ± DP)¹

Incubação (minutos)	Vitamina E (µg/mL)					IGF-I (ng/mL)	
	0	100	200	300	400	0	30
antes do resfriamento							
10	87,7 ± 4,2	88,0 ± 3,9	87,9 ± 6,4	90,4 ± 3,3	88,8 ± 5,1	88,2 ± 4,7	88,8 ± 4,8
120	80,6 ± 8,5	81,9 ± 6,9	82,3 ± 7,2	81,6 ± 9,0	82,9 ± 8,2	82,3 ± 8,0	81,4 ± 7,9
24 horas							
10	81,1 ± 8,6	81,7 ± 7,2	80,1 ± 8,7	82,5 ± 8,5	83,0 ± 8,5	81,6 ± 8,2	81,8 ± 8,4
120	80,2 ± 7,8	75,0 ± 7,9	74,7 ± 8,2	78,8 ± 9,2	77,9 ± 8,9	77,6 ± 8,5	76,9 ± 8,7
48 horas							
10	77,0 ± 9,3	81,1 ± 8,1	80,9 ± 9,3	80,8 ± 8,9	79,7 ± 9,2	79,1 ± 9,1	80,6 ± 8,8
120	76,4 ± 9,9	77,7 ± 8,9	81,2 ± 8,3	76,7 ± 8,7	76,2 ± 9,7	77,6 ± 9,5	77,5 ± 8,8
72 horas							
10	81,4 ± 7,2	82,9 ± 6,6	84,2 ± 5,6	82,9 ± 6,8	81,7 ± 7,6	82,8 ± 7,0	82,4 ± 6,5
120	74,1 ± 9,5	78,4 ± 6,7	79,8 ± 9,3	79,3 ± 7,9	79,1 ± 8,3	79,1 ± 8,9	77,1 ± 7,9
CV (%)	6,57						

¹ Não significativo ao teste F (P>0,05)

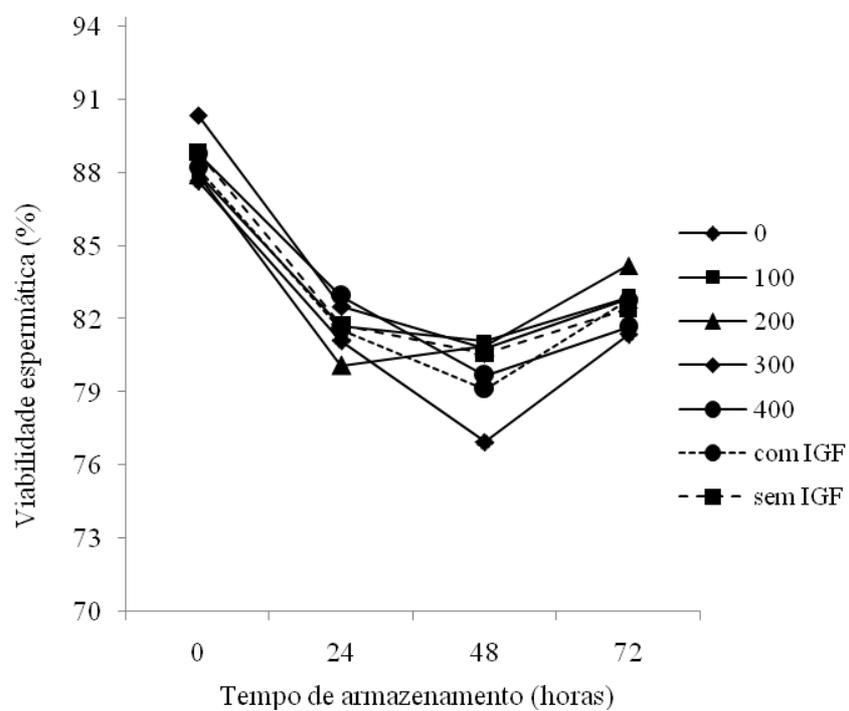


Figura 5 Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno resfriado com adição de diferentes concentrações de vitamina E (0 a 400 µg /mL) avaliada 10 minutos após a adição de IGF-I após diferentes tempos de armazenamento. Curvas representam médias com ou sem adição de IGF em diferentes concentrações de vitamina E e vice-versa

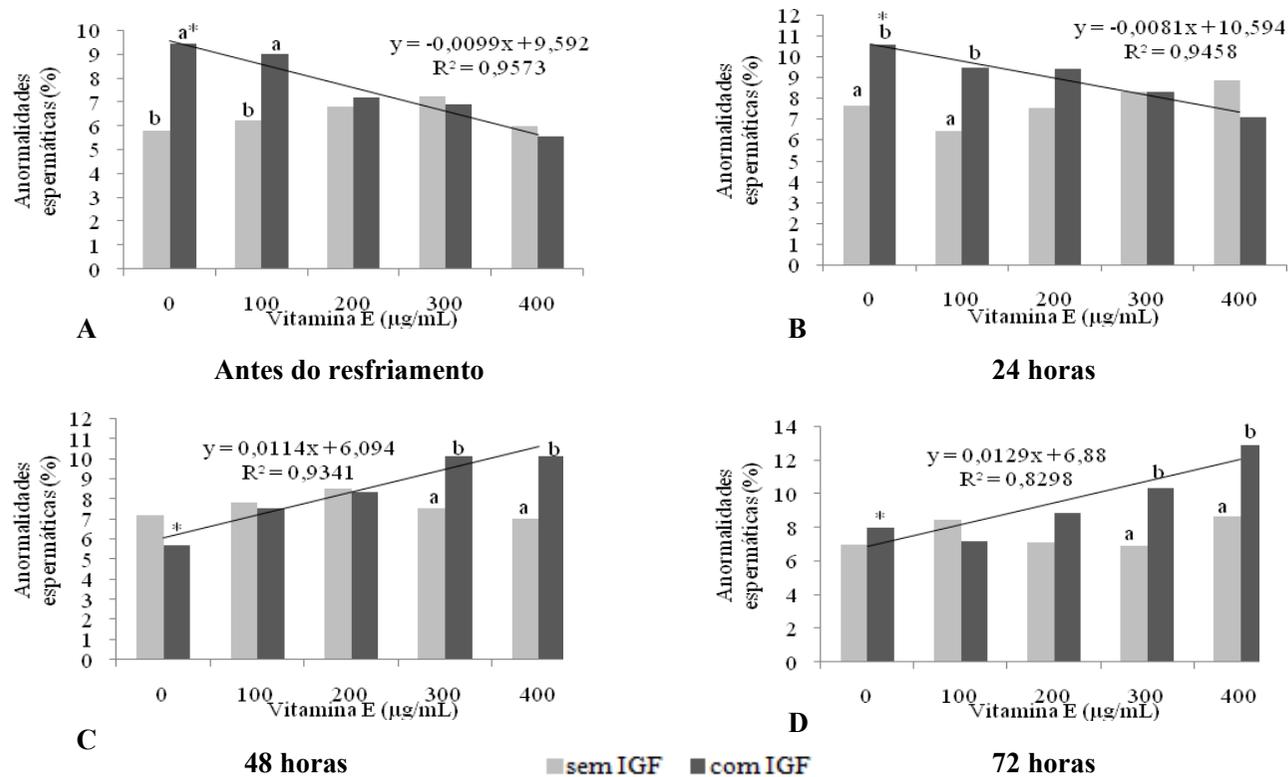


Figura 6 Anormalidades espermáticas totais (%) 10 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05). * Efeito linear (P<0,05). CV = 12,42%

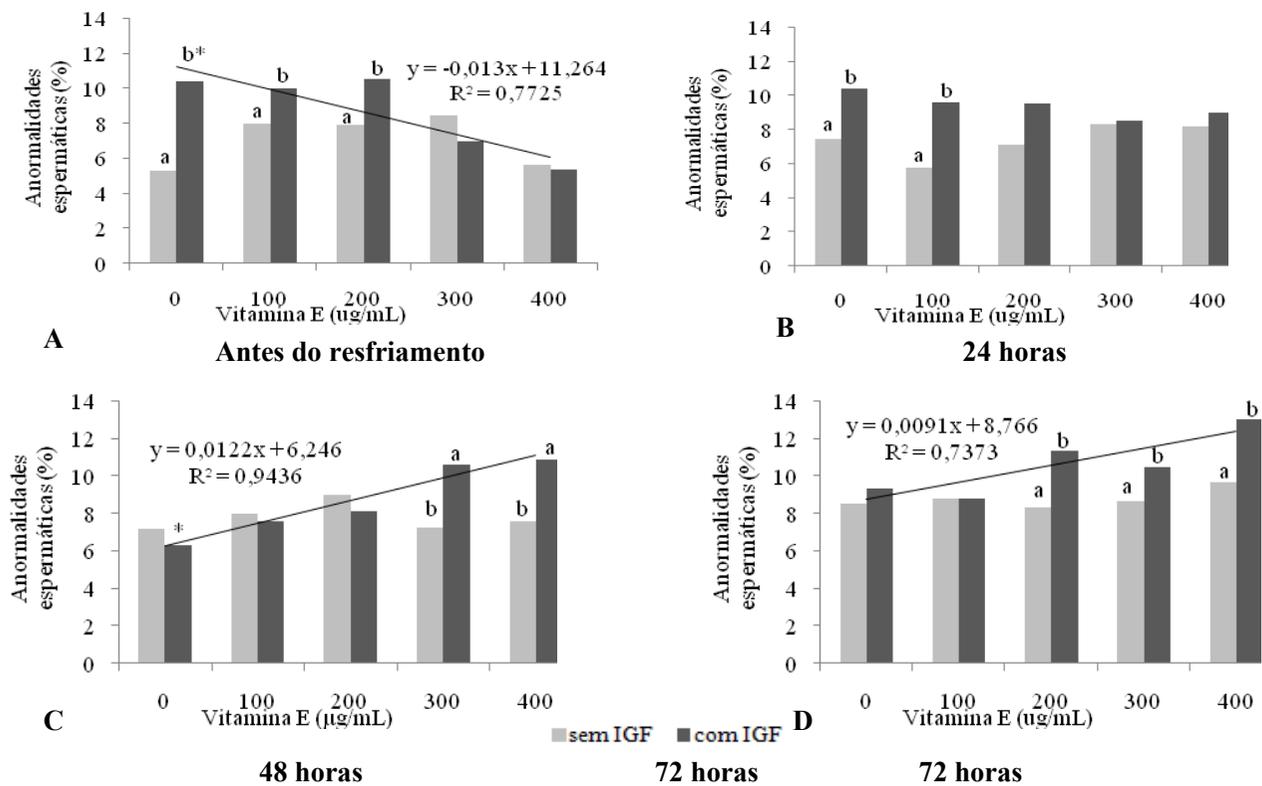


Figura 7 Anormalidades espermáticas totais (%) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento, avaliado em diferentes tempos (n = 12). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05). * Efeito linear (P<0,05). CV = 12,42%

3.2 Análises bioquímicas

Houve interação vitamina E x IGF-I sobre a concentração de MDA aos 120 minutos de incubação do sêmen antes (Figura 8A) e após 72 horas de armazenamento (Figura 8B). Ao adicionar IGF-I ao sêmen, não se observou efeito da vitamina E sobre esta variável, porém efeito linear decrescente ($P < 0,05$) foi observado quando o IGF-I não foi utilizado. Com relação ao próprio IGF-I, observou-se que este hormônio diminuiu ($P < 0,05$) a concentração de MDA em doses inseminantes armazenadas que não receberam adição de vitamina E. O mesmo resultado não pode ser observado ($P > 0,05$) no sêmen pré-resfriado.

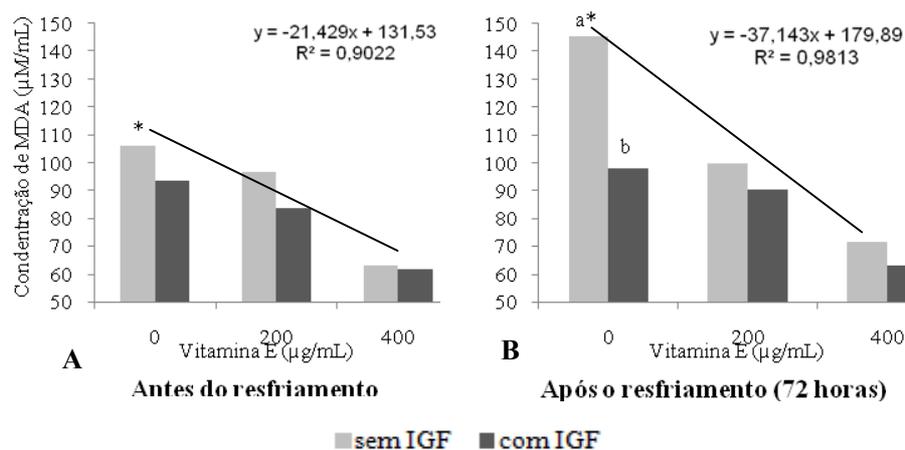


Figura 8 Concentração de MDA ($\mu\text{M}/\text{mL}$) 120 minutos após adição de 30 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes e após o resfriamento ($n = 6$). ^{a,b} diferentes letras diferem pelo teste SNK ($P < 0,05$). * Efeito linear ($P < 0,05$). CV = 34,45%

Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre o α -tocoferol e o IGF-I sobre o consumo de glicose pela célula espermática. (Tabela 3). O IGF-I diminuiu

($P < 0,05$) o consumo de glicose pelos espermatozoides, independentemente das diferentes concentrações de α -tocoferol, somente antes do armazenamento.

Tabela 3 Consumo de glicose (mg/dL) antes do armazenamento e 72 horas de armazenamento após adição ou não de IGF-I ao sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol

IGF-I (ng/mL)	Vitamina E (mg/dL)			Média
	0	200	400	
Antes do armazenamento				
0	31,8	47,9	32,5	37,4 a
30	25,0	20,6	16,2	20,6 b
Média	28,4	34,2	24,3	
72 horas de armazenamento				
0	33,5	32,4	23,9	29,9
30	22,4	32,1	13,3	22,6
Média	28,0	32,2	18,6	
CV (%)	37,15			

Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

4 DISCUSSÃO

A concentração de IGF-I adicionada nas doses inseminantes está acima das concentrações fisiológicas encontradas no plasma seminal de varrão (8.4 a 22.2 ng/mL) (19, 22), o que assegura elevados níveis do hormônio nas doses inseminantes antes e após o processamento. Silva et al. trabalhando com níveis de adição de IGF-I variando de 50 a 150 ng/mL, recomendaram níveis ótimos de 150 ng/mL para doses inseminantes armazenadas por 24 horas e 78 ng/mL para doses armazenadas por 72 horas, mas sugerem que níveis inferiores aos testados podem exercer efeitos fisiológicos no sêmen (33).

No presente trabalho, o uso de IGF-I nas doses armazenadas por 48 e 72 horas, suplementadas com α -tocoferol durante o processamento das mesmas, apresentou melhora na motilidade espermática após 120 minutos de incubação, tendo resultados mais expressivos em doses contendo entre 100 e 300 μ g/mL da vitamina. Também foi observado, de uma forma geral, um aumento progressivo da motilidade até os 235 μ g/mL em doses que foram resfriadas, o mesmo não sendo observado logo após o processamento das mesmas. Acima destes níveis de vitamina houve uma redução desta característica. O efeito quadrático apresentou comportamento semelhante 120 minutos após a adição de IGF-I.

Breininger et al. concluíram que 200 μ g/mL de α -tocoferol é o melhor nível para motilidade e resistência à peroxidação lipídica em amostras descongeladas de sêmen de varrão (7). Efeito prejudicial do α -tocoferol sobre a motilidade também tem sido relatado em outros trabalhos. Donnelly et al. mostraram que altas concentrações desta vitamina podem reduzir a motilidade espermática em humanos, apesar de diminuir a produção de ROS pelo espermatozoide (12). Pela natureza lipídica da vitamina E, é possível que esta possa afetar a composição da membrana, quando presente em elevadas quantidades, interferindo nas trocas iônicas e, conseqüentemente, no

metabolismo espermático. Mais estudos devem ser conduzidos visando elucidar os efeitos de elevadas doses de vitamina E sobre o metabolismo espermático.

Ainda com relação à motilidade, a não observação de resultados expressivos logo após o processamento das doses (10 minutos após a adição de IGF-I, figura 1A) sugere que, neste tempo, os espermatozoides podem não ter incorporado a vitamina nas membranas. Porém, após 120 minutos de incubação, houve melhor resposta das doses inseminantes que receberam adição de 300 µg/mL de vitamina associada ao IGF-I (Figura 2A). Na ausência deste hormônio, o mesmo resultado não pode ser observado. Sabe-se que os espermatozoides apresentam uma quantidade limitada de citoplasma celular, na qual as enzimas antioxidantes são encontradas, o que resulta na elevada sensibilidade às ROS (34,18). Desta forma, a presença de substâncias antioxidantes no plasma seminal (ou diluente) ou aderidos à membrana espermática, dentre elas a vitamina E, são responsáveis por remover uma grande parte destas substâncias nocivas (8).

Estudos indicam que o IGF-I apresenta a capacidade de melhorar a motilidade por acelerar o consumo de substratos energéticos pela célula espermática (28, 32). Porém, este aumento está associado com o incremento nos radicais livres, que poderia reduzir o tempo de viabilidade do sêmen (33), principalmente na espécie suína, a qual apresenta maior teor de ácidos graxos insaturados e menor de vitamina E (35). Assim, uma vez que o α -tocoferol tenha sido incorporado na membrana celular, pode haver redução da peroxidação lipídica e os danos causados à integridade da célula espermática (38).

No presente trabalho, a inclusão de vitamina E nas doses inseminantes reduziu a concentração de MDA de forma significativa, apenas em doses inseminantes que não receberam o IGF-I no início do período de incubação (Figura 8). Neste caso, também é possível que o IGF-I tenha efeito antioxidante, como observado na Figura 8B, onde a adição de IGF-I mostrou ser eficiente na

redução da concentração de MDA após 120 minutos em doses inseminantes armazenadas durante 72 horas sem adição de vitamina E. Resultados semelhantes obtidos com IGF-I também foram observados por Selvaraju et al. em búfalos (32).

Considerando ainda os resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que a limitada capacidade do sistema antioxidante do espermatozoide aliado com os baixos níveis de α -tocoferol resultou em elevadas concentrações de MDA em doses inseminantes resfriadas por 72 horas sem adição de vitamina E e IGF-I (Figura 8B).

Embora resultados positivos observados na peroxidação lipídica com o uso de IGF-I e vitamina E, tais substâncias não foram capazes de manter a qualidade das doses inseminantes ao longo do tempo de resfriamento (Figuras 3 e 4). Sabe-se que o sêmen estocado de varrão apresenta um aumento contínuo das espécies reativas ao oxigênio, o que inevitavelmente afeta algumas funções dos espermatozoides (20). Apesar da melhora na motilidade do sêmen suíno com a adição de IGF-I, esta associação não foi suficiente para manter esta característica através da estocagem, mostrando a fragilidade da célula espermática submetida à preservação líquida. Embora diversos estudos tenham estudado a adição da vitamina E com o intuito de manter a motilidade espermática durante a estocagem, os resultados não foram satisfatórios (36, 27). Por outro lado, Champion et al. verificaram, em equinos, que o IGF-I pode ser utilizado para preservar a motilidade após incubação por um período de 24 horas a temperatura ambiente (10).

Resultados na literatura relatando os efeitos da vitamina E sobre a motilidade espermática podem ser contrastantes, dependendo do tipo de estudo (sêmen líquido ou criopreservado), a espécie animal, o tipo de vitamina E e sua concentração (36, 27). Estes efeitos poderiam estar relacionados às diferenças na suscetibilidade a peroxidação lipídica entre as espécies.

Não foram observadas diferenças na viabilidade espermática ao longo do tempo de armazenamento. Este resultado indica que a técnica de resfriamento e o diluidor utilizado são eficientes em manter as células vivas, embora não tenham apresentado o mesmo comportamento de motilidade. Cerolini et al. observaram melhora na viabilidade espermática durante o armazenamento a 19°C por um período de cinco dias, associando este resultado à redução da peroxidação lipídica devido à presença do α -tocoferol (9). Além disso, o IGF-1 tem também capacidade de melhorar a integridade das membranas através da ativação de enzimas antioxidantes dentro das células, tais como a glutatona peroxidase (32, 33) e superóxido dismutase (14), presentes no plasma seminal, impedindo os efeitos nocivos das ROS sobre o espermatozoide (2).

A adição de níveis superiores a 100 μ g/mL de α -tocoferol incrementou o vigor espermático após de 120 minutos de incubação do sêmen não resfriado (Tabela 1), porém doses maiores da vitamina foram necessárias para manter esta resposta em doses inseminantes armazenadas por 24 horas. Não houve efeito da vitamina em doses armazenadas nos tempos subsequentes. Sabe-se que as ROS também são capazes de influenciar de forma negativa o potencial de membrana mitocondrial (3), interrompendo a disponibilidade de ATP para os filamentos da cauda (24), afetando a intensidade dos movimentos.

Quanto à morfologia da célula espermática, sabe-se que está diretamente correlacionada com a fertilidade (1). Os resultados do presente estudo indicam que, mesmo no sêmen resfriado durante 72 horas, o total de alterações está dentro dos padrões considerados normais para uma dose inseminante, que é de até 20% (21).

De uma forma geral, a concentração de vitamina E influenciou o total de alterações espermáticas apenas nas doses inseminantes que receberam do IGF-I no início do período de incubação. A vitamina reduziu de forma linear o total de alterações no sêmen armazenado até 24 horas, porém aumentou no sêmen

armezando por 48 e 72 horas. Este resultado pode estar relacionado ao aumento da atividade metabólica dos espermatozoides frente ao aumento das concentrações de IGF-I e à oxidação da vitamina E durante o período de maior armazenamento das doses inseminantes.

Segundo Nabil Aziz et al., o estresse oxidativo da célula espermática está negativamente correlacionada com a percentagem de espermatozoides com morfologia normal e positivamente correlacionada com espermatozoides com cabeças anormais, dano no acrossoma, gotas citoplasmáticas, peça intermediária e defeitos na cauda espermática (29). Por outro lado, elevadas concentrações de α -tocoferol podem alterar as características da membrana plasmática, afetando a sua fluidez e, conseqüentemente, a estrutura celular (11). No presente estudo, é provável que maiores concentrações de ROS possam ter influenciado no total de alterações morfológicas nas doses inseminantes armazenadas até 24 horas e o elevado teor de vitamina E oxidada nas características das doses armazenadas por tempo superior.

O IGF-I tem sido relacionado *in vivo* com o desenvolvimento de células germinativas e, conseqüentemente com o desenvolvimento de espermatozoides normais (15). No caso do presente estudo, a adição deste hormônio aumentou o número de células anormais nas doses inseminantes armazenadas até 24 horas contendo baixas concentrações de vitamina E (até 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 6 e 7, A e B). Por outro lado, considerando períodos superiores de armazenamento, o IGF-I influenciou apenas em doses contendo elevadas concentrações da vitamina (Figuras 6 e 7, C e D). Os resultados apontam novamente uma concentração ideal de vitamina E em torno de 200 $\mu\text{g/mL}$ para os sêmen resfriado, exceto quando armazenado por 72 horas (Figura 7D).

Com relação ao consumo de glicose, os resultados são diferentes dos observados por Miah et al. (26). Silva et al. verificaram que o IGF-I reduz o consumo de frutose no espermatozoide de varrão, argumentando que este

hormônio poderia estar envolvido no consumo de um outro carboidrato (33). De acordo com Baronos, a glicose e a frutose não são as únicas fontes de energia para a célula espermática do varrão (5). Também podem ser citados a manose, o sorbitol, o lactato, o inositol, ácidos graxos voláteis e o citrato. Neste caso, tais substâncias poderiam estar mais envolvidas com o metabolismo energético da célula espermática induzido pelo IGF-I.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a adição de 235 µg/mL de vitamina E durante o processamento de doses inseminantes de 100 mL de suínos contendo três bilhões de espermatozoides diluídos em BTS é viável para garantir melhor qualidade até 72 horas de armazenamento a 15 °C. A adição de 30 ng/mL de IGF-I neste nível de vitamina melhora a motilidade após 120 minutos de incubação. Embora o IGF-I tenha aumentado o número de anormalidades espermáticas totais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fazenda São Paulo, localizada em Oliveira, Minas Gerais, Brasil, por disponibilizar os varrões, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, pelo auxílio financeiro e apoio na condução da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- (1) ALM, K. et al. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 210-213, 2006.
- (2) ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 27, n. 2, p. 1102-1108, 1987.
- (3) ARMSTRONG, J. S. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects of human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 7, n. 26, p. 869-90, 1999.
- (4) BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.
- (5) BARONOS, S. Seminal carbohydrate in boar and stallion. **The Journal of the Reproduction and Fertility**, Bristol, v. 24, n. 2, p. 303-305, 1971.
- (6) BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, New York, v. 1, p. 176 -177, 1950.
- (7) BREININGER, E. et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, May 2005.
- (8) BROUWERS, F. et al. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 458-467, 2005.
- (9) CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 99-111, 2000.
- (10) CHAMPION, Z. J. et al. Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 7, p. 1793-1800, 2002.

- (11) DALVIT, G. C.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T. Effect of α -tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 3, p. 619–627, 1998.
- (12) DONELLY, et al. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, n. 3, p. 484–495, 1999.
- (13) ERENPREISS, J. et al. A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 8, n. 1, p. 11–29, 2006.
- (14) GANCARCZYK, et al. Aromatization and antioxidant capacity in the testis of seasonally breeding bank voles: effects of LH, PRL, and IGF-I. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 7, p. 1376–1391, 2006.
- (15) GLANDER, H. J. et al. Insulin-like growth factor-I and 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 2454–2460, 1996.
- (16) HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n.2, p. 330–337, 1998.
- (17) HENKEL, R. R. The impact of oxidants on sperm function. **Andrologia**, Singapore, v. 37, n. 6, p. 205–206, 2005.
- (18) HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 22, n. 1, p. 104–110, 2001.
- (19) KUMARESAN, A. et al. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 162–171, 2009.
- (20) KUSTER, C. E.; ALTHOUSE, G. C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in AndrohepR and X-cell™ extenders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 3, p. 365–376, 1999.

(21) LACKEY, B. R.; GRAY, S. L.; HENRICKS, D. M. Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. **Physiology Research**, Vídenská, v. 51, n. 3, p. 309-311, 2002.

(22) LEWIS, S. E.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 322, n. 1, p. 33-41, 2005.

(23) MAHADEVAN, M. M.; MILLER, M. M.; MOUTOS, D. M. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristic in vitro. **Human Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 119–123, 1997.

(24) MACPHERSON, M. L. et al. Insulin-like growth factor-I and insuline-like growth factor binding protein-2 and-5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 648-654, 2002.

(25) MIAH, A. G. et al. Effects of relaxin and IGF-I on capacitation, acrosome reaction, cholesterol efflux and utilization of labeled and unlabeled glucose in porcine spermatozoa. **Reproductive Medicine and Biology**, Singapore, v. 7, n. 1, p. 29-36, 2008.

(26) MICHAEL, A. J. et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 119–135, 2009.

(27) MINELLI, A. et al. Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, Weiheim, v. 290, n. 3, p. 311–317, 2001.

(28) NABIL AZIZ, M. D. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility and Sterility**, Oxford, v. 2, n. 81, p. 484-495, 1999.

(29) O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, Singapore, v. 29, n. 5, p. 269–275, Sept. /Oct. 1997.

- (30) PEÑA, F. J. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 85–98, 2003.
- (31) SAS INSTITUTE. **User's manual**: statistical analyses system institute. Cary, 1996.
- (32) SELVARAJU, S. et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1/4, p. 60–70, 2009.
- (33) SILVA, D. M. et al. Addition of IGF-1 to storage-cooled boar semen and its effects on sperm quality. **Growth Hormone and IGF Research**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 325-330, 2011.
- (34) SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, Sharjah, v. 8, n. 7, p. 851–862, 2001.
- (35) SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 25, n. 1, Jan./Feb. 2004.
- (36) UPRETI, G. C. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 48, n. 2/4, p. 269–278, 1997.
- (37) WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 103–117, 1998.
- (38) ZHANG, G. F. et al. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. **Chemico-Biological Interactions**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 267–284, 2001.

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1A Análise de variância para motilidade espermática doo sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação ... 75
- Tabela 2A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação ... 76
- Tabela 3A Análise de variância para anormalidades espermáticas totais do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação..... 77
- Tabela 4A Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento 77
- Tabela 5A Análise de variância para consumo de glicose pelos espermatozoides no sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento 78

Anexo A

Tabela 1A Análise de variância para motilidade espermática doo sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	38401,297039	3491,027004	35,503	0,0000
Vitamina (V)	4	981,036215	245,259054	2,494	0,0423
IGF (I)	1	82,478363	82,478363	0,839	0,3602
Armazenamento (A)	4	177446,39	44361,597	451,151	0,0000
V*I	4	966,134597	241,533649	2,456	0,0449
V*A	16	3921,282256	245,080141	2,492	0,0011
I*A	4	1694,310179	423,577545	4,308	0,0020
V*I*A	16	697,268476	43,579280	0,443	0,9704
Erro 1	471	46313,297307	98,329718		
Tempo (T)	1	116866,020	116866,020	4549,356	0,0000
T*V	4	315,657345	78,914336	3,072	0,0164
T*I	1	10,290965	10,290965	0,17	0,6779
T*A	4	2844,308069	711,077	11,94	0,0001
T*V*I	4	73,052901	18,263225	0,711	0,5848
T*V*A	16	680,495164	42,530948	1,656	0,0529
T*I*A	4	180,499049	45,124762	1,757	0,1369
T*V*I*A	16	639,463777	39,966486	1,556	0,0780
Erro 2	387	9941,441008	25,688478		

CV 1 (%) = 18,96

CV 2 (%) = 9,69

Tabela 2A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	7143,077785	649,370708	7,894	0,0000
Vitamina (V)	4	300,676416	75,169104	0,914	0,4555
IGF (I)	1	4,431277	4,431277	0,054	0,8166
Armazenamento (A)	4	5622,680826	1405,670207	17,088	0,0000
V*I	4	20,608584	5,152146	0,063	0,9928
V*A	16	1080,135916	67,508495	0,821	0,6624
I*A	4	90,490410	22,622602	0,275	0,8941
V*I*A	16	491,713376	30,732086	0,374	0,9878
Erro 1	507	41705,218559	82,258814		
Tempo (T)	1	5057,767338	5057,767338	178,169	0,0000
T*V	4	69,247074	17,311769	0,610	0,6557
T*I	1	21,716659	21,716659	0,765	0,3822
T*A	4	780,649981	195,162495	6,875	0,0000
T*V*I	4	28,336853	7,084213	0,250	0,9099
T*V*A	16	524,698992	32,793687	1,155	0,3012
T*I*A	4	192,288686	48,072171	1,693	0,1503
T*V*I*A	16	340,958186	21,309887	0,751	0,7415
Erro 2	468	13285,336231	28,387471		

CV 1 (%) = 11,18

CV 2 (%) = 6,57

Tabela 3A Análise de variância para anormalidades espermáticas totais do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento e incubação

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	197,837476	17,985225	73,609	0,0000
Vitamina (V)	4	3,195601	0,798900	3,270	0,0118
IGF (I)	1	1,488869	1,488869	6,094	0,0140
Armazenamento (A)	3	15,078710	5,026237	20,571	0,0000
V*I	4	3,142854	0,785713	3,216	0,0129
V*A	12	4,517249	0,376437	1,541	0,1069
I*A	3	1,602813	0,534271	2,187	0,0891
V*I*A	12	8,894782	0,741232	3,034	0,0004
Erro 1	404	98,711757	0,244336		
Tempo (T)	1	10,373202	10,373202	47,619	0,0000
T*V	4	1,396354	0,349089	1,603	0,1741
T*I	1	3,560180	3,560180	16,343	0,0001
T*A	3	0,577877	0,192626	0,884	0,4497
T*V*I	4	4,672435	1,168109	5,362	0,0004
T*V*A	12	2,581291	0,215108	0,987	0,4612
T*I*A	3	0,037986	0,012662	0,058	0,9832
T*V*I*A	12	7,052113	0,587676	2,698	0,0019
Erro 2	259	56,420211	0,217839		

CV 1 (%) = 18,13

CV 2 (%) = 12,42

Tabela 4^a Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	2370,980966	592,745241	0,611	0,6571
Vitamina (V)	2	18999,429682	9499,714841	9,793	0,0004
IGF (I)	1	3030,712218	3030,712218	3,124	0,0850
Armazenamento (A)	1	2242,142714	2242,142714	2,311	0,1365
V*I	2	2589,793234	1294,896617	1,335	0,2749
V*A	2	447,995997	223,997998	0,231	0,7949
I*A	1	28,499608	28,499608	0,029	0,8648
V*I*A	2	1125,020809	562,510404	0,580	0,5647
Erro	39	37831,714726	970,043967		

CV (%) = 34,45

Tabela 5A Análise de variância para consumo de glicose pelos espermatozoides no sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de vitamina E antes do resfriamento e de IGF durante o reaquecimento, avaliado em diferentes tempos de armazenamento

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	9,084739	1,816948	0,526	0,7549
Vitamina (V)	2	15,46683	7,733415	2,24	0,1207
IGF (I)	1	18,260569	18,260569	5,288	0,0272
Armazenamento (A)	1	0,749111	0,749111	0,217	0,6441
V*I	1	0,12542	0,12542	0,04	0,8499
V*A	2	0,362863	0,181431	0,053	0,9489
I*A	1	1,079127	1,079127	0,313	0,5795
V*I*A	2	3,929148	1,964574	0,569	0,571
Erro	37	127,76437	3,453091		

CV (%) = 37,15