

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

Cristiane Arieta Alvarez^{1*}, Gentil Vanini de Moraes², Cláudio Scapinello², Elias Nunes Martins², Rejane Machado Cardozo², Marcela Mataveli² e Rafael Seki Kioshima²

¹Integrado Colégio e Faculdade, Av. Irmãos Pereira, 670, 87301-010, Campo Mourão, Paraná, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: krika@wnet.com.br

RESUMO. Foram avaliadas as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelhos alimentados com rações contendo diferentes níveis de selenometionina e vitamina C (VC). Utilizaram-se 125 coelhos machos, alojados individualmente e distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com vinte cinco tratamentos e cinco repetições. As colheitas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas. Os parâmetros avaliados foram: volume, cor, pH, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração espermática. Foi observado que a cor e a concentração espermática melhoraram à medida que foi adicionado VC na ração. Contudo, volume, pH, motilidade espermática progressiva e vigor espermático não foram significativos ($p>0,05$) nos tratamentos. O consumo de ração aumentou ($p<0,05$), de acordo com a elevação dos níveis de VC, mas não foi influenciado pelos diferentes níveis de selenometionina. Foi possível constatar que a vitamina melhorou a cor e a concentração espermática e aumentou o consumo de ração.

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

ABSTRACT. Effect of selenomethionine and vitamin C supplementation on quantitative and qualitative characteristics of rabbit semen. Quantitative and qualitative semen characteristics of rabbits fed with rations containing different selenomethionine and vitamin C (VC) levels were studied. 125 male rabbits kept individually in cage were used. They were distributed in a completely randomized design with twenty-five treatments and five replications. Semen was collected once a week. The following parameters were evaluated: volume, color, pH, progressive motility, spermatic vigor, and spermatic concentration. Significant difference ($p<0.05$) was observed to the treatments with VC considering the semen color and spermatic concentration, becoming better with VC increase. However, volume, pH, progressive motility and spermatic vigor did not show significant differences ($p>0.05$) among the treatments. The ration intake increased lineally according to the increase of the VC levels, but there was not any effect of selenomethionine levels. Results showed that vitamin C improved the semen color and spermatic concentration and increased the ration intake.

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

Introdução

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

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

et al., 2002).

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

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

de EROs reduz a motilidade espermática.

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

Frei *et al.* (1990) demonstraram que o ácido ascórbico agiu como fator de defesa primária no plasma sanguíneo contra os radicais livres. O ácido ascórbico também está presente em altas concentrações no plasma seminal comparado com o plasma sanguíneo (400 vs. 60 µM), presumivelmente refletindo o importante papel fisiológico, destacando o interesse do ácido ascórbico no plasma seminal em relação aos danos oxidativos dos espermatozoides (Fraga *et al.*, 1991).

Dawson *et al.* (1992) indicaram melhora na viabilidade do espermatozoide, diminuição na porcentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática após a ingestão diária de 1,0 g de ácido ascórbico em experimento com homens fumantes de 25 anos de idade. Luck *et al.* (1995) descreveram que o ascorbato poderia ser considerado essencial para o processo reprodutivo humano.

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

O selênio utilizado em dietas de animais é encontrado como selenito de sódio (Na₂SeO₃) ou na forma orgânica como selenometionina (Se-Met) e selenocisteína (Se-Cys) (Whanger e Butler, 1988). Thompson e Stewart (1973) relataram que a absorção intestinal de selenito de sódio é de 92% e selenometionina é de 96% e a retenção total no corpo indica que a excreção do selenito absorvido é maior do que a do selenometionina.

Objetivou-se, com este trabalho, demonstrar a influência das suplementações adicionais de vitamina C e selenometionina em parâmetros do sêmen, incluindo volume (mL), cor, pH, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração de espermatozoide (mm³).

Material e métodos

Local e animais

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná, de março a junho de 2004. Foram utilizados 125

coelhos machos Nova Zelândia Branco, com idade média de seis meses, alojados individualmente em gaiolas de arame galvanizado de 40 cm x 60 cm x 45 cm (comprimento, largura e altura), respectivamente, providas de bebedouro automático e comedouro semiautomático, instalados em galpão de alvenaria com cobertura de fibroamianto. Os animais foram mantidos por um período preliminar de oito semanas em dieta base sem suplementações e posteriormente foi realizada uma triagem, através da análise de sêmen e do peso para a formação dos grupos de tratamentos, os quais constaram de cinco animais por tratamento com idade média de seis meses. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental fatorial inteiramente casualizado, com vinte e cinco tratamentos (rações com adições de níveis diferentes de vitamina C e selenometionina) e cinco repetições. Os coelhos foram distribuídos em tratamentos conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes tratamentos com suplementações adicionais de Selenometionina (SeM)* e Vitamina C (VC)** fornecidos aos animais durante a fase experimental (mg/kg de ração).

Table 1. Different treatments with additional supplementation of Selenomethionine (SeM)* and Vitamin C (VC)** supplied to the animals during the experimental phase (mg/kg, of ratio).

Tratamentos Treatments	N N	Selenometionina Selenomethionine	Vitamina C Vitamin C
T1 - SeM ₀ VC ₀	5	0	0
T2 - SeM ₀ VC ₃₀₀	5	0	300
T3 - SeM ₀ VC ₂₂₅	5	0	225
T4 - SeM ₀ VC ₁₅₀	5	0	150
T5 - SeM ₀ VC ₇₅	5	0	75
T6 - SeM ₁₅₀ VC ₀	5	150	0
T7 - SeM ₁₅₀ VC ₃₀₀	5	150	300
T8 - SeM ₁₅₀ VC ₂₂₅	5	150	225
T9 - SeM ₁₅₀ VC ₁₅₀	5	150	150
T10 - SeM ₁₅₀ VC ₇₅	5	150	75
T11 - SeM ₃₀₀ VC ₀	5	300	0
T12 - SeM ₃₀₀ VC ₃₀₀	5	300	300
T13 - SeM ₃₀₀ VC ₂₂₅	5	300	225
T14 - SeM ₃₀₀ VC ₁₅₀	5	300	150
T15 - SeM ₃₀₀ VC ₇₅	5	300	75
T16 - SeM ₄₅₀ VC ₀	5	450	0
T17 - SeM ₄₅₀ VC ₃₀₀	5	450	300
T18 - SeM ₄₅₀ VC ₂₂₅	5	450	225
T19 - SeM ₄₅₀ VC ₁₅₀	5	450	150
T20 - SeM ₄₅₀ VC ₇₅	5	450	75
T21 - SeM ₆₀₀ VC ₀	5	600	0
T22 - SeM ₆₀₀ VC ₃₀₀	5	600	300
T23 - SeM ₆₀₀ VC ₂₂₅	5	600	225
T24 - SeM ₆₀₀ VC ₁₅₀	5	600	150
T25 - SeM ₆₀₀ VC ₇₅	5	600	75

* Selenometionina - SEL - PLEX® 50 (Alltech Inc.); ** Vitamina C - ROVIMIX® C-EC (Roche); N - número de animais por tratamentos.

*Selenomethionine-Sel - PLEX® 50 (Alltech Inc.); **Vitamin C - ROVIMIX® C-EC (Roche); N - Numbers of animals for treatments.

As rações foram formuladas com base nas exigências do AEC (1987) para coelhos em reprodução (Tabela 2), e conforme as análises químicas realizadas por Andreazzi (2002) continham 89,62% de matéria seca, 16,5% de proteína bruta, 14,03% de fibra bruta, 34,52% de fibra em detergente neutro (FDN), 16,93% de fibra em detergente ácido (FDA), 2,83% de extrato etéreo e 2.599 Kcal/kg de energia digestível, consistindo de uma ração base

acrescida do suplemento e seu fornecimento foi, em média, de 100 gramas/animal/dia durante 103 dias, com água à vontade.

Tabela 2. Composição percentual da ração base.

Table 2. Percentual composition of the basic ration.

Ingredientes <i>Ingredient</i>	% <i>%</i>	Unidade <i>Unit</i>
Milho <i>Corn</i>	25,6	Kg
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	14,0	Kg
Farelo de Trigo <i>Wheat meal</i>	24,0	kg
Feno de Alfafa <i>Alfalfa hay</i>	23,4	Kg
Feno de Coast Cros <i>Coast Cros hay</i>	10,0	Kg
Sal Comum <i>Common salt</i>	0,4	Kg
Fosfato bicálcico <i>Dicalcium phosphate</i>	0,8	Kg
Calcário Calcítico <i>Limestone</i>	1,0	Kg
DL – Metionina <i>DL-Methionine</i>	0,13	Kg
Bacitracina <i>Bacitracin</i>	0,05	Kg
Cicostat Robenidina <i>Cicostat Robenidin</i>	0,083	Kg
Mist. Vit + Min. ¹ <i>Premix vit+min.¹</i>	0,5	kg
Total	100,00	

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

²Vitamin-mineral premix composition per kg: Vit A, 600.000 UI; Vit D, 100.000 UI; Vit E, 8.000 mg; Vit K3, 200 mg; Vit B1, 400 mg; Vit B2, 600 mg; Vit B6, 200mg; Vit B12, 2.000mcg; Panthotenic acid, 2.000 mg; Choline, 70.000 mg; Iron, 8.000 mg; Copper, 1.200 mg; Cobalt, 200 mg; Manganese, 8.600 mg; Zinc, 12.000 mg; Iodine, 64 mg; Selenium, 16 mg; Methionine, 120.000 mg; Sinox, 20.000 mg.

As rações foram elaboradas para serem consumidas em um mês para evitar a perda de princípio ativo dos produtos. O selenometionina, com 1,0 mg de selênio/kg (Sel-Plex® 50 - Alltech Inc.), e a vitamina C, com 98% de pureza (Rovimix® C-EC – Roche), foram pesados em balanças analíticas e adicionados às rações tratamentos. As rações bases mais as adições de selenometionina e vitamina C, de acordo com cada tratamento, foram misturadas em misturador Y por 15 minutos e, posteriormente peletizadas, sendo que os tamanhos dos péletes foram de 0,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento. Depois de peletizadas foram secas ao ar livre e ensacadas em sacos etiquetados conforme cada tratamento.

O fornecimento das dietas iniciou no dia 8 de março de 2004 e terminou no dia 19 de junho de 2004, totalizando 103 dias. Cada animal recebeu, em média, 100 gramas de ração/dia, durante 103 dias. As rações foram pesadas no dia 8 de março de 2004 (início do experimento) e no dia 19 de junho de 2004 (término) em balança analítica com capacidade de 6 kg para determinar a média de consumo de ração entre os cinco animais de cada tratamento, durante os 103 dias de experimento. Isto foi realizado considerando as sobras das rações de cada animal, obtendo-se, assim, os resultados médios de consumo

dos animais de cada tratamento.

Análise do sêmen

As colheitas de sêmen iniciaram-se dois meses depois dos animais estarem recebendo as dietas contendo as suplementações. As colheitas foram realizadas uma vez por semana, de 1 de maio a 19 de junho de 2004, compreendendo oito semanas, resultando em oito colheitas por animal. A colheita foi realizada com vagina artificial desenvolvida no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, constituída de tubo plástico com 8 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro, revestida, internamente, com membrana constituída de preservativo não lubrificado e copo coletor graduado (Scapinello *et al.*, 1997). A temperatura da água na vagina artificial, no momento da coleta, foi de 44°C e utilizou-se uma coelha em estro como manequim. Logo após cada colheita, avaliaram-se, visualmente, o volume com (VOCG) e sem gelatina (VOSG) e a cor. Para a cor (CO) do sêmen foram atribuídos valores numéricos que variaram de 1 a 5 pontos, em que 1 representou a cor branco leitoso, 2 branco aquoso, 3 amarelo claro, 4 amarelo cítrico e 5 marrom, sendo que o 1 representou a melhor cor de sêmen e o 5 a pior. O pH foi avaliado utilizando-se papel indicador de tornassol (Universal indicator pH 0-14, Merck). Em seguida, o sêmen foi colocado em banho-maria, a 37° C, para analisar o vigor espermático (VI) e a motilidade espermática progressiva (MO). Em uma lâmina de microscopia óptica foram diluídas uma gota de sêmen com 5 gotas de citrato de sódio diidratado a 3% (Sigma®) e desse diluído foi preparada a lâmina com laminula e avaliados subjetivamente os dois parâmetros, em microscópio de contraste de fase (Micronal CBA), em aumento de 40X. Para avaliar a motilidade espermática progressiva utilizou-se escore de 0% a 100% e para o vigor espermático um escore de 0 a 5 pontos, sendo que o valor 5 representou o melhor vigor.

A concentração espermática (CON) foi analisada, posteriormente, no Laboratório de Reprodução Animal da UEM, acondicionando o sêmen em frascos contendo solução formol salina tamponada (Hancock, 1957), na diluição de 1:100. A análise foi feita utilizando-se a câmara de Neubauer (Hemocitômetro – Germany Improved Double). A contagem e a determinação de espermatozoides por mm³ de sêmen foi realizado conforme Sorensen (1979).

Análise estatística

O modelo estatístico foi:

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

em que:

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

b_0 = constante geral;

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

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

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

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

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

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

Segundo esse modelo, utilizou-se a metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972), usando-se o software GLIM 4.0, sendo as características estudadas comparadas por meio do teste F de análise de variância ($p < 0,05$). Para os gráficos, foi utilizado o software estatística 6.0 (Statsoft, 2003).

Resultado e discussão

As médias de características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade, alimentados com diferentes níveis de selenometionina (SeM) e vitamina C (VC), encontram-se nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Os resultados foram apresentados em tabelas separadas depois que foi constatado, pela análise estatística, que não houve interação significativa entre o selenometionina e vitamina C. Donnelly *et al.* (1999) e Yousef *et al.* (2003) verificaram interação entre a vitamina E e vitamina C em experimentos com sêmen de homens e coelhos, respectivamente, o que não foi observado neste experimento com vitamina C e selenometionina.

Ao se proceder às análises de sêmen, observaram-se melhor volume de sêmen com gelatina (VOCG) no tratamento que apresentava 450 mg de SeM/kg de ração e 75 mg de VC/kg de ração, apesar de não ter sido observadas interações e as diferenças entre os tratamentos não terem sido significativas. Yousef (2005), trabalhando com coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal, observou o volume de 0,87 ml. Em relação ao volume sem gelatina (VOSG), foi verificado que o tratamento com 300 mg de SeM/kg (Tabela 3) de ração e 225 mg de VC/kg (Tabela 4) de ração apresentou o melhor volume, mas não houve diferenças ($p > 0,05$) e não foi constatada interação entre o SeM e VC. Provavelmente, o maior teor de SeM e o menor valor

de VC tenha favorecido a secreção das glândulas bulbouretrais, as quais são responsáveis pela porção gelatinosa do sêmen. Já o menor valor de SeM e a maior quantidade de VC devem ter favorecido a atividade das vesículas seminais que são responsáveis pela secreção da maior parte dos líquidos seminais.

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

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

PAR*	Selenometionina (mg/kg de ração) Selenomethionine (mg/kg of ration)									
	0		150		300		450		600	
	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD	Média Mean	DP SD
VOCG	0,511	1,041	0,760	1,118	0,754	1,236	0,857	1,507	0,516	1,109
VOSG	0,728	0,573	0,791	0,556	0,885	0,789	0,715	0,469	0,663	0,557
CO	1,284	0,716	1,371	0,843	1,660	1,131	1,338	0,779	1,340	0,800
pH	7,956	0,610	7,933	0,652	8,099	0,778	8,067	0,689	8,046	0,700
MO	41,306	23,238	44,211	23,744	33,885	28,121	33,559	25,255	37,196	25,142
VI	2,787	1,131	2,933	1,092	2,565	1,207	2,415	1,283	2,655	1,251
CON	360137200761329990	173100276688	179160278320	194733324910	190241					

*Parâmetros: VOGC – volume com gelatina (ml); VOSG – volume sem gelatina (ml); CO – cor (escala 1 - 5); pH (escala 0 - 14); MO – motilidade progressiva (%); VI – vigor espermático (escala 0 - 5); CON – concentração espermática (mm³). DP – Desvio Padrão.

*Parameters: VOGC – volume with gel (mL); VOSG – volume without gel (mL); CO – color (score 1 - 5); pH (scale 0-14); MO – progressive motility (%); VI – spermatic vigor (score 0 - 5); CON – spermatic concentration (mm³).

Observaram-se diferenças significativas nos tratamentos com SeM e VC ($p < 0,05$) sobre a cor do sêmen (CO), sendo que os tratamentos que apresentavam 300 mg de SeM/kg de ração mostraram a pior cor para o sêmen (Figura 1). Por outro lado, a cor do sêmen melhorou significativamente ($p < 0,05$) à medida que aumentaram as quantidades de vitamina C. O ponto mínimo ocorreu no tratamento com 300 mg de VC/kg de ração (melhor resultado), no qual o escore foi de 1,236 ($p < 0,05$) (Figura 1) e o pior no tratamento com 75 mg de VC/kg de ração (1,665). A cor que predominou foi o branco leitoso (escore 1), estando de acordo com os resultados obtidos por Scapinello *et al.* (1997), que também relataram cor branco leitoso em coelhos suplementados com metionina+cistina, o que, para os autores, representa normalidade e demonstra boa qualidade do sêmen. Esse fato pode estar relacionado com a pouca interferência da SeM sobre a espermatogênese, interpretado pela análise de concentração que foi também maior no tratamento com 300 mg de VC/kg de ração e o favorecimento da VC na espermatogênese, porque a concentração melhorou com a adição de VC, fator que interfere fortemente na cor do sêmen.

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

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

	Vitamina C (mg/kg de ração) Vitamin C (mg/kg of ration)				
	0	75	150	225	300

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

*Parâmetros: VOGC – volume com gelatina (mL); VOSG – volume sem gelatina (mL); CO – cor (escala 1 a 5); pH (escala 0 – 14); MO – motilidade progressiva; VI – vigor espermático (escala 0 a 5); CON – concentração espermática (mm³). DP- Desvio Padrão.

* Parameters: VOGC – volume with gel (mL); VOSG – volume without gel (mL); CO – color (scale 1 – 5); pH (scale 0-14); MO – progressive motility (%); VI – spermatic vigor (score 0 – 5); CON – spermatic concentration (mm³).

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

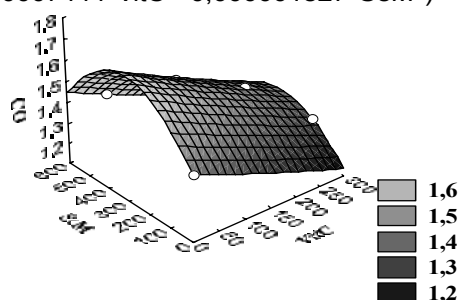


Figura 1. Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg de Vit C/kg de ração) sobre a cor (CO) do sêmen em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

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

Foi observado o melhor pH no tratamento que apresentava 150 mg de SeM/kg de ração e 150 mg de VC/kg de ração (Tabelas 3 e 4, respectivamente), mas não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) e nem interações entre os tratamentos. Considera-se melhor pH aquele que mais se aproxima do neutro (pH 7,0). Yousef (2005) encontrou pH de 7,2 em coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal. Alvarino (2000) descreveu que o pH entre 6,8 e 8,4 é um valor adequado para sêmen de coelhos. Neste trabalho, os valores variaram de 7,96 a 8,14, indicando que a VC e a SeM não interferiram no metabolismo dos espermatozoides a ponto de alterar o pH.

A motilidade progressiva (MO) teve destaque nos tratamentos que apresentaram 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração (Figura 2), mas não houve diferenças ($p > 0,05$) e interações entre os diferentes níveis dos dois produtos. A Figura 2 representa apenas um gráfico dinâmico que mostra os tratamentos e o comportamento da motilidade nesses tratamentos, não representando interações, pois pela análise estatística não foram encontradas interações. Apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos, essa motilidade espermática apresentou-se maior do que o controle (Figura 2).

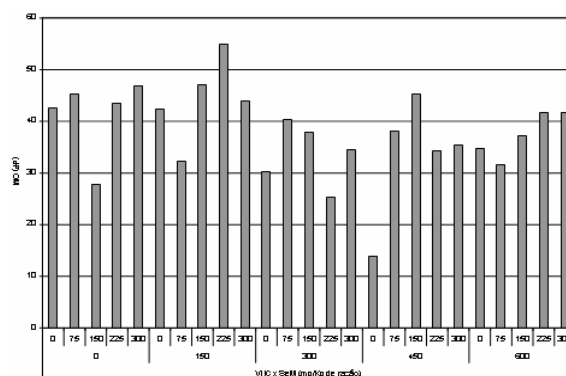


Figura 2. Diferentes níveis de Vitamina C X Selenometionina (Vit C X SeM - mg/kg de ração) sobre a porcentagem de motilidade progressiva (MO) em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

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

Castellini *et al.* (2002) observaram motilidade progressiva de 57% em coelhos suplementados com 500 mg de selênio/kg de ração contra 64% nos controles. A maior motilidade progressiva (81%) foi destacada por Yousef (2005) em coelhos suplementados com 40 mg de ácido ascórbico/kg de peso animal, provavelmente por serem elevadas as concentrações de ácido ascórbico utilizadas no experimento.

Diferentemente do observado nesta pesquisa, Castellini *et al.* (2002) e Yousef (2005) verificaram influência positiva do selênio e da vitamina C, respectivamente, na motilidade espermática progressiva. Ciereszko e Dabrowski (1995), trabalhando com peixes Rainbow Trout com dietas suplementadas com ascorbil monofosfato (vitamina C), confirmaram que a deficiência de ácido ascórbico reduz a motilidade espermática e a concentração dos espermatozoides e, conseqüentemente, a fertilidade dessa espécie. Para Hafez e Hafez (2004), o comportamento da espermatogênese e o armazenamento dos espermatozoides no epidídimo são idênticos em todas as espécies de mamíferos. Castellini *et al.* (2002) descreveram que a suplementação de 150 mg de selênio/kg de ração seria adequada para coelhos machos, visto que ajudaria a aumentar a estabilidade oxidativa do sêmen. Andreazzi (2002) encontrou, em coelhos suplementados com diferentes fontes de óleos vegetais, motilidade espermática de 49% independentemente do tratamento, e ressaltou que a motilidade se constitui em um fator importante para a determinação da qualidade do sêmen, porque apresenta uma relação direta com a fertilização após a cobertura ou inseminação, fato tratado pela autora no trabalho de transferência de embriões, o que leva a deduzir que as melhoras observadas aqui também

possam resultar em aumento de fertilidade.

Os tratamentos com 450 mg de SeM/kg de ração e 0 mg de VC/kg de ração apresentaram o menor valor numérico para a motilidade espermática (15%), mas não houve diferenças significativas (Figura 2). Esse fato pode sugerir que a VC é importante para haver boa motilidade espermática, levando em consideração que a ausência gerou a pior motilidade, fatos destacados por Ciereszko e Dabrowski (1995) e Castellini *et al.* (2002). Pode-se supor que a VC melhore o ambiente epididimário, local de amadurecimento dos espermatozoides, e isto ser importante para aumentar a motilidade progressiva.

O vigor espermático médio (VI) observado situou-se em 3,3 pontos, que correspondem aos tratamentos com 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração (Figura 3), não apresentando diferenças e interações ($p > 0,05$) entre os tratamentos; esse resultado, nesse nível de suplementação, também foi encontrado na motilidade espermática, o que vem destacar a importância desses elementos na qualidade do sêmen, podendo-se inferir que tais níveis seriam os melhores para que o epidídimo dos coelhos apresente melhor ambiente para os espermatozoides. Os tratamentos com 450 mg de SeM/kg de ração e 0 mg de VC/kg de ração apresentaram o pior vigor espermático (1,4 pontos), assim como na motilidade espermática, reforçando os achados de Ciereszko e Dabrowski (1995) e Castellini *et al.* (2002), que verificaram melhora da motilidade progressiva e vigor espermático dos espermatozoides pela adição de VC e Se na alimentação. Assim, pode-se inferir que a VC é importante, juntamente com o SeM, para manter boas características seminais. Alvarino (1998) afirmou que um bom sêmen de coelho deve apresentar vigor espermático superior a 3 pontos. Scapinello *et al.* (1997) encontraram um vigor espermático em torno de 3 pontos em coelhos machos alimentados com diferentes níveis de metionina+cistina, valores esses próximos do encontrado nesta pesquisa, sugerindo que o valor de 3,3 pontos encontrado está de acordo com os autores e apresenta-se dentro um valor bom para coelhos.

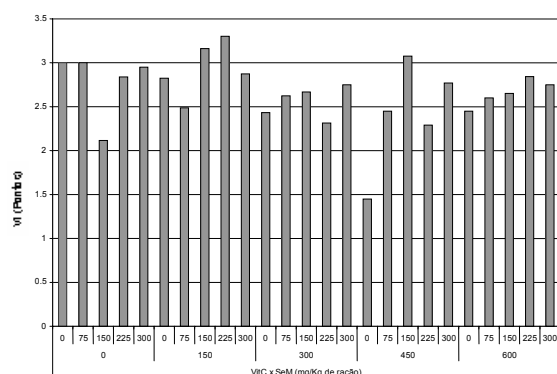


Figura 3. Diferentes níveis de Vitamina C X Selenomethionina (Vit C X SeM - mg/kg de ração) sobre o vigor espermático (VI, escore 0 - 5) em sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

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

A concentração espermática (CON) observada neste estudo teve um ponto mínimo em 356 mg de SeM/kg de ração ($p < 0,05$), o que correspondeu à pior concentração (276688) espermatozoides/mm³ (Figura 4). Nos tratamentos com vitamina C, observou-se um aumento ($p < 0,05$) da concentração espermática à medida que aumentou o nível de vitamina C aos tratamentos. O ponto máximo encontrado foi em 300 mg de VC/kg de ração, em que a concentração espermática atingiu 354513 espermatozoides/mm³ (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Quando os tratamentos foram associados, foi encontrado o melhor tratamento em 150 mg de SeM/kg de ração e 225 mg de VC/kg de ração, nos quais a concentração espermática atingiu 420000 espermatozoides/mm³, apesar de não ocorrer interação entre os tratamentos. Esses valores médios estão acima dos limites normais para coelhos, que segundo Mies Filho (1987), é de 200000 espermatozoides/mm³. Scapinello *et al.* (1997) encontraram uma concentração espermática média de 251500 espermatozoides/mm³ em coelhos suplementados com metionina+cistina. Outra vez foi encontrado, nesse nível de inclusão de SeM e VC (150 mg/kg e 225 mg/kg de ração, respectivamente), um melhor resultado com relação à concentração espermática, confirmando que esse nível de inclusão provavelmente seria o ideal para coelhos.

Os resultados da cor do sêmen combinados com a concentração espermática observada, podem ser ressaltados como o melhor tratamento o uso de 300 mg de VC/kg de ração. Esses resultados estão parcialmente de acordo com os encontrados por Sonmez *et al.* (2005) ao trabalharem com ratos Wistar, não tendo observado efeito da vitamina C sobre a motilidade progressiva, mas verificaram melhora na concentração de espermatozoides. No entanto, os autores não observaram diferenças entre 250 e 500 mg de VC/kg animal/dia, administrada na água de beber, provavelmente porque o aproveitamento da vitamina C administrado na água seria mais difícil de controlar o consumo dentro dos tratamentos. Nesse nível, com 300 mg de VC/ kg de ração, a cor aproximou-se do escore branco leitoso (escore 1) que representa a normalidade, haja vista que, à medida que o aspecto se apresentou mais aquoso, normalmente a concentração de espermatozoides foi mais baixa (Scapinello *et al.*, 1997).

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

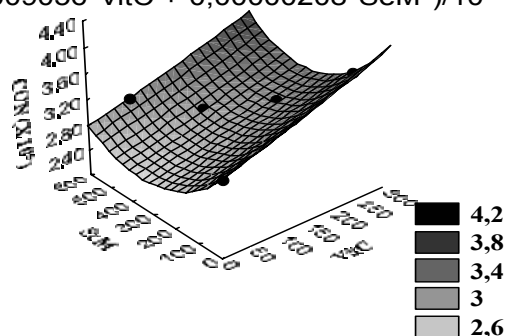


Figura 4. Diferentes níveis de selenometionina (mg de SeM/kg de ração) e vitamina C (mg Vit C/kg de ração) sobre a concentração espermática (CON X 10⁵) em coelhos Nova Zelândia Branco com seis meses de idade.

Figure 4. Different selenomethionine (mg SeM/kg of ration) and vitamin C (mg Vit C/kg of ration) levels on spermatic concentration (CON X 10⁵) in New Zealand White rabbits with six months of age.

O consumo de ração determinado no final do experimento foi influenciado ($p < 0,05$) pelos tratamentos com vitamina C (Figura 5), elevando-se à medida que aumentou a adição de vitamina C, atingindo o ponto máximo com 300 mg de VC/kg de ração (11,32 kg ração/animal) em 103 dias de experimento. Esse resultado está de acordo com o relatado por Salem *et al.* (2001), os quais demonstraram que a suplementação de ácido ascórbico estimula o ganho de peso. Como o metabolismo envolve a atividade de tireóide na produção de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), das adrenais na produção de glicocorticóides, da atividade hepática e do pâncreas, pode-se inferir que a VC contribua para que esses órgãos melhorem de atividade e leve os animais a consumir mais rações, ou talvez tenha melhorado a palatabilidade, como foi encontrado por Lee e Dabrowski (2003) em *Perca flavescens*, havendo aumento do consumo de ração em tratamentos que foram adicionados a vitamina C.

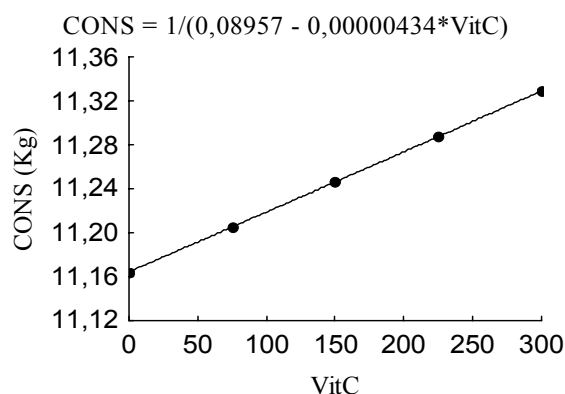


Figura 5. Diferentes níveis de vitamina C (mg de Vit C/kg de

ração) sobre o consumo de ração (CONS) dos coelhos Nova Zelândia Branco com idade de seis meses.

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

Conclusão

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

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Referências

- AEC – TABLES. *Recomendações para nutrição animal*. 5. ed. Antony Cedex: Rhône-Poulenc Animal Nutrition, 1987.
- AITKEN, R.J. *et al.* Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.*, Madison, v.40, p.183-197, 1989.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.*, New York, v. 23, p. 77-79, 1989.
- ALVARIÑO, J.R.M. *Inseminación artificial como base de la cunicultura industrial*. Leon: Overejo, 1998.
- ALVARIÑO, J.R.M. Reproductive performance of male rabbits. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 7, 2000, Valencia. *Proceedings...* Valencia: ACAF, 2000. p. 13-35.
- ANDREAZZI, M.A. *Avaliação reprodutiva de matrizes e coelhos reprodutores alimentados com ração, contendo diferentes fontes de óleos vegetais*. 2002. Tese (Doutorado em Zootecnia)–Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- BATTAGLINI, M. *et al.* Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Rabbit Res.*, v. 15, p. 439–446, 1992.
- CASTELLINI, C. *et al.* Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology*, New York, v. 58, p. 1723-1732, 2002.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in Rainbow Trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol. Reprod.*, Madison, v. 52, p. 982-988, 1995.
- DAWSON, E.B. *et al.* Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. *Fertil. Steril.*, New York, v. 58, p. 1034–1039, 1992.
- DONNELLY, E.T. *et al.* Antioxidant supplementation in

- vitro does not improve human sperm motility. *Fertil. Steril.*, New York, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.
- EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed.). *Physical activity, fitness and health*. Champaign, Illinois: Human Kinetics, p. 35-42, 1994.
- FRAGA, C.G. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 88, p. 11003-11006, 1991.
- FREI, B. et al. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 264, p. 155-163, 1990.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. R. Microsc. Soc.*, Oxford, v. 76, p. 84, 1957.
- HSU, P.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. *Toxicology*, Shannon, v. 128, p. 169-179, 1998.
- LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v. 89, p. 589-596, 2003.
- LUCK, M.R. et al. Minireview: ascorbic acid and fertility. *Biol. Reprod.*, Madison, v. 52, p. 262-266, 1995.
- LUZI, F. et al. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 6., 1996. Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p. 87-92.
- MARIN-GUZMAN, J. et al. Effect of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue response, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 75, p. 2994-3003, 1997.
- MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, v. 2, 1987.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. *J. Royal Stat. Soc. A*, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.
- POULOS, A. et al. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 46, p. 541-549, 1973.
- SALEM, M.H. et al. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B₁. *Toxicology*, Shannon, v. 162, p. 209-218, 2001.
- SCAPINELLO, C. et al. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos Nova Zelândia Branco. *Rev. Unimar*, Mairingá, v. 19, n. 3, p. 923-931, 1997.
- SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern. Med. Rev.*, v. 5, p. 28-38, 2000.
- SONMEZ, M. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, New York, (In Press), 2005.
- SORENSEN, J.R. *A laboratory manual for animal reproduction*. 4. ed. Boston: American Press, 1979.
- STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 6. disponível em: <www.statsoft.com> acessado em: 2003.
- THOMPSON, C.D.; STEWART, R.D.H. Metabolic studies of [⁷⁵Se] selenomethionine and [⁷⁵Se] selenite in the rat. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v. 30, p. 139-147, 1973.
- VIRAG, G.Y.; MÉZES, M. Glutathione-peroxidase activity of seminal plasma in rabbits. *Mag. Allatorv. Lap.*, v. 49, p. 296-297, 1994.
- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 118, p. 846-852, 1988.
- YOUSEF, M.I. et al. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 76, p. 99-111, 2003.
- YOUSEF, M.I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. *Toxicology*, Shannon, v. 207, p. 81-89, 2005.
- ZINI, A. et al. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.*, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.

Received on December 02, 2005.

Accepted on March 20, 2006.