

Suplementação de duas fontes de selênio em diferentes níveis na dieta de cachaços e seu efeito sobre a qualidade seminal

Supplementation of two sources of selenium at different levels in diet of boars and this effect on the seminal quality

Angelica de Paula Teixeira^{1*}, Daiane Gullich Donin¹, Sergio Rodrigo Fernandes², Bruna Naomy Zuffo¹, Ana Paula Backes¹, Alex Junior dos Santos Silva¹, André Luís Waltrich¹, Antonio Franciscus Kramer Nogueira¹, Geraldo Camilo Alberton¹

¹Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, Paraná, Brasil.

²Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

*Correspondente: angelica_mutti@hotmail.com

Resumo

A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, o que a torna sensível à ação de espécies reativas de oxigênio, que podem prejudicar a qualidade seminal dos cachaços. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de duas fontes de selênio em diferentes doses. Trinta e cinco cachaços foram distribuídos em quatro grupos: (INOR30) 0,30 ppm de selenito de sódio; (COMP30) 0,30 ppm de metal-aminoácido de selênio; (MISTO15+15) 0,15 ppm de selenito de sódio + 0,15 ppm de metal-aminoácido de selênio e (COMP15) 0,15 ppm de metal-aminoácido de selênio. Os ejaculados dos cachaços foram avaliados durante 22 semanas, resultando em 210 amostras avaliadas para volume, motilidade, pH, presença de aglutinação e alterações morfológicas, e 140 amostras para concentração espermática. Os dados foram analisados com medidas repetidas no tempo em modelo misto, em que o tipo de suplementação de selênio, os períodos de avaliação (um período de duas semanas + cinco períodos de quatro semanas) e suas interações foram os efeitos fixos, e o animal e o funcionário que coletou os ejaculados foram os efeitos aleatórios. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferença na suplementação de selênio com as fontes e doses utilizadas. Com isso, foi possível verificar que o metal-aminoácido de selênio na dose de 0,15 ppm promove o mesmo efeito das dietas formuladas com 0,30 ppm de selenito de sódio.

Palavras-chave: Antioxidante; Reprodutor suíno; Espermatozoide; Reprodução

Abstract

The spermatic membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, which makes it sensitive to the action of reactive species of oxygen, which can damage the seminal quality of the scraps. The purpose of this study was to evaluate the effect of the supplementation of two selenium sources at different doses. Thirty five scraps were allocated in four groups: (INOR30) 0.30 ppm sodium selenite; (COMP30) 0.30 ppm selenium metal-amino acid; (MIXED15+15) 0.15 ppm sodium selenite + 0.15 ppm selenium metal-amino acid and (COMP15) 0.15 ppm selenium metal-amino acid. The ejaculates of the scraps were evaluated over 22 weeks, resulting in 210 samples evaluated for volume, motility, pH, presence of agglutination and morphological changes, and 140 samples for spermatic concentration. The data was analyzed with repeated measures in time in a mixed model with type of selenium supplementation, periods of evaluation (one period of two weeks + five periods of four weeks) and their interactions as fixed effects, and animal and the worker that collected the ejaculates as random effects. Results showed no difference in selenium supplementation with the sources and doses used. In this way, it was possible to verify that the metal amino acid of selenium at the dose of 0.15 ppm promotes the same effect as the diets formulated with 0.30 ppm of sodium selenite.

Keywords: Antioxidant; Boar; Spermatozoid; Reproduction

Recebido: 28 de dezembro de 2021. Aceito: 28 de abril de 2022. Publicado: 31 de maio de 2022.



Introdução

A membrana que constitui o espermatozoide suíno é rica em ácidos graxos poliinsaturados, a qual é importante para manter a fluidez e flexibilidade espermática⁽¹⁾. Por outro lado, essa membrana lipídica torna a célula espermática sensível aos danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs)^(2,3). Cada vez mais estudos têm associado elevados níveis de EROs com problemas de infertilidade em homens^(4,5).

O selênio (Se) é um mineral traço na alimentação animal que faz parte da enzima glutathione peroxidase (GPx), potencializando sua atividade antioxidante⁽⁶⁾. A GPx faz parte do sistema de defesa das membranas, protegendo a integridade da célula espermática de danos oxidativos⁽³⁾. Além disso, o Se está envolvido, também, no desenvolvimento da peça intermediária e células de Sertoli⁽⁷⁾, influenciando a função testicular normal, estrutura da célula espermática e motilidade dos espermatozoides⁽⁸⁾.

A forma mais comum de suplementação do Se na nutrição de suínos é como selenito de sódio, mas seu aproveitamento é menor, uma vez que em sua forma oxidada ele pode se ligar a outros elementos, alterando sua absorção⁽⁹⁾, o que, conseqüentemente, aumenta a excreção desse mineral, principalmente pela urina⁽¹⁰⁾. Os minerais inorgânicos, após serem ingeridos, passam por decomposição no intestino antes de serem absorvidos, formando íons metálicos livres, os quais são muito reativos, podendo afetar sua biodisponibilidade⁽⁹⁾.

Para melhorar a absorção deste elemento e minimizar o impacto ambiental, utiliza-se o Se complexado com aminoácidos de alto valor biológico. Esses metais-aminoácidos utilizam normalmente as vias de absorção da molécula orgânica ao qual estão ligados, evitando que fatores físico-químicos interfiram na sua absorção, apresentando alta biodisponibilidade e sendo mais prontamente absorvidos⁽¹⁰⁾. Com isso, torna-se possível diminuir a dose necessária do mineral na dieta de reprodutores suínos.

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar diferentes níveis de inclusão de selênio na dieta e comparar o efeito do metal-aminoácido de selênio com o selenito de sódio na qualidade do sêmen de cachaaos.

Material e métodos

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná (CEUA/UFPR-Palotina) sob o protocolo de número 40/2016.

Animais

O experimento foi realizado em uma Central de Produção de Sêmen (CPS), localizada na região oeste do Paraná. Os cachaaos estavam alojados em baias individuais de concreto, com medidas de 2,0 m × 2,5 m, equipadas com comedouro de alvenaria e bebedouro do tipo chupeta. A idade dos cachaaos era de 1,73 ± 0,93 anos (média ± desvio padrão) quando foram selecionados. Estes animais eram provenientes de empresas de melhoramento genético e já haviam passado pelo treinamento no manequim, estando aptos a participarem do experimento.

A CPS tinha capacidade para alojar 50 machos. No período de estudo haviam 40 reprodutores que se enquadravam no perfil experimental, mas cinco deles tiveram que ser excluídos do estudo durante o período de adaptação a dieta, que durou dois meses.

Dieta e distribuição dos cachaaos

A dieta fornecida aos cachaaos foi formulada com base nos requerimentos nutricionais de machos em atividade reprodutiva¹¹, sendo isoproteicas e isoenergéticas, diferindo apenas quanto à fonte e o nível de inclusão do micromineral Se (Tabela 1). Os cachaaos eram tratados duas vezes ao dia, uma vez no período da manhã e outra à tarde. A quantidade de ração fornecida aos animais era de 2,5 kg/animal/dia, em média, mas podia variar conforme o score corporal do animal e idade, que eram avaliados pelo médico veterinário responsável pela CPS. A água era fornecida à vontade aos animais.

Seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), os cachaaos foram distribuídos em quatro grupos: INOR30 – dieta formulada com fonte de Se inorgânico (0,30 ppm de selenito de sódio), COMP30 – dieta com fonte de Se complexado com aminoácido (0,30 ppm de metal-aminoácido de Se), MISTO15+15 – dieta formulada com Se inorgânico e complexado (0,15 ppm de selenito de sódio + 0,15 ppm de metal-aminoácido de Se) e COMP15 – dieta formulada com baixo nível de Se complexado (0,15 ppm de metal-aminoácido de Se) (Tabela 1). A dose do metal-aminoácido na dieta foi definida de acordo com o NRC¹¹. Na fonte de Se na forma de metal-aminoácido, a metionina foi utilizada como aminoácido carreador.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas fornecidas aos cachacos

NUTRIENTES	Dieta			
	INOR30	COMP30	MISTO15+15	COMP15
ED contida na dieta (kcal/kg)	3100	3100	3100	3100
Proteína bruta (mín.) (g/kg)	5	5	5	5
Extrato etéreo (mín.) (g/kg)	30	30	30	30
Fibra bruta (máx.) (g/kg)	40	40	40	40
Matéria mineral (máx.) (g/kg)	80	80	80	80
Cálcio (g/kg)	8,0 – 10,0	8,0 – 10,0	8,0 – 10,0	8,0 – 10,0
Fósforo (mg/kg)	6000	6000	6000	6000
Sódio (mg/kg)	2400	2400	2400	2400
Cobre (mg/kg)	145	145	145	145
Cromo (mg/kg)	0,4	0,4	0,4	0,4
Iodo (mg/kg)	1,68	1,68	1,68	1,68
Ferro (mg/kg)	100	100	100	100
Manganês (mg/kg)	55	55	55	55
Selênio inorgânico (mg/kg)	30	0	0,15	0
Selênio Metionina (mg/kg)	0	30	0,15	0,15
<i>Bacillus subtilis</i> (UFC/kg)	16x10 ⁵	16x10 ⁵	16x10 ⁵	16x10 ⁵
<i>Bacillus licheniformis</i> (UFC/kg)	16x10 ⁵	16x10 ⁵	16x10 ⁵	16x10 ⁵
Colina (mg/kg)	1,6	1,6	1,6	1,6
Lisina (mg/kg)	8400	8400	8400	8400
Metionina (mg/kg)	4000	4000	4000	4000
Treonina (mg/kg)	6400	6400	6400	6400
Triptofano (mg/kg)	1750	1750	1750	1750
Valina (mg/kg)	5800	5800	5800	5800
Vitamina A (UI/kg)	20000	20000	20000	20000
Vitamina B1 (mg/kg)	2,67	2,67	2,67	2,67
Vitamina B3 (mg/kg)	26	26	26	26
Vitamina B5 (mg/kg)	17,44	17,44	17,44	17,44
Vitamina B7 (mg/kg)	1	1	1	1
Vitamina B9 (mg/kg)	2,39	2,39	2,39	2,39

Fonte: Adaptado da tabela fornecida pela CPS (2017).

Coleta de sêmen e avaliações

O período experimental teve duração de aproximadamente oito meses, sendo dois meses o período de adaptação e 22 semanas de coleta. Os cachacos passavam pela coleta de sêmen uma vez por semana, em média, mas esse intervalo algumas vezes foi menor devido à demanda da central por doses inseminantes, chegando a quatro dias de intervalo entre coletas.

A coleta do ejaculado total era realizada por funcionários treinados, utilizando a técnica da mão enluvada⁽¹²⁾. Anteriormente à coleta, os animais passavam pelo procedimento de higienização do prepúcio a seco e o esvaziamento do divertículo prepucial e, então, seguiam para a coleta no manequim. O ejaculado era filtrado para separar as frações líquida e gelatinosa do sêmen, e acondicionado no copo coletor térmico com água previamente aquecida a 37°C.

Após a coleta, o sêmen *in natura* era encaminhado imediatamente ao Laboratório da CPS para análise de volume, motilidade, pH e presença de aglutinação e, posteriormente, eram enviadas frações do sêmen para o

Laboratório de Reprodução de Suínos, pertencente à UFPR – Setor Palotina para as análises de concentração e morfologia dos espermatozoides. Para isso, uma alíquota do sêmen *in natura* era adicionada a solução formol-salina tamponado para análise de concentração e morfologia, na proporção de 1:100 (0,1 mL de sêmen *in natura* para 10 mL de solução) e 1:5 (0,1 mL de sêmen para 0,5 mL de solução), respectivamente. No total foram avaliados os ejaculados de 35 cachacos em atividade reprodutiva durante 22 semanas, resultando em 210 amostras avaliadas para volume, motilidade, pH, presença de aglutinação e alterações morfológicas, e 140 amostras para concentração espermática.

Análise da qualidade seminal

Volume

O volume do ejaculado foi mensurado pela pesagem da fração líquida do sêmen, no próprio copo coletor, desprezando-se o peso deste e, após a retirada do papel filtro, onde estava a fração gelatinosa do sêmen coletado. Se aceita que cada 1 mL de sêmen corresponde

a 1 g (grama)¹³. A mensuração do volume é importante para determinar o número total de espermatozoides no ejaculado.

Motilidade

A leitura foi realizada em microscópio binocular com objetiva de 10 X, utilizando-se uma gota de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C. A técnica era realizada pelo técnico do laboratório da CPS. Esse método avalia a quantidade total de espermatozoides móveis na amostra, classificando esse movimento em escore de 0 a 100%.

pH

O pH da amostra de sêmen foi mensurado com um pHmetro (mPA-210p), o qual era calibrado todos os dias antes das coletas.

Aglutinação

A presença de células espermáticas aglutinadas foi expressa em cruzes, sendo classificada de zero até três cruzes conforme a proporção de espermatozoides aglutinados, sendo zero a ausência de aglutinação e três a intensa aglutinação de espermatozoides.

Concentração

No laboratório da UFPR a concentração foi analisada através da câmara de Neubauer. Foi utilizado um microscópio de campo claro, na objetiva de 40 X, onde eram contados cinco quadrados de cada lado da câmara utilizando-se a metodologia do L invertido. A concentração de espermatozoides total da amostra, expressa em bilhões de células, foi calculada pela seguinte fórmula, descrita pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)⁽¹³⁾:

$$\frac{A}{\frac{1}{B} \times \frac{N}{25} \times \frac{1}{10}} = n^{\circ} \text{ de espermatozóides/mm}^3$$

Onde: A = número de espermatozoides contados; B = fator de diluição; N = número de quadrados contados; 1/10 = altura da câmara

Análise Morfológica

Foi utilizada a técnica de preparação úmida para avaliação das características morfológicas de cada amostra. Utilizou-se microscópio de contraste de fase, no aumento de 1000 X, em óleo de imersão. Uma gota da amostra pré-fixada, em solução formol-salina tamponada, foi colocada entre lâmina e lamínula, sendo feita a avaliação morfológica espermática de 200 células.

A classificação das anomalias encontradas foi expressa em percentagem. Foram avaliados os defeitos de

cabeça (pequena, gigante, periniforme e isolada), acrossoma, peça intermediária, cauda (dobrada, dobrada com gota, fortemente dobrada, quebrada e isolada), gota citoplasmática proximal e formas teratogênicas.

Análise estatística

Para a análise estatística as semanas de coletas foram agrupadas para se obter menores quantidades de medidas repetidas no tempo e possibilitar a visualização do comparativo das médias. Essa condensação das semanas levou em consideração que este exame normalmente é realizado nas centrais de forma periódica, obedecendo o menor período do ciclo espermático da espécie (35-60 dias)⁽¹⁴⁾. Foram analisadas as duas primeiras semanas em conjunto e, na sequência, foram agrupadas a cada quatro semanas, seguindo a ordem de coleta (Tabela 2).

Tabela 2. Períodos formados agrupando-se as semanas

Agrupamento	Período					
	1	2	3	4	5	6
Semanas	1 e 2	3 a 6	7 a 10	11 a 14	15 a 18	19 a 22

Os dados foram analisados com medidas repetidas no tempo em modelo misto (PROC MIXED) em que foram considerados os efeitos fixos de tipo de suplementação de selênio na ração (3 graus de liberdade – GL), períodos de avaliação (5 GL) e suas interações (15 GL). A idade dos animais foi incluída como covariável e as classes de *estimating breeding value* (EBV) como bloco no modelo, buscando-se controlar esses efeitos nas variáveis analisadas. Os efeitos aleatórios de animal e de funcionário que coletou os ejaculados foram considerados no modelo. A estrutura de erros mais adequada para cada variável foi definida de acordo com os critérios de informação de Akaike (AICc) e Bayesiano (BICc) corrigidos. As médias que apresentaram diferença significativa (P<0,05) para os efeitos fixos e suas interações foram comparadas pelo teste de Fischer (PROC LSMEANS). As análises foram realizadas no programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.0.

Resultados

As diferentes fontes e doses de Se utilizadas mostraram ter semelhante influência nas características seminais avaliadas, podendo-se verificar que o volume, motilidade, aglutinação celular, pH, concentração e dose espermática não diferiram entre os grupos que receberam selenito de sódio ou metal-aminoácido de selênio nas doses de 0,15 ppm ou 0,30 ppm (Tabela 3).

Tabela 3. Características do sêmen de cachaaos que receberam diferentes tipos de suplementação de selênio na raaõ

Variável ^a	Tratamentos ^b				EPM ^c	Valor P ^d		
	INOR30	COMP30	MISTO15+15	COMP15		Trat	Período	T × P
Vol	272,84	276,77	259,40	270,10	5,92	0,9810	<0,0001	0,1910
Motil	93,56	93,88	93,15	93,94	0,14	0,5602	<0,0001	0,6034
Aglut	1,50	1,50	1,31	1,33	0,07	0,8240	<0,0001	0,8163
pH	7,41	7,34	7,39	7,45	0,01	0,5291	<0,0001	0,1414
Conc	57,01	55,40	56,11	62,80	1,78	0,8863	<0,0001	0,9160
Doses	17,98	17,53	17,63	19,73	0,60	0,8969	<0,0001	0,8906

^aVol: volume (mL); Aglut: aglutinação celular; Motil: motilidade (%); Conc: concentração (x10⁹ spz/ejaculado); Doses: número de doses.

^bINOR30: dieta com fonte de Se inorgânico (0,30 ppm de selenito de sódio); COMP30: dieta com fonte de Se complexado com aminoácido (0,30 ppm de metal-aminoácido de Se); MISTO15+15: dieta com Se inorgânico e complexado (0,15 ppm de selenito de sódio + 0,15 ppm de metal-aminoácido de Se); COMP15: dieta com baixo nível de Se complexado (0,15 ppm de metal-aminoácido de Se).

^cEPM: erro padrão da média.

^dTrat: tipo de suplementação de selênio; T × P: interação entre tratamento e período.

Não houve interação entre tipo de suplementação de selênio (fontes e doses) e o período de consumo deste mineral nas características do sêmen dos cachaaos (Tabela 3). Por outro lado, houve efeito do período de suplementação na quantidade e na qualidade seminal dos cachaaos. O número de doses produzidas reduziu com o tempo, mesmo com o aumento da qualidade seminal ao longo das 22 semanas avaliadas, devido a redução da concentração espermática (Tabelas 4 e 6).

Na Tabela 4 é possível verificar que o volume variou durante o período observado, apresentado menor

volume (p<0,05) entre as semanas 7 e 10, e voltando a aumentar nas semanas subsequentes. Já a concentração espermática apresentou redução da celularidade a partir da 15^a semana de avaliação. A motilidade melhorou progressivamente, havendo diferença (p<0,05) a partir da sétima semana de avaliação comparada com as semanas anteriores. A presença de aglutinação nos ejaculados foi maior no decorrer do tempo, sendo observado aumento de mais de três vezes nos dois últimos períodos avaliados com relação à primeira observação. Já o pH das amostras variou no período experimental.

Tabela 4. Características do sêmen de cachaaos em relação ao tempo de suplementação de diferentes fontes e doses de selênio

Semanas	Variável ^a					
	Vol	Motil	Aglut	pH	Conc	Doses
1 e 2	277,24 ^{ab}	92,89 ^b	0,64 ^d	7,35 ^d	-	-
3 a 6	270,10 ^{ab}	92,46 ^b	0,89 ^{cd}	7,42 ^b	-	-
7 a 10	247,32 ^c	93,81 ^a	1,08 ^c	7,39 ^c	61,17 ^a	19,28 ^b
11 a 14	263,95 ^b	94,21 ^a	1,63 ^b	7,46 ^a	67,55 ^a	21,40 ^a
15 a 18	284,18 ^a	94,38 ^a	2,07 ^a	7,41 ^{bc}	49,29 ^b	15,53 ^c
19 a 22	275,88 ^{ab}	94,05 ^a	2,16 ^a	7,35 ^d	53,30 ^b	16,66 ^c

^aVol: volume (mL); Aglut: aglutinação celular; Motil: motilidade (%); Conc: concentração (x10⁹ spz/ejaculado); Doses: Número de doses.

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste F (p<0,05).

Os parâmetros morfológicos também não foram influenciados pelas diferentes fontes e níveis de suplementação de selênio, no entanto, houve efeito do período, como observado nas demais análises (Tabela 5). Ao avaliar os defeitos espermáticos isolados, é possível

verificar que a presença de gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda são as alterações encontradas em maior proporção, representando aproximadamente 20% dos defeitos morfológicos, como é observado no grupo MISTO15+15.

Tabela 5. Características morfológicas dos espermatozoides no sêmen de cachaaos que receberam diferentes tipos de suplementação de selênio na raaão

Variável ^a (%)	Tratamento ^b				EPM ^c	Valor P ^d		
	INOR30	COMP30	MISTO15+15	COMP15		Trat	Período	T × P
Normais	85,18	82,98	76,28	81,68	1,01	0,4748	<0,0001	0,1410
GCP	6,19	11,87	12,68	9,29	0,94	0,6903	0,0074	0,2843
DCd	6,25	2,32	6,64	6,42	0,34	0,2500	<0,0001	0,3133
DCb	0,97	1,48	2,68	1,76	0,20	0,2479	0,0071	0,4025
DAcr	0,36	0,63	0,14	0,16	0,04	0,4804	0,0007	0,3368
DPI	0,34	0,63	0,96	0,41	0,06	0,2427	0,0091	0,7136
Teratog	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01	0,9207	0,1478	0,8267

^aGCP: gota citoplasmática proximal; DCd: defeito de cauda; DCb: defeito de cabeça; DAcr: defeito de acrossoma; DPI: defeito de peça intermediária; Teratog: teratogenia.

^bINOR30: dieta com fonte de Se inorgânico (0,30 ppm de selenito de sódio); COMP30: dieta com fonte de Se complexoado com aminoácido (0,30 ppm de metal-aminoácido de Se); MISTO15+15: dieta com Se inorgânico e complexoado (0,15 ppm de selenito de sódio + 0,15 ppm de metal-aminoácido de Se); COMP15: dieta com baixo nível de Se complexoado (0,15 ppm de metal-aminoácido de Se).

^cEPM: erro padrão da média.

^dTrat: tipo de suplementação de selênio; T × P: interação entre tratamento e período.

Observando-se a evolução das alterações morfológicas ao longo das 22 semanas de estudo, é possível verificar melhora dos parâmetros avaliados. Na Tabela 6 é possível verificar que o índice de células espermáticas normais foi maior no último período avaliado, podendo-se notar menos defeitos de cauda,

cabeça, acrossoma e peça intermediária, principalmente a partir do terceiro mês de análise, referente ao quinto mês de suplementação dos cachaaos. Apenas o índice de presença de gota citoplasmática proximal (GCP) piorou no período avaliado.

Tabela 6. Características morfológicas dos espermatozoides no sêmen de cachaaos em relação ao tempo de suplementação de diferentes fontes e doses de selênio

Semanas	Variável ^a (%)						
	Normais	GCP	DCd	DCb	DAcr	DPI	Teratog
1 e 2	78,59 ^d	8,50 ^b	7,16 ^a	3,73 ^a	0,62 ^a	0,99 ^a	0,00
3 a 6	83,16 ^{ab}	9,52 ^{ab}	4,70 ^{bc}	1,36 ^{bc}	0,33 ^b	0,45 ^b	0,03
7 a 10	80,14 ^{cd}	10,97 ^a	5,62 ^b	1,71 ^b	0,33 ^b	0,75 ^a	0,03
11 a 14	81,71 ^{bc}	10,24 ^a	5,53 ^b	1,50 ^{bc}	0,22 ^{cd}	0,44 ^b	0,03
15 a 18	81,33 ^{bc}	10,69 ^a	5,91 ^{ab}	1,09 ^{bc}	0,14 ^d	0,41 ^b	0,02
19 a 22	84,27 ^a	10,13 ^a	3,51 ^c	0,97 ^c	0,28 ^{bc}	0,46 ^b	0,04

^aGCP: gota citoplasmática proximal; DCd: defeito de cauda; DCb: defeito de cabeça; DAcr: defeito de acrossoma; DPI: defeito de peça intermediária; Teratog: teratogenia.

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste F (p<0,05).

Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos resultados encontrados no trabalho de Lovercamp et al.⁽¹⁵⁾, em que a suplementação da dieta de suínos com diferentes fontes de Se não teve efeito na qualidade do sêmen. Por outro lado, foi possível demonstrar que metade da dose do Se complexoado com aminoácido (0,15 ppm) proporcionou o mesmo efeito que a dose normalmente utilizada de selenito de sódio (0,30 ppm), corroborando com vários estudos que apontam que o aproveitamento da fonte orgânica é maior

quando comparada a fonte inorgânica, devido a maior biodisponibilidade dos minerais orgânicos^(9, 10, 16, 17).

A ligação coordenada e iônica, gerada pelos ligantes do aminoácido, torna o mineral “protegido”, evitando que fatores físico-químicos interfiram na sua absorção. Quando absorvidos, os aminoácidos passam diretamente para o plasma através das células da mucosa intestinal carreando consigo o mineral, que permanece ligado ao aminoácido^(10,18, 19). Com isso, os metais-aminoácidos tornam-se mais biodisponíveis e bioativos^(10,17), possibilitando a sua inclusão na dieta em

níveis mais baixos que os minerais inorgânicos, sem comprometer o desempenho animal e, ainda, minimizando o impacto ambiental devido a menor excreção desse composto no ambiente⁽¹⁷⁾. Isso corrobora a última publicação de Rostagno et al.⁽²⁰⁾, que sugere que o Se inorgânico seja incluído na ração de cachacos na dose de 0,40 ppm, enquanto o Se complexado a fonte orgânica tenha sua inclusão reduzida para 0,18 ppm, demonstrando a menor necessidade de Se proveniente de fonte orgânica.

O volume e a concentração espermática são as análises realizadas com maior frequência dentro das CPS, uma vez que estes são os parâmetros utilizados para o cálculo das doses inseminantes. A maturidade do cachaco tem influência sobre esses parâmetros: enquanto o volume total do ejaculado aumenta, a concentração diminui com o avançar da idade⁽²¹⁾. Segundo Smital⁽²¹⁾, que avaliou mais de 230 mil registros de coletas de ejaculado, a produção de células espermáticas varia conforme a idade e raça do reprodutor, aumentando consideravelmente nos primeiros três anos de vida do cachaco, podendo chegar à produtividade máxima aos 3,5 anos e declinando após essa idade. O autor demonstrou ainda que a recuperação dos parâmetros seminais está relacionada à intensidade sexual do cachaco, sendo necessário de 5 a 7 dias para reestabelecer o volume total do ejaculado e até 11 dias para o completo restabelecimento da concentração espermática. O presente experimento foi realizado com animais relativamente jovens, com média de idade próxima de 2 anos ao iniciar o estudo, por isso, esperava-se que a concentração aumentasse, ao contrário do que foi observado, em que o número de espermatozoides declinou ao longo das 22 semanas avaliadas. Esse resultado pode sugerir que os cachacos estavam em intensa atividade sexual, não havendo tempo suficiente para a recuperação total da concentração espermática.

Os valores do volume do ejaculado suíno podem variar entre 125 a 500 mL de acordo com a raça, idade e frequência de coleta⁽²²⁾. O volume médio obtido neste estudo foi de 250 mL e, apesar de ter variado no período, ele se manteve dentro do considerado normal para a espécie. O mesmo ocorreu com o pH dos ejaculados, que variou no período experimental mas se manteve dentro do normal para a espécie, que é levemente alcalino, variando de 7,3 a 7,9⁽¹³⁾.

A presença da aglutinação no ejaculado suíno é relativamente comum, sendo observado em quase toda amostra examinada, podendo ser induzida pela presença de células espermáticas mortas ou epiteliais, contaminação bacteriana ou resfriamento rápido. A aglutinação pode ser visualizada pela união das cabeças dos espermatozoides já no momento em que é feita a avaliação da motilidade espermática⁽²²⁾. No presente estudo verificou-se aumento gradativo da presença de

aglutinação, que coincide com o aumento da presença de gotas citoplasmáticas nas amostras, podendo este ter sido um fator predisponente para a situação, mas não foram encontrados relatos na literatura correlacionando estas variáveis.

A motilidade espermática observada ficou acima de 90%, estando dentro do aceitável pelo CBRA⁽¹³⁾, que sugere que o ejaculado deve apresentar percentual mínimo de 70% de espermatozoides móveis. Foi possível observar melhora da motilidade espermática ao longo das 22 semanas de avaliação, resultando em incremento de 1,16% na média observada entre o último e o primeiro período de avaliação. Petrujkic et al.⁽²³⁾ observaram aumento da motilidade e melhora na taxa de fertilidade dos cachacos quando estes foram alimentados com Se complexado a uma fonte orgânica. Além disso, no estudo de Moslemi e Tavanbakhsh⁽⁸⁾, a suplementação de Se e vitamina E em pacientes humanos subférteis aumentou a motilidade espermática, que foi a principal variável correlacionada com a fertilidade, observando-se, inclusive, casos em que a administração oral desses dois antioxidantes resultaram em fertilização.

Na avaliação das alterações morfológicas esperase que a quantidade de células anormais não ultrapasse 20% do total de células avaliadas⁽¹³⁾, estando o grupo MISTO15+15 um pouco abaixo do esperado (76,28%), mas não diferindo dos demais grupos estatisticamente.

Ao avaliar os defeitos espermáticos isolados, é possível verificar que apenas a presença de GCP aumentou ao decorrer do tempo, ao passo que os demais defeitos reduziram. A média encontrada para presença de GCP ficou no limite de aceitação para a espécie suína, que é de até 10% de defeitos dessa ordem⁽¹³⁾, chegando à média de 12,68% no grupo MISTO15+15.

A presença e a localização da gota citoplasmática (GC) reflete o estágio de maturação do espermatozoide e pode acarretar problemas na fertilidade, gerando prejuízos à produção⁽²⁴⁾. A gota citoplasmática distal (GCD) normalmente é destacada da cauda do espermatozoide no momento da ejaculação, podendo ser resultado da baixa frequência de coleta, enquanto a presença de GCP é observada em machos jovens ou reprodutores adultos em alta atividade sexual, ou ainda, em casos patológicos⁽²²⁾. No trabalho realizado por Marin-Guzman et al.⁽⁷⁾, sugere-se que o Se acelera a maturidade dos espermatozoides no epidídimo e pode reduzir o número de células espermáticas com GC, ao contrário do que foi observado nesse estudo, em que o índice de espermatozoides com GCP aumentou com o passar do tempo.

O presente estudo avaliou apenas a GCP como defeito morfológico, enquanto a GCD foi contabilizada junto com as células espermáticas normais, conforme orientação no manual do CBRA⁽¹³⁾. Essa orientação se deve ao fato da GCD não ser considerada como defeito,

portanto, não causaria prejuízos reprodutivos⁽¹³⁾. Por outro lado, no trabalho realizado por Gaggini et al.⁽²⁴⁾, observou-se que a presença de GCD tem influência sobre a motilidade espermática, prejudicando a fertilidade do reprodutor. Com isso, os valores de presença de GC nos ejaculados avaliados seria ainda maior, se fosse somado a presença de GCD.

Avaliando-se os defeitos de cauda foi possível observar que o grupo suplementado com 0,30 ppm de metal-aminoácido de Se (COMP30) apresentou quase três vezes menos defeitos de cauda (2,32%) comparado aos demais grupos (média de 6,44%). Apesar disso, não diferiu estatisticamente, o que pode ser devido ao alto desvio padrão dos dados analisados, que foi de 4,78 e 6,70 pontos percentuais (para mais ou para menos) na média. Mesmo assim, esse resultado pode indicar que o Se na forma complexada teve maior potencial protetor para a célula contra danos oxidativos, já que a membrana lipídica, que constitui os espermatozoides, é rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais precisam de um sistema antioxidante para manter sua integridade^(25, 26).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, independentemente da fonte utilizada, a demanda por Se parece ter sido atendida para manter a qualidade seminal. Em outras espécies, tem-se avaliado a relação do Se na qualidade seminal de machos com baixa fertilidade^(27,28). Porém, na produção de suínos, reprodutores que tenham parâmetros de baixa fertilidade são imediatamente excluídos como reprodutores, por isso, não foram encontrados estudos que avaliem a influência da suplementação deste mineral na melhora deste parâmetro em cachaaos. Esta pode ser uma linha de pesquisa a ser estabelecida, uma vez que os reprodutores suínos tem alto impacto na produção, e que dietas com Se orgânico aumentam a capacidade antioxidante do sêmen, mas não tem influenciado a qualidade seminal, como demonstrado por Martins et al.⁽²⁹⁾. Provavelmente, isso ocorre por não haver desafios dessa ordem que necessitem do aumento da inclusão de Se na dieta.

Conclusão

A inclusão de metade da dose de selênio complexado com a metionina produz o mesmo efeito na qualidade seminal de cachaaos comparado a dieta com selenito de sódio na dose recomendada pelas tabelas nutricionais para reprodutores suínos.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

Conceituação: A. Teixeira, D. G. Donin, A. F. K. Nogueira, G. C. Alberton; *Curadoria dos dados:* A. Teixeira, S. R. Fernandes; *Análise formal:* S. R. Fernandes; *Aquisição de*

financiamento: A. F. K. Nogueira; *Investigação:* A. Teixeira, B. Zuffo, A. P. Backes, A. J. S. Silva, A. L. Waltrich; *Metodologia:* D. G. Donin, G. C. Alberton, A. F. K. Nogueira; *Gerenciamento do projeto:* A. Teixeira, D. G. Donin; *Recursos:* A. Teixeira, A. F. K. Nogueira; *Supervisão:* G. C. Alberton, D. G. Donin; *Validação:* D. G. Donin, G. C. Alberton, S. R. Fernandes, A. F. K. Nogueira; *Visualização:* A. Teixeira, D. G. Donin, D. G. Donin, S. R. Fernandes; *Redação:* A. Teixeira, D. G. Donin, D. G. Donin, S. R. Fernandes.

Referências

1. Surai, PF. Selenium in Nutrition and Health. Nottingham University Press. 2006. 279-974.
2. Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005 Oct;6(5):495-501. <https://doi.org/10.2174/138920005774330594>
3. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006 May;250(1-2):70-79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027>
4. Türk S, Mändar R, Mahlapuu R, Viitak A, Punab M, Kullisaar T. Male infertility: decreased levels of selenium, zinc and antioxidants. *J Trace Elem Med Biol.* 2014 Apr;28(2):179-185. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.12.005>
5. Agarwal A, Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011 Mar;109(3):184-7. PMID: 22010591.
6. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973 Feb 9;179(4073):588-90. <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588>
7. Marin-Guzman J, Mahan DC, Whitmoyer R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J Anim Sci.* 2000 Jun;78(6):1544-50. <https://doi.org/10.2527/2000.7861544x>
8. Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int J Gen Med.* 2011 Jan 23;4:99-104. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S16275>
9. Power R, Horgan K. Biological chemistry and absorption of inorganic and organic trace metals. *Biotechnology in the Feed Industry*, Nottingham University Press, Nottingham, UK., p. 277-291, 2000.
10. Mahan DC, Parrett NA. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *J Anim Sci.* 1996 Dec;74(12):2967-74. <https://doi.org/10.2527/1996.74122967x>
11. Nutrient requirements of swine (NRC). 11. ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 2012. 400 p.
12. Hancock, JL. Pig insemination technique. *Veterinary Record*, 1959;71:523-527.
13. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 87p.
14. Bortolozzo FP, Wentz I, Ferreira FM et al. Exame do ejaculado. In: Bortolozzo, F.P.; Wentz, I.; Bennemann, P.E. et al. Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Palotti. 2005. cap. 7, p. 69-89. Portuguese.

15. Lovercamp KW, Stewart KR, Lin X, Flowers WL. Effect of dietary selenium on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 2013 May;138(3-4):268-75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.016>
16. Todd SE, Thomas DG, Bosch G, Hendriks WH. Selenium status in adult cats and dogs fed high levels of dietary inorganic and organic selenium. *J Anim Sci.* 2012 Aug;90(8):2549-55. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-3911>
17. Close, WH. Trace mineral nutrition of pigs revisited: meeting production and environmental objectives. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia.* 2003;14:133-142. Disponível em <http://livestocklibrary.com.au/handle/1234/19980>
18. Kratzer FH, & Vohra P. *Chelates in Nutrition.* 1st ed. CRC Press. 2016. <https://doi.org/10.1201/9781351070508>
19. Surai P, Fisinin V. Selenium in Pig Nutrition and Reproduction: Boars and Semen Quality — A Review. *Anim Biosci.* 2015;28(5):730-746. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0593>
20. Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Teixeira ML, Rodrigues PB, Oliveira RF, Barreto SLT, Brito CO. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.* 4th ed. Viçosa: UFV; 2017. 488p. Portuguese.
21. Smital J. Effects influencing boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2009 Feb;110(3-4):335-46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.024>
22. Bennemann, PE. (2014). Técnicas de avaliação, contagem, processamento, diluição e envase do sêmen suíno. In: Associação Brasileira De Criadores De Suínos (ABCS). *Produção de Suínos: Teoria e Prática.* 1. ed. Brasília, DF, 2014. p. 334-348. Portuguese.
23. Petrujkic BT, Sefer DS, Jovanovic M et al. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. *Animal Feed Science and Technology.* 2014;197:194-205. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.001>
24. Gaggini TS, Barbosa H, Beletti ME et al. Alta ocorrência de gota citoplasmática distal altera parâmetros relacionados ao movimento espermático de reprodutores suínos. *Archives of Veterinary Science.* 2018;23(4):44-50. <https://doi.org/10.5380/avs.v23i4.54725>
25. Surai PF. Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2?. In: Lyons TP, Jacques KA (Eds) *Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industries.* Nottingham University, UK. 2003. p. 59-76. English.
26. Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2009;33(4):183-193. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1010812/1/Marciane7.pdf>
27. Taghizadeh L, Eidi A, Mortazavi P, Rohani AH. Effect of selenium on testicular damage induced by varicocele in adult male Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2017 Dec;44:177-185. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.08.003>
28. Türk S, Mändar R, Mahlapuu R, Viitak A, Punab M, Kullisaar T. Male infertility: decreased levels of selenium, zinc and antioxidants. *J Trace Elem Med Biol.* 2014 Apr;28(2):179-185. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.12.005>
29. S.M.M.K. Martins, A.F.C. De Andrade, F.G. Zaffalon, L.J. Parazzi, F.F. Bressan, S.M.P. Pugine, M.P. Melo, M.R. Chiaratti, C.T. Marino, E.R. Afonso, A.S. Moretti, R.P. Arruda, Organic selenium increases PHGPx, but does not affect quality sperm in raw boar semen. *Livestock Science.* 2014 Jun;164:175-178. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.02.018>