

10.4322/rbcv.2017.030

Efeito da suplementação oral de selênio e tocoferol sobre a membrana plasmática espermática em touros da raça Brangus*

Effect of oral supplementation of selenium and tocopherol on the spermatic plasma membrane in Brangus bulls

Fernando Augusto Paes de Barros Arguello,** Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis,** Joanis Tilemahos Zervoudakis,** Moacir Ferreira Duarte Júnior,** Pedro Paulo Tsuneda,** Walter Augusto dos Santos Marinho,** Luis Eduardo Senra e Silva,** Juliana de Oliveira Moraes,*** Eleonora Araújo Barbosa****

Resumo

Objetivou-se com o estudo avaliar o efeito da suplementação dietética com selênio e tocoferol sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e criopreservado em reprodutores bovinos da raça Brangus. Foi avaliado o sêmen de 17 animais que foram divididos em grupo controle (GC) e grupo suplementados por via oral com 400 UI Tocoferol e 0,45 mg Selênio (GS). Os dados foram analisados através da Anova com nível de 5% de significância. Foi observado efeito significativo da suplementação sobre a integridade de membrana plasmática no sêmen fresco (GC 26,70% vs GS 35,71%; $p=0.0164$) e sêmen criopreservado (GC 8,74% vs GS 11,36%; $p=0,0213$). A suplementação, com selênio e tocoferol, promoveu efeito positivo sobre a integridade da membrana espermática dos animais da raça Brangus.

Palavras Chave: antioxidantes; *Bos taurus*; espermatozoide, reprodução.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effect of selenium and tocopherol dietary supplementation on the integrity and viability of the plasma membrane of fresh and cryopreserved semen of Brangus bulls ($n=17$). Semen samples were randomly divided in two groups: Control (GC) and bulls receiving oral supplementation with 400 IU of tocopherol and 0.45 mg of selenium (GS). Data were analyzed through one-way ANOVA. A probability level of $P < 0.05$ was considered significant. Dietary supplementation presented a positive effect on plasma membrane integrity of fresh (GC 26.70% vs GS 35.71%, $P = 0.0164$) and cryopreserved sperm cells (GC 8.74% vs GS 11.36%, $P = 0.0213$). Thus, oral supplementation with tocopherol and selenium, promoted a positive effect on Brangus bulls sperm membrane integrity.

Keywords: antioxidants; *Bos taurus*; spermatozoa; reproduction

Introdução

A eficiência reprodutiva de um rebanho é influenciada diretamente pelo manejo e ambiente. Dentre os fatores ambientais que afetam a reprodução de bovinos, a nutrição é o de maior impacto. Alguns autores atribuem sua importância a algumas vitaminas e minerais por participarem do sistema antioxidante protegendo as células do estresse oxidativo e de danos de membrana e DNA (Lúcio et al., 2016).

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas ao oxigênio (EROs) no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento na geração de espécies oxidantes (Halliwell, 1991). O estresse oxidativo tem sido identificado como uma das causas da infertilidade masculina, pois pode provocar severos danos aos espermatozoides (Sikka, 1996), além da redução na qualidade do sêmen criopreservado (Potts et al., 2000).

A membrana plasmática do espermatozoide é composta por 70% de fosfolipídeos, 25% de lipídeos neutros e 5% de glicolipídeos (Flesch e Gadella, 2000). Tal composição tornam as células espermáticas suscetíveis aos danos causados pela peroxidação lipídica. Essa vulnerabilidade é aumentada principalmente após a criopreservação, pois é responsável por alterações na integridade da membrana, diminuição da motilidade e capacidade de fertilização (Asadpour et al., 2011).

Para prevenir ou reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo, o organismo possui diversos mecanismos de defesa antioxidante, como o Tocoferol (vitamina E) e o Selênio que participam da estrutura ou como co-fatores de enzimas antioxidantes (Bansal e Bilaspuri, 2011).

O tocoferol é um antioxidante lipossolúvel e representa a principal defesa contra a lesão oxidativa das membranas celulares, sendo um eficiente inibidor da peroxidação lipídica (Duarte Júnior et al.,

*Recebido em 23 de junho de 2017 e aceito em 10 de dezembro de 2017.

**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso- UFMT, Cuiabá-MT.

***Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Mato Grosso-UFMT, Cuiabá-MT.

****Programa de Pós-graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília-UNB, Brasília-DF.

Autor para correspondência: pedrotsuneda@hotmail.com

2015). O selênio tem suas funções metabólicas associadas à captação de radicais livres e modulação do estresse oxidativo, funcionando como co-fator da glutatona peroxidase, enzima que evita a lesão dos componentes celulares pelos peróxidos (Petrujkic et al., 2014).

O uso de antioxidantes no meio diluente tem sido estudado a fim de minimizar os danos oxidativos causados pela criopreservação, no entanto os resultados são controversos e na maioria das vezes não melhoraram os parâmetros espermáticos. (Asadpour et al., 2011; Duarte Júnior et al., 2015).

A utilização do tocoferol associado ao selênio para ruminantes pode ser uma alternativa na redução do estresse oxidativo e tem sido relatado para a espécie ovina, onde verificou-se que a administração venosa de vitamina E associada ao selênio melhorou características de motilidade, vigor, concentração, redução de anormalidades e melhoria na viabilidade espermática em comparação ao grupo placebo ou o grupo que recebeu injeção somente com vitamina E (Ali et al., 2009).

Apesar de discutida a ação isolada do Selênio e do Tocoferol sobre a reprodução animal, a ação conjunta desses nutrientes fornecida via suplemento alimentar apresenta poucos e controversos resultados para espécie bovina.

Sendo assim, objetivou-se com o trabalho avaliar o efeito da suplementação oral com Selênio e Tocoferol sobre a integridade da membrana espermática e qualidade do sêmen fresco e criopreservado de touros jovens da raça Brangus.

Material e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Sereno – GAP, localizada no município de Jaciara, Mato Grosso, de Junho a Setembro. O clima da região é tropical quente e úmido, com duas estações bem definidas, verão chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). A temperatura média anual é 28°C e a pluviosidade média anual de 2000 mm (IBGE, 2013).

Foram utilizados 17 touros da raça Brangus, com média de 24 meses de idade e peso vivo médio de 454 kg. Antes do experimento, os animais foram vermifugados (Doramectina, Dectomax® Pfizer Saúde Animal) e tratados com ectoparasiticida (Cipermetrina + Ethion, Ciperthion®, Shering-Plough). Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle (GC) – Sem suplementação constituído por 9 animais; Grupo Suplementado (GS) – Suplementados com uma associação de Tocoferol e Selênio, constituído por 8 animais.

Todos os animais receberam suplemento concentrado fornecidos 1 vez ao dia, de modo a receber 4,5 kg por animal, formulado para ganho de peso de 1 kg/peso vivo/dia.

Cada grupo foi mantido separado em piquetes de 7,35 ha de área, formados por gramínea *Panicum maximum* cv. Mombaça com disponibilidade de 3.015 kg de matéria seca/ha e água *ad libitum*.

Os animais foram suplementados durante 60 dias e foram feitas quatro coletas de dados sendo: antes do início da suplementação (coleta 1), com 30 dias de suplementação (coleta 2), com 60 dias de suplementação (coleta 3) e 15 dias após o término da suplementação (coleta 4). Antes do período de suplementação, os animais passaram por um período de adaptação ao suplemento de 10 dias. Os animais do grupo suplementado

receberam Tocoferol (α -tocoferol, Agrocric Nutrição Animal, Anápolis-Go) e Selênio (selenito de sódio, Agrocric Nutrição Animal, Anápolis-Go) adicionados ao concentrado, de modo a fornecer 400 UI de Tocoferol/animal/dia e 0,1mg de selênio/kg de MS do suplemento.

Antes de cada coleta de sêmen foram mensuradas a consistência testicular (CONST) por meio de palpação em escala de um a cinco, onde, 1 é muito flácido e 5 é muito firme (CBRA, 2013) e circunferência escrotal (CE) com fita métrica na região mediana dos testículos (Reichenbach et al., 2008). Para obtenção dos ejaculados, empregou-se o método de eletroejaculação (Eletrovot®, Eletro Veterinária Ltda, Valinhos-SP), com os touros devidamente contidos em tronco apropriado. Para coleta dos ejaculados, foi utilizado tubo graduado previamente aquecido a 37°C.

O volume do ejaculado (VOL) foi aferido diretamente no tubo coletor graduado em mL. As análises microscópicas foram motilidade (MOT), vigor (VIG), os quais foram realizadas imediatamente após a coleta (CBRA, 2013), utilizando uma alíquota de 10 μ L colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C para avaliação da motilidade espermática (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de zero a cinco) em aumento de 100 e 400x.

Para a avaliação da morfologia espermática, foi utilizada a técnica de câmara úmida, analisada em microscópio de contraste de fases (Alphaphot, Nikkon®, Tóquio) com aumento de 1000x em imersão (Barth e Oko, 1989), sendo as alterações morfológicas classificadas em defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT). Foi realizada também avaliação da concentração espermática (CONC) em câmara de Neubauer (CBRA, 2013).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática foram feitas as análises de coloração de eosina-nigrosina (EOS) (WHO, 1992), sendo células com membrana plasmática corada classificadas como não íntegras, bem como teste de expansão hiposmótico (HIPO) (Jeyendran et al., 1984), onde as células com cauda enrolada foram consideradas com membrana intacta. Já a integridade de membrana acrossomal foi avaliada por coloração acrossomal simples (fast green/rosa bengala) (Pope et al., 1991) em todos eles foram contadas 200 células.

O sêmen foi diluído no meio tris-frutose-ácido cítrico contendo: TRIS (hidroximetil-amino metano), ácido cítrico, frutose, água destilada q.s.p., 4% de glicerol, gema de ovo, penicilina e estreptomicina, na concentração de 25×10^6 espermatozoides viáveis por mL, sendo então envasados em palhetas de 0,5 mL. As palhetas foram dispostas horizontalmente na rampa de resfriamento sendo levadas a caixa térmica de 45 litros (40 cm x 35 cm x 30 cm) previamente equilibrada na temperatura interna de 4°C, e mantidas por 4 horas.

Após o período de estabilização, as palhetas foram colocadas horizontalmente a 5 cm acima do nível de nitrogênio líquido (N²) em caixa de isopor de 40 litros, contendo 4,0 cm de N², foram mantidas em vapor de N² (-120°C) por quinze minutos e depois foram criopreservadas por imersão direta (Papa et al., 2008).

O descongelamento foi realizado colocando a palheta em banho-maria a 37°C por 30 segundos (Reichenbach et al., 2008) e o sêmen foi transferido para tubo de 1,5 ml, previamente aquecido, para então ser avaliado. As análises no pós congelamento foram as mesmas feitas com sêmen fresco, exceto concentração e morfologia espermática.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, sendo cada animal considerado como unidade experimental e cada uma das coletas de sêmen foi considerada como uma medida repetida no tempo. Os dados foram analisados através da ANOVA com um nível de significância de 5% utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 2001).

Resultados e discussão

Não foi verificado efeito do tratamento, da coleta e da interação para consistência testicular, volume do ejaculado, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais ($p>0,05$) (Tabela 1).

Analisando as médias separadamente por coleta, não foi verificado efeito ($p>0,05$) da suplementação sobre a motilidade espermática, vigor e integridade de membrana plasmática pela coloração de eosina-nigrosina tanto para o sêmen fresco como para o sêmen criopreservado (Tabela 2).

Tabela 3: Detalhamento dos valores encontrados para a variável integridade de membrana plasmática (HIPO %) analisados separadamente por coleta

	Fresco			Congelado		
	Controle	Vit E + Se	P	Controle	Vit E + Se	P
Coleta 1	43,79±6,98 a	31,83±7,59	0,2792	10,80±4,14	9,97±2,01	0,8739
Coleta 2	17,18±3,68 b	27,65±3,64	0,0626	11,05±2,68	8,26±1,30	0,3879
Coleta 3	34,77±4,67ab	46,59±5,30	0,1171	6,91±1,75	10,53±3,36	0,3264
Coleta 4	28,89±4,59ab	33,76±3,81	0,4377	8,41±3,27	15,29±6,05	0,3624
P	0.0077	0.0693		0.7091	0.5868	

Tabela 1: Médias observadas das diversas características avaliadas nos animais da raça Brangus nos grupos não suplementado (GC) e suplementado com tocoferol e selênio (GS)

Variáveis	GC	GS	P
Cons	3,19± 0,017	3,03± 0,07	0,0834
Vol (mL)	6,43± 0,76	5,61± 0,46	0,5333
Defma (%)	9,45± 1,60	9,47± 1,24	0,9074
Defme (%)	4,33± 0,62	4,84± 0,76	0,4150
Deftot (%)	13,79± 1,70	14,32± 1,57	0,8692

Consistência testicular (Cons); Volume do ejaculado (Vol); Concentração espermática (Conc); Defeitos maiores (Defma); Defeitos menores (Defme); Defeitos Totais (Deftot).

A coleta 1 foi realizada com o intuito de “esgotar” o sêmen dos animais, o fornecimento do Tocoferol associado ao selênio começou nesse momento. Após 30 dias da suplementação foi realizada a coleta 2 e observou-se que a redução na integridade de membrana ocorreu tanto no GC como no GS, fato esperado devido a chegada do período seco e queda na qualidade da forragem, porém, observou-se que o GS teve menos danos de membrana em relação ao GC e que a queda na funcionalidade das membranas plasmáticas espermáticas do GC apresentou diferença estatística (Tabela 3).

A diferença na porcentagem de decréscimo de células espermáticas funcionais também foi observada na coleta 3 onde se completou 60 dias da suplementação com a associação do Tocoferol e do selênio. Nesse momento, retirou-se a associação de Tocoferol e selênio da dieta do GS, ou seja, após a coleta

Tabela 2: Médias observadas das diversas características avaliadas separadamente por coleta dos animais da raça Brangus nos grupos não suplementado (GC) e suplementado com tocoferol e selênio (GS).

SEMEN FRESCO												
VARIÁVEIS	1ª COLETA			2ª COLETA			3ª COLETA			4ª COLETA		
	GC	GS	P									
MOT	53,33±6,50	53,33±6,79	0,9226	56,11±6,96	63,12±5,25	0,4921	61,66±4,63	60,62±4,37	0,8267	66,66±2,78	59,16±3,51	0,1396
VIG	2,77±0,22	2,50±0,22	0,3759	2,88±0,11	2,62±0,18	0,2251	2,55±0,17	2,75±0,25	0,2849	2,66±0,21	2,33±0,21	0,2897
EOS	78,42±2,22	75,84±2,85	0,4976	71,63±4,46	77,88±3,81	0,3197	80,66±2,13	77,12±4,30	0,5073	80,05±1,55	84,13±3,53	0,2554
SEMEN CRIOPRESERVADO												
VARIÁVEIS	1ª COLETA			2ª COLETA			3ª COLETA			4ª COLETA		
	GC	GS	P									
MOT	6,25±0,81	5,00±1,29	0,4082	24,44±6,20	30,62±8,04	0,5741	17,77±4,93	26,87±6,87	0,2917	2,50±1,11	7,50±2,81	0,1297
VIG	1,37±0,18	1,33±0,33	0,9087	2,55±0,37	2,50±0,26	0,9081	2,44±0,17	2,62±0,26	0,5687	0,66±0,33	1,00±0,25	0,4475
EOS	88,47±2,90	90,28±2,91	0,6743	77,57±3,25	80,15±2,67	0,5564	78,87±3,00	80,92±8,66	0,8183	72,64±5,21	67,56±6,04	0,5390

3 todos os animais passaram a consumir o suplemento do GC. Esse manejo foi realizado com o intuito de identificar o efeito residual da associação de Tocoferol e selênio da dieta e observou-se que o GS apresentou um decréscimo na porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática funcional, indicando que após 15 dias da retirada da suplementação com selênio e Tocoferol a funcionalidade das membranas plasmáticas espermáticas dos Touros do GS diminuiu.

Analisando os dados das quatro coletas de forma conjunta não verificou-se efeito da suplementação ($p>0,05$) sobre a motilidade espermática, vigor e integridade de membrana plasmática pela coloração de eosina-nigrosina tanto para o sêmen fresco como para o sêmen criopreservado.

Entretanto, quando se analisou a funcionalidade de membrana plasmática espermática por meio do teste de expansão hiposmótico nas quatro coletas de forma conjunta, encontrou-se maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra no grupo suplementado em comparação ao controle no sêmen fresco ($p=0,0164$) e criopreservado ($p=0,0213$) (Tabela 4).

Quando se leva em consideração o fornecimento da vitamina E associada ao selênio durante 60 dias, esta provavelmente foi incorporada à membrana plasmática durante a espermatogênese minimizando os danos na integridade de membrana dos espermatozoides no sêmen fresco e criopreservado, já que o tocoferol atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular (Tvrdá et al., 2013) e o selênio age como componente da glutathione peroxidase, importante para a manutenção da integridade estrutural do espermatozoide (Goes et al., 2011).

Tabela 4: Média e nível de significância observadas das diversas características avaliadas nos animais da raça Brangus nos grupos não suplementado (GC) e suplementado com tocoferol e selênio (GS)

Sêmen Fresco			
Variáveis	GC	GS	P
Mot (%)	60,83±3,20	61,13±2,56	0,7531
Vig (0-5)	2,70±0,09	2,59±0,12	0,4585
Eos (%)	77,12±2,02	79,31±2,28	0,3287
Hipo (%)	26,70±2,89	35,71±2,98	0,0164
Sêmen Criopreservado			
Variáveis	GC	GS	P
Mot (%)	16,45±3,38	22,95±4,29	0,3639
Vig (0-5)	2,04±0,23	2,13±0,21	0,9536
Eos (%)	76,83±2,07	76,99±3,73	0,3294
Hipo (%)	8,74±1,41	11,36±2,32	0,0213

Motilidade (Mot); Vigor (Vig); Eosina-nigrosina (Eos); Teste de expansão hiposmótico (Hipo).

No experimento o delineamento utilizado foi o inteiramente causalizado (DIC), a variação entre os animais do grupo GC e do GS foi a suplementação com 400 UI de Tocoferol/animal/dia e 0,1mg de selênio/kg de MS do suplemento para os animais do GS e a diferença estatística encontrada para a variável HIPO tanto no sêmen fresco como no sêmen criopreservado pode estar diretamente ligada a essa suplementação.

A diferença encontrada entre a variável motilidade (porcentagem de células móveis) e a porcentagem de células com a membrana plasmática funcional (Hipo), tanto no sêmen fresco como criopreservado (Tabela 4), pode ser explicada pelo fato de que o espermatozoide mesmo com uma pequena lesão de membrana plasmática pode apresentar motilidade, porém com prejuízos a atividade bioquímica nos processos de capacitação espermática, hiperativação e reação acrossomal, interferindo diretamente na fertilização (Jeyendran et al., 1984).

A média de células com membrana íntegra pelo teste hiposmótico (30,94% para sêmen fresco e 9,97% para congelado) encontrado no presente trabalho ficou aproximadamente 50% abaixo da média de motilidade (60,97% para sêmen fresco e 19,50% para congelado), provavelmente porque uma parte dos espermatozoides sofreu lesão na membrana plasmática que não foi suficiente para provocar a perda de motilidade.

Amann & Grahan (1993), comentam que a condição de estresse oxidativo induz um rearranjo dos lipídeos da bicamada, podendo formar pontos vulneráveis que possibilitam uma excessiva permeabilidade ou até mesmo micro lesões sem que ocorra a morte da célula espermática.

Baixos coeficientes de correlação entre teste hiposmótico e motilidade foram encontrados no sêmen de caprinos (Oliveira et al., 2013), equinos (Snoeck et al., 2007) e cães (Inamassu et al., 1999). A justificativa é a de especificidade do teste hiposmótico, pois as formações do edema nas células espermáticas demonstram a integridade da função da membrana plasmática, enquanto a motilidade depende não somente do transporte de substâncias que atravessam as membranas, mas também de outras funções bioquímicas independentes, e mesmo com uma lesão da membrana ainda pode haver o metabolismo espermático e a ação microtubular das fibras da região da cauda do espermatozoide pode estar ativa, causando a movimentação.

Moslemi e Tavanbakhsh (2011) relatam correlação positiva entre o nível de selênio no plasma seminal com maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e ao analisar as coletas de forma conjunta para a variável hiposmótico (Tabela 4), essa associação pode ter influenciado diretamente na minimização dos danos oxidativos, diminuindo a agressão das espécies reativas ao oxigênio à membrana plasmática dos espermatozoides do grupo suplementado via oral com 400 UI de Tocoferol/animal/dia e 0,1mg de selênio/kg de MS do suplemento.

Conclusão

A suplementação com selênio e vitamina E nas condições estudadas auxiliou na proteção dos espermatozoides, melhorando a funcionalidade da membrana plasmática no sêmen fresco e minimizando os danos causados na membrana plasmática pela criopreservação.

Referências

- ALI, A.B.T.; BOMBOI, G.; FLORIS, B. Does vitamin e or vitamin e plus selenium improve reproductive performance of rams during hot weather? *Italian Journal of Animal Science*, v. 8, 743-754, 2009.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Sperm function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 735-736, 1993.
- ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Influence of added vitamin c and vitamin e on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and tris based extenders. *Veterinary Research Forum*, v. 1, p. 37-44, 2011.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa, 1ª ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1989. 285 p.
- BRITO, M.M.; LÚCIO, C.F.; ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C.I. Comparison of cryopreservation protocols (single and two-steps) and thawing (fast and slow) for canine sperm. *Animal Biotechnology*, v. 28, p. 67-73, 2017.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed. Belo Horizonte, 2013, 103 p.
- DUARTE JÚNIOR, M.F.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; NICHI, M.; BERTOLLA, R.P.; TSUNEDA, P.P.; SILVA, L.E.S.; WINGERT, F.M.; MARINHO, W.A.S. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* (impresso), v. 22, p. 114-118, 2015.
- FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems. *American Journal of Medicine*, v. 91, n. 3, p. 145-149, 1991.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da Produção Pecuária. 47p. 2017.
- INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 302-304, 1999.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- LÚCIO, C.F.; REGAZZI, F.M.; SILVA, L.C.G.; ANGRIMANI, D.S.R.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C.I. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dog. *Theriogenology*, v. 85, p. 1568-1575, 2016.
- MOSLEMI, M.K.; TAVANBAKSH, S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *International Journal of General Medicine*, v. 4, p. 99-104, 2011.
- OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; BEZERRA, A.C.D.S.; SILVA, A.R. Correlação entre teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 2, p. 216-221, 2013.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR. J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 101-111, 2008.
- PETRUJKIC, B.T.; SEFER, D.S.; JOVANOVIĆ, I.B.; JOVICIN, M.; JANKOVIC, S.; JAKOVLJEVIC, G.; BEIER, R.C.; ANDERSON, R.C. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. *Animal Feed Science and Technology*, v. 197, p. 194-205, 2014.
- POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
- POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutation Research*, v. 447, p. 249-256, 2000.
- REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.C.F.; NEVES, J.P. Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos, p. 57-82. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2ª ed., São Paulo: Editora Roca, 2008.
- SAS. The statistical analyse system for windows: version 8. Cary, 1999-2001. CD-Rom.
- SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 78-86, 1996.
- SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós descongelamento em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 56-64, 2007.
- TVRDÁ, E.; LUKÁČ, N.; LUKÁČOVÁ, J.; KNAZICHÁ, Z.; MASSÁNYI, P. Stimulating and protective effects of vitamin e on bovine spermatozoa. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 1, p. 1386- 1395, 2013.
- WHO World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.