**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros
suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes**

Monique Mendes Guardieiro

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2013**

Monique Mendes Guardieiro
Médica Veterinária

**Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros
suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO SARTORI
FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Guardieiro, Monique Mendes

Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes / Monique Mendes Guardieiro.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 97 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Dieta 2. Ácidos graxos 3. Antioxidantes 4. Congelação 5. Sêmen I. Título

CDD 636.291
G267v

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

A toda minha família e principalmente aos meus pais **Leida Márcia Mendes Guardieiro** e **Marlus Guardieiro** e minha irmã **Natália Mendes Guardieiro**, a quem devo tudo que sou.... Meu muito obrigada!

Ofereço

Ao meu namorado, **Renato Shinkai Gentil**, que me auxiliou e orientou na execução do presente experimento e sempre está ao meu lado em todas as nossas decisões pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens e aos professores do Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico e acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processos 2010/00586-7 e 2010/15054-0), pela concessão de bolsas de estudo e por auxílio à pesquisa.

Ao Dr. Roberto Sartori Filho, pela oportunidade concedida para orientação desde o estágio curricular, pela amizade, ensinamentos, dedicação e confiança em meu trabalho. Obrigada por permitir meu crescimento profissional e fazer parte de sua equipe durante todos estes anos.

À professora Ivanete Susin, aos alunos e funcionários do SIPOC que sempre foram atenciosos e colaboraram imensamente na condução do experimento. Obrigada pela convivência agradável.

Aos professores Jo Leroy e Peter Bols e aos pós-graduandos e funcionários da Universidade da Antuérpia, Bélgica, por me receberem de forma tão “brasileira” e pela amizade e colaboração científica.

Ao professor Flávio Portela e seus alunos, Paraíba e Consolo, pela colaboração na formulação das dietas experimentais e ensinamentos transmitidos,

Ao professor Gerson Barreto Mourão pela disposição, pelos conselhos profissionais e colaboração nas análises estatísticas.

Ao professor Alexandre Vaz Pires, pelos ensinamentos e por disponibilizar o laboratório para realização do experimento.

Aos alunos e estagiário da pós-graduação da ESALQ que me ajudaram na realização da parte experimental laboratorial e a campo e encararam o experimento como se fosse deles, Fernanda Lavínia, Pedro Monteiro, Renato Shinkai, Anibal Nascimento, Alexandre Prata, Wilton Arruda, Nádia Ferreira, Gressa Chinelato, Daniel, Pirulão e Rabicó. Obrigada pelo auxílio no fornecimento de mais de 100 dias de trato aos animais, pelas horas de trator e “casales” enchidas; às inúmeras noites em claro, congelando sêmen; às mais de 300 colheitas e processamento do sêmen e às soluções e reparos de imprevistos. Sem vocês não seria possível executá-lo.

Aos pós-graduandos do laboratório de Reprodução da ESALQ por todos estes anos de convivência, Marcão, Delci, Marquinho, Fernanda Zinsly, Amanda, Ricardo, Alexandre, Pedro, Anibal, Leonardo, Louise, Jéssica e Guilherme.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, por atenderem meus pedidos e ajudarem no manejo dos animais, bem como pela agradável convivência, em especial: Laureano, Pomba, Primo, Seu Barba, Juscelino, Emerson, Marcos, Joseval, Roberto, Adílson, Daiane, Dona Ilda e Seu Hélio.

Ao José Carvalho, Juliana Borges, Dra. Margot e Frederico Martins por transmitirem suas experiências profissionais.

Ao prof. Evandro Maia Ferreira que sempre esteve à disposição a ensinar e pelo auxílio imprescindível na análise do perfil de ácidos graxos.

Ao Leandro Rodello, Cláudia Monteiro e ao professor Sony Bicudo, pela ajuda imprescindível nas análises do sêmen pós-descongelamento por CASA e citometria de fluxo. Obrigada por não medirem esforços e obrigada pela amizade e colaboração científica.

Ao Marcílio, Diego e Cláudia da FMVZ-USP pelo auxílio técnico-científico nas análises seminais. Obrigada por fazerem parte deste trabalho.

Ao professor Marcelo Beletti e aluna Lays por se dedicarem e colaborarem nas análises laboratoriais.

Ao laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ, em especial Gustavo, Aurea e professor Coutinho que sempre atenderam nossos pedidos.

Ao laboratório de Bromatologia da ESALQ, em especial ao Prof. Nússio e ao César, por nos disponibilizarem o uso de equipamentos e reagentes para execução do experimento.

À professora Eunice Oba da FMVZ, UNESP, que sempre disponibilizou seu laboratório para análises hormonais.

Ao professor Marco Alvarenga, pelo empréstimo da máquina de congelamento.

Ao professor Severino Matias de Alencar do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ, por disponibilizar seu laboratório para centrifugação.

À Arm & Harmer, Tk, Alltech que auxiliaram na execução do projeto por meio da doação de produtos, empréstimos de equipamentos e auxílio financeiro à pesquisa científica.

À minha família, por me apoiar e entender minha ausência. Amo vocês.

À família Shinkai Gentil por me acolher e apoiar. Obrigada por fazer parte da família de vocês.

Enfim, a todos, que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
2.1 Peroxidação lipídica nos espermatozoides e criopreservação do sêmen.....	17
2.2 Antioxidantes e espermatozoides	19
2.3 Ácidos graxos poliinsaturados e espermatozoides	21
2.4 Ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes adicionados ao diluente	23
2.5 Ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes adicionados à dieta	24
2.6 Hipótese	28
2.7 OBJETIVOS	28
2.7.1 Objetivos gerais	28
2.7.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais e local	29
3.2 Dietas experimentais.....	29
3.3 Peso e perímetro escrotal.....	33
3.4 Cronograma de amostragens	34
3.5 Avaliações do sêmen fresco	35
3.5.1 Análise da atividade da glutathione peroxidase no plasma seminal.....	36
3.6 Congelação do sêmen	36
3.7 Avaliações espermáticas do sêmen pós-descongelação	37
3.7.1 Análise computadorizada da cinética espermática	37
3.7.2 Análise espermática da integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez da membrana plasmática e potencial mitocondrial por citometria de fluxo.....	38
3.7.3 Análise da peroxidação lipídica.....	40
3.8 Parâmetros sanguíneos	41
3.9 Delineamento experimental e análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Quantidades circulantes de selênio e ácidos graxos	43
4.2 Peso corporal e consumo de matéria seca	46
4.3 Perímetro escrotal	48
4.4 Atividade da glutathione peroxidase no plasma seminal e plasma sanguíneo	50
4.5 Avaliações do sêmen fresco	54

4.6 Avaliações espermáticas do sêmen pós-descongelção	65
4.6.1 Análise da peroxidação lipídica.....	65
4.6.2 Análise computadorizada da cinética espermática	68
4.6.3 Análise espermática da integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez da membrana plasmática e potencial mitocondrial por citometria de fluxo.....	75
5 CONCLUSÃO.....	83
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	85
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes

A criopreservação de sêmen é de fundamental importância para a expansão das técnicas reprodutivas como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*, entretanto é responsável pelo estresse oxidativo da célula espermática. Para incrementar a sobrevivência celular após a congelação, a membrana plasmática deve ter adequada fluidez que é garantida pelos ácidos graxos poliinsaturados e suporte de defesa antioxidante para proteger contra a peroxidação lipídica. No intuito de tornar os espermatozoides mais resistentes à criopreservação, 48 touros da raça Nelore foram confinados (três animais por baia) e designados a quatro tratamentos de acordo com a adição de gordura protegida da degradação ruminal e/ou antioxidantes à dieta. Aos primeiros 30 dias, todos os touros receberam a mesma dieta de adaptação (bagaço de cana, polpa cítrica, farelo de glúten de milho, ureia e sal mineral). Posteriormente, durante 75 dias, a mesma dieta foi oferecida, diferindo na adição de: G) Gordura protegida da degradação ruminal (rica em ácido linoleico, Megalac-E[®], 1,5% na MS; n = 12); A) antioxidante (fonte de vitamina C e selênio, EconomasE[®], 3g/cabeça/dia; n = 12; GA), Megalac-E[®] e EconomasE[®] (n = 12) ou C) controle (n = 12). Colheitas e congelação de sêmen foram realizadas aos 0, 15, 30, 45, 55, 65 e 75 dias. Os dados foram analisados como medidas repetidas pelo Glimmix do SAS. O peso corporal e o perímetro escrotal não diferiram entre os tratamentos (P = 0,37). A atividade da glutathione peroxidase no plasma sanguíneo e seminal foi maior para as dietas contendo antioxidantes, especialmente aos 75 dias. O volume, turbilhonamento, vigor, porcentagem de cabeças aglutinadas do sêmen fresco, foram similares entre os grupos. Entretanto, dietas contendo gordura reduziram o número total de espermatozoides (P = 0,07) e a porcentagem de espermatozoides normais (P = 0,09). A peroxidação lipídica e a cinética espermática do sêmen descongelado foram similares entre as dietas experimentais. Por outro lado, dietas não contendo gordura aumentaram a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática (MP) íntegra e membrana acrossomal (MA) não reagida ($62,2 \pm 2,87$ vs $53,3 \pm 2,87\%$; P < 0,05). Além disso, dietas sem antioxidantes provocaram aumento no número de células espermáticas com MP lesada e MA reagida. Aos 65 dias de suplementação, espermatozoides de touros alimentados com dietas com gordura apresentaram maior estabilidade da MP, em relação aos outros tratamentos ($60,4 \pm 2,62$ vs $52,7 \pm 2,62\%$; P = 0,05), porém, aumentou o número de espermatozoides mortos (P = 0,10). O potencial mitocondrial espermático não foi afetado pelos tratamentos. Conclui-se que, apesar da viabilidade espermática pré-congelação não ter sido afetada pelas dietas experimentais, efeito benéfico aos espermatozoides após criopreservação foi encontrado quando suplementou-se touros com dietas contendo antioxidantes, em relação a dietas contendo gordura.

Palavras-chave: Dieta; Ácidos graxos; Antioxidantes; Congelamento; Sêmen

ABSTRACT

Pre- and post-cryopreservation semen viability in bulls supplemented with protected fat and/or antioxidants

Cryopreservation of semen is of fundamental importance to the expansion of reproductive techniques such as artificial insemination, embryo transfer and in vitro fertilization, however, it is responsible for the oxidative stress of the sperm cell. To enhance cell survival after freezing, the plasma membrane has to have sufficient fluidity that is guaranteed by polyunsaturated fatty acids and antioxidant defense to protect against lipid peroxidation. In order to make the sperm more resistant to cryopreservation, 48 Nelore bulls were confined (three animals per pen) and assigned to four treatments according to the addition of rumen protected fat and/or antioxidants to the diet. During 30 days, all bulls were fed the same adaptation diet (sugar cane bagasse, citrus pulp, corn gluten meal, urea and mineral salt). Thereafter, for 75 days, the same diet was offered, differing in the addition of: F) fat protected from rumen degradation (rich in linoleic acid; Megalac-E®, 1.5% DM, n = 12); A) Antioxidant (a source of vitamin C and selenium, EconomasE®, 3g/head/day, n = 12); FA) Megalac-E® and EconomasE® (n = 12); or C) control group (n = 12). Semen collection and freezing were performed seven times: 0, 15, 30, 45, 55, 65 and 75 days of offering experimental diet period. Data were analyzed by repeated measures of GLIMMIX of SAS. Body weight and scrotal circumference did not differ between treatments (P = 0.37). The glutathione peroxidase activity in blood and seminal plasma was higher for diets containing antioxidants, especially at 75 days. The volume, mass motility, vigor, numbers of agglutinated spermatozoa in fresh semen were similar between groups. However, fat-containing diets reduced the total number of sperm (P = 0.07) and the percentage of normal spermatozoa (P = 0.09). Lipid peroxidation and the kinetics of thawed sperm were similar among diets. Moreover, diets not containing fat increased the percentage of intact sperm plasma membrane (PM) and unreacted acrosomal membrane (62.2 ± 2.87 vs $53.3 \pm 2.87\%$, P < 0.05). In addition, diets without antioxidants caused an increase in the number of sperm cells with damaged PM and with Induction of sperm acrosome reaction. After 65 days of supplementation, sperm of bulls fed diets with fat had higher stability of the PM, compared to other treatments (60.4 ± 2.62 vs. $52.7 \pm 2.62\%$, P = 0.05), however there was an increase the number of dead sperm (P = 0.10). The mitochondrial potential of spermatozoa was not affected by treatments. It is concluded that despite the fact that the pre-freezing sperm viability was not affected by the experimental diets, beneficial effect to the sperm cells after cryopreservation was found when bulls were supplemented with diets containing antioxidants, compared to diets containing fat.

Keywords: Diet; Fatty acids; Antioxidants; Freezing; Semen

1 INTRODUÇÃO

Acima de 10% das matrizes do rebanho bovino brasileiro foram inseminadas, em 2012. Este fato representa a utilização de um total de 12.340.321 doses, sendo que a maior proporção foi de produção nacional (53,3 %) em relação às importadas (46,7%). Do total de sêmen comercializado, a maioria foi de origem de touros de corte (60,3%), com expressividade da raça Nelore em 41,1%, dentre as raças de corte (Associação Brasileira de Inseminação Artificial, ASBIA, 2012).

Durante a congelação do sêmen, a célula espermática perde água e posteriormente, ao se realizar a descongelação ela deve se hidratar e possuir viabilidade suficiente para ser capaz de fecundar. Entretanto, ainda a qualidade do sêmen bovino pós-criopreservação é aquém da do sêmen fresco, especialmente do sêmen sexado e de sêmen com baixa congelabilidade. Desta forma, devem-se buscar estratégias para incrementar a resistência da célula espermática à congelação. Dentre estas, o fornecimento de dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados (AGP) e antioxidantes podem incrementar a fluidez da membrana plasmática e protegê-la contra o estresse oxidativo.

Por outro lado, há poucos estudos utilizando suplementação de gordura para machos da espécie bovina com o intuito de melhorar o desempenho reprodutivo. Porém, baseando em dados de embriões bovinos (NONOGAKI et al., 1994), os AGP aumentam a susceptibilidade das células à peroxidação lipídica. Deste modo, a suplementação com antioxidantes tem o potencial de proteger os espermatozoides bovinos contra o estresse oxidativo e, juntamente com os ácidos graxos que alteram a fluidez da membrana plasmática, auxiliar na melhoria de sua tolerância à criopreservação. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência da suplementação com gordura protegida da degradação ruminal (AGP n-6), antioxidantes na criotolerância do sêmen de bovinos, por meio da avaliação da qualidade funcional dos espermatozoides.

Desta forma, este experimento se torna inédito uma vez, que a maioria dos trabalhos que avaliou o efeito das dietas com gordura e/ou antioxidantes nas características seminais de ruminantes, utilizou fonte AGP n-3 e vitamina E, como antioxidante (DOLATPANAH et al., 2008; GHOLAMI et al., 2010). Além disso, há uma escassez de dados referentes à utilização destas dietas para incrementar a qualidade do sêmen pós-descongelação (ADEEL et al., 2009; GHOLAMI et al., 2010; SELVARAJU et al., 2012), particularmente em touros Nelore. Adicionalmente, o

presente estudo utiliza avaliações espermáticas de peroxidação lipídica e citometria de fluxo, as quais são inéditas no sêmen de touros sob estas dietas experimentais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peroxidação lipídica nos espermatozoides e criopreservação do sêmen

O oxigênio que é essencial para produção de energia na respiração aeróbica, pode também levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005), as quais são radicais livres que podem ser definidos como qualquer molécula que apresenta um ou mais elétrons não pareados, tais como ânion superóxido, radical hidroxila, radical hipoclorito e peróxido de hidrogênio (HENKEL, 2005; HSU et al., 1998) e possuem funções importantes na fisiologia espermática como na capacitação, hiperativação e fusão ovocitária (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005; AURICH et al., 1997; BROUWERS; GADELLA, 2003) e ligação à zona pelúcida (BROUWERS; GADELLA, 2003). Além disso, células espermáticas mortas, anormais e células fagocíticas presentes no ejaculado ou no trato reprodutivo feminino geram ERO. Antioxidantes como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase tem um papel importante na neutralização dos ERO (revisado por KASIMANICKAM et al., 2007).

Sob o sistema natural de monta, os espermatozoides são expostos a condições anaeróbicas, reduzindo o potencial de lesão causada pelas ERO. Além disso, o fluido do oviduto contém concentrações substanciais de taurina, um importante protetor das células contra o acúmulo de ERO. Por outro lado, quando os espermatozoides são usados na inseminação artificial (IA) e na congelação, eles são expostos ao oxigênio e radiação da luz visível durante o procedimento, o que pode levar à formação de ERO (FOOTE; BROCKETT; KAPROTH, 2002).

Desta forma, as ERO estão envolvidas em processos patológicos do sistema reprodutivo masculino, possuindo efeito deletério amplo, atingindo várias moléculas celulares (BROUWERS; GADELLA, 2003). Espermatozoides são sensíveis às ERO quando apresentam falha na defesa antioxidante e pelo fato da membrana plasmática conter grande quantidade de lipídios na forma de AGP, os quais são vulneráveis ao ataque das ERO, promovendo uma reação química denominada peroxidação lipídica (BROUWERS; GADELLA, 2003).

O estresse oxidativo é o principal agente etiológico do comprometimento da função espermática (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005; STRZEŻEK et al., 2004). O excesso de ERO no sêmen foi relacionado com baixa concentração e motilidade e alterações na morfologia espermática (AGARWAL; PRABAKARAN;

SAID, 2005). Touros que apresentaram menor peroxidação lipídica nos espermatozoides tiveram maiores chances de produzir descendentes (KASIMANICKAM et al., 2007).

A peroxidação lipídica induz alterações estruturais, particularmente na região do acrossoma da célula espermática, rápida e irreversível perda da motilidade; alterações no metabolismo e liberação de componentes intracelulares (BECONI; FRANCIA; MORA, 1993). Além disso, este processo influencia na compactação do DNA (EBISCH et al., 2007), causa deleções no DNA (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005; BROUWERS; GADELLA, 2003); altera a estabilidade e motilidade espermática (EBISCH et al., 2007) e a integridade da membrana plasmática (AURICH et al., 1997; BROUWERS; GADELLA, 2003); promove depleção de adenosina trifosfato e alteração mitocondrial (BROUWERS; GADELLA, 2003).

A criopreservação do sêmen contribui para expansão das técnicas reprodutivas como a IA, IATF, TETF e a fecundação *in vitro*. A IA com sêmen congelado é essencial na escolha do acasalamento, não necessitando de adaptação dos animais ao ambiente; no melhoramento genético; na preservação de espécies e raças raras bem como na exportação de germoplasma animal (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; CHAKRABARTY et al., 2007). Este processo constitui da redução de temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação (BARBAS; MASCARENHAS, 2009), entretanto causa alterações celulares que levam à diminuição da fertilidade do sêmen refletida em menores taxas de IA devido à menor sobrevivência espermática (NAIR et al., 2006).

As principais alterações relatadas são ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais, principalmente das membranas plasmática e acrossomal, mitocôndria e axonema devido à mudanças na temperatura e osmolaridade, durante o processo de criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987). Tais lesões comprometem o transporte e sobrevivência espermática no trato reprodutivo das fêmeas, resultando em redução da capacidade de fecundação e de fertilidade nas espécies domésticas (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; GADEA et al., 2008). Adicionalmente, a congelação e descongelação do sêmen propiciam a capacitação e a reação do acrossoma. Estas alterações podem afetar a motilidade, reduzirem a sobrevivência e a capacidade de fecundação, além de alterações metabólicas que em conjunto comprometem a fertilidade (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; WANG et al., 1997).

Espermatozoides congelados apresentam aumento do cálcio livre intracelular, típico de espermatozoides capacitados (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). A própria penetração do crioprotetor na célula causa um rearranjo dos lipídios e proteínas da membrana plasmática. Crioprotetores não penetrantes também podem alterar a membrana (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Além disso, as crioinjúrias podem interferir na estrutura da cromatina e originar alterações do DNA que afetam o desenvolvimento embrionário (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Estas alterações citadas são resultado da peroxidação da membrana lipídica dos espermatozoides acentuada pela capacidade antioxidante insuficiente do sêmen durante prolongado armazenamento (AURICH et al., 1997; BECONI; FRANCIA; MORA, 1993; STRZEŻEK et al., 2004) e pelo alto conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática (AURICH et al., 1997; FOOTE; BROCKETT; KAPROTH, 2002; STRZEŻEK et al., 2004).

O balanço entre produção ERO e sua detoxicação é um importante fator para sobrevivência e função espermática antes, durante e após a criopreservação. Bilodeau et al. (2000) verificaram que espermatozoides bovinos são pouco adaptados para metabolizar peróxido de hidrogênio, além de possuir, baixos níveis da enzima glutathione peroxidase e ausência de catalase. A criopreservação com diluente Tris-gema-glicerol diminui os níveis de antioxidantes espermáticos, tais como, glutathione em 78% e atividade da enzima superóxido dismutase, em 50% (BILODEAU et al., 2000). Além disso, a geração de ERO ocorre no diluente, independente da presença de células e durante os processos de congelação e descongelação (MAIA et al., 2010).

2.2 Antioxidantes e espermatozoides

O organismo desenvolve diversos mecanismos de defesa para protegê-lo de injúrias causadas pelas ERO. Os antioxidantes podem prevenir a ação das ERO por meio de proteínas ligadoras de metais que bloqueiam a formação de novas ERO bem como, remover aquelas prontamente formadas (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005). Por outro lado, a capacidade antioxidante intracelular dos espermatozoides também diminui, após processo de congelação-descongelação, assim o sêmen criopreservado é mais facilmente peroxidado do que o fresco (GADEA et al., 2004).

Pequenas moléculas antioxidantes, como vitamina E e vitamina C (ascorbato ou ácido ascórbico) são capazes de interagir diretamente com radicais oxidantes (HSU et

al., 1998). A vitamina E cessa a reação em cadeia da peroxidação lipídica nas biomembranas e lipoproteínas, enquanto a vitamina C remove da fase aquosa os radicais livres através da transferência rápida de elétrons, inibindo a peroxidação lipídica (CASTELLINI et al., 2000; HSU et al., 1998). Além disso, a vitamina C regenera a vitamina E através da redução do radical tocoferoxil (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005; CASTELLINI et al., 2000; DALVIT et al., 1998).

De fato, baixos níveis de ascorbato no sêmen de touros foram associados com baixo desempenho reprodutivo, menor contagem espermática, aumento no número de espermatozoides anormais, redução da motilidade e maior aglutinação de cabeças espermáticas (LUCK; JEYASEELAN; SCHOLE, 1995). O efeito positivo deste antioxidante pode ser resultado da destruição de radicais livres (LUCK; JEYASEELAN; SCHOLE, 1995). A vitamina C está presente no fluido extracelular e neutraliza os radicais hidroxil, superóxido e peróxido de hidrogênio e previne a aglutinação espermática (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005; HARRIS et al., 1979; LINDHOLMER, 1974). Deste modo, a fertilidade masculina pode ser incrementada pelo maior consumo de vitamina C (HARRIS et al., 1979; LINDHOLMER, 1974; LUCK; JEYASEELAN; SCHOLE, 1995).

Outro antioxidante importante relacionado à proteção espermática é a enzima glutathiona peroxidase. Existem várias formas da glutathiona peroxidase, selênio dependente e selênio independente que protegem as células espermáticas de lesões induzidas pelo processo oxidativo (CHABORY et al., 2010). Assim, a deficiência das enzimas dependentes de selênio pode resultar na emergência de anormalidades morfológicas, especialmente da mitocôndria espermática (STRADAIOLI et al., 2009). Entretanto, espermatozoides bovinos possuem baixos níveis de atividade da glutathiona peroxidase e catalase, em relação a outras espécies como, homens, ratos, carneiros e coelhos. A resistência a peroxidação lipídica dos espermatozoides bovinos pode ser atribuída à composição do plasma seminal, uma vez que esta enzima está em maior concentração no plasma seminal do que no espermatozoide (DAWRA; SHARMA; MAKAR, 1983, 1984). Ślaweta, Waśowicz e Laskowska (1988) também verificaram uma correlação alta ($r = 0,79$) entre as concentrações destas enzimas e do selênio no plasma seminal.

A enzima glutathiona peroxidase (GSH-PX) presente nas mitocôndrias, transforma o peróxido de hidrogênio em água e representa a primeira reposta a pequenas concentrações de peróxido de hidrogênio, em condições fisiológicas. Além disso, GSH-

PX pode também reciclar moléculas orgânicas que foram atacadas pelo peróxido de hidrogênio e produziram radical hidroxila (DREVET, 2006). Outra enzima importante é glutathione fosfolipídeo hidropoxidase (PH-GSH-Px) que se liga à membrana plasmática e no núcleo, a qual é pronunciada em células espermáticas tardias (meióticas), onde age como uma proteína estrutural da cabeça espermática, enquanto que a forma nuclear da PH-GSH-Px contribui para condensação da cromatina (VAISBERG et al., 2005).

A atividade da glutathione peroxidase pode ser usada como um marcador preditivo da qualidade seminal de reprodutores bovinos, já que seu alto conteúdo nos espermatozoides foi associado com maior motilidade e menor porcentagem de cabeças isoladas, peça intermediária anormal e gotas proximais, indicando maior integridade morfológica (STRADAIOLI et al., 2009). Estes achados mostram o papel importante da enzima na garantia da correta arquitetura espermática, especialmente na peça intermediária e na capacidade cinética dos espermatozoides (STRADAIOLI et al., 2009).

2.3 Ácidos graxos poliinsaturados e espermatozoides

A membrana plasmática é uma estrutura altamente dinâmica que regula trocas extracelulares e auxilia na fecundação. A composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide é a principal determinante das características de motilidade, sensibilidade às baixas temperaturas e viabilidade. Espermatozoides de diversas espécies contêm acima de 60% de AGP na camada de fosfolipídios (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). A presença de AGP pode aumentar a fluidez da membrana plasmática, o que pode refletir em maior resistência a lesões decorrentes da formação de cristais de gelo, durante a criopreservação (SELVARAJU et al., 2012).

Por contribuírem com a fluidez e flexibilidade das membranas espermáticas, os AGP participam da reação acrossomal e também envolvido na ancoragem dos receptores de membrana. Além disso, são precursores das prostaglandinas e leucotrienos, os quais são importantes para a motilidade espermática e o processo inflamatório. A maior concentração de AGP na membrana da cabeça e cauda espermáticas também está envolvida na capacitação espermática, interação entre o espermatozoide com a superfície uterina (DOLATPANAH et al., 2008; STRZEŻEK et al., 2004) e ovócito (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007), bem como podem

servir como fonte de energia (AHLUWALIA; HOLMAN, 1969). A redução de suas concentrações no sêmen diminui o número de células, a motilidade e o potencial de fecundação de espermatozoides bovinos (KELSO et al., 1997).

De fato, na morfogênese de espermatozoides humanos funcionalmente normais há redução do conteúdo de ácidos graxos e um aumento relativo na proporção relativa de AGP. Em espermatozoides defeituosos esta transformação não ocorre, os quais contêm alto conteúdo de ácidos graxos e baixa proporção relativa de AGPs (KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010).

A composição lipídica da membrana plasmática é alterada devido ao processo de criopreservação (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; GADEA et al., 2008), o que pode estar ligado ao aumento da peroxidação lipídica associada à técnica ou mesmo pela maior captação pela membrana espermática de AG saturados (MALDJIAN et al., 2005; NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012; TOWHIDI; PARKS, 2012). O total de lipídios e seus componentes, como lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios diminui. Ácidos graxos insaturados que compõem os fosfolipídios decrescem enquanto a porcentagem de saturados, a proporção colesterol:fosfolipídio e a quantidade de hidrocarbonetos aumentam. Estes dados indicam que a célula espermática aumenta a hidrofobicidade da membrana plasmática como um mecanismo para adquirir resistência às criolesões (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; CHAKRABARTY et al., 2007).

Assim, a proporção de colesterol:fosfolipídio, o conteúdo de lipídios na bicamada, o nível de insaturação dos AGP e a proporção proteína:fosfolipídio influenciam no grau da lesão causada pelo resfriamento e congelamento do sêmen (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Entretanto esta alteração não é completamente reversível e a viabilidade celular pode não ser retomada após a descongelamento (CHAKRABARTY et al., 2007).

Apesar de os espermatozoides que possuem alta proporção de AGP:saturados no fosfolipídio da membrana plasmática e menor proporção colesterol:fosfolipídio tenderem a serem mais susceptíveis à crioinjúrias (CHAKRABARTY et al., 2007), a redução dos AGP que ocorre no processo de criopreservação de células espermáticas ocasiona perda da função celular, refletindo na diminuição da motilidade (CHAKRABARTY et al., 2007).

Por outro lado, pelo fato das células espermáticas conterem altas concentrações de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e AGP), são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica e consequentemente perda da motilidade e aumento na lesão

oxidativa ao DNA, desta forma, comprometendo a competência funcional do espermatozoide (CHATTERJEE; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2001; KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010). Estes autores sugerem que os AGPs provavelmente inibem complexos específicos de transporte de elétrons, resultando em excesso de elétrons e subsequente formação de ânion superóxido, tornando as células susceptíveis a peroxidação lipídica (KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010).

2.4 Ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes adicionados ao diluente

A adição de antioxidantes, como, α -tocoferol (Vitamina E) e ascorbato (Vitamina C), no sêmen de touros, antes da congelação, apresentou maior atividade da enzima superóxido dismutase, porcentagem de acrossomas intactos, bem como, redução na peroxidação lipídica, pós-descongelação, em relação às amostras que não tiveram a presença de antioxidantes (BECONI; FRANCIA; MORA, 1993). Adicionalmente, vitaminas E e C acrescentadas ao meio de capacitação diminuíram a porcentagem de espermatozoides capacitados de sêmen bovino (O'FLAHERTY; BECONI; BEORLEGUI, 1997).

Efeito na criotolerância também foi observado quando Aurich et al. (1997) adicionaram ácido ascórbico ao sêmen diluído estocado a 5°C por um dia. Os autores observaram que este antioxidante protegeu a integridade da membrana plasmática no sêmen diluído de garanhão, indicando que houve inibição da peroxidação lipídica, apesar de que não ter sido visto efeito na motilidade espermática (AURICH et al., 1997).

Amostras de sêmen de boa qualidade congelados na presença de antioxidantes (vitamina E e ácido ascórbico) apresentaram maior atividade superóxido dismutase (envolvida nos mecanismos de defesa contra toxicidade do oxigênio), porcentagem de acrossoma e mitocôndria intactos e menor produção de malonaldeído (MDA, indicador de estresse oxidativo). Isso demonstra que os antioxidantes naturais podem exercer efeito de proteção na membrana do espermatozóide criopreservado, diminuindo a susceptibilidade à oxidação, preservando a atividade metabólica e viabilidade celular. Entretanto, para sêmen de baixa qualidade por pré-existir alterações na membrana plasmática não foi observado este efeito protetor (BECONI; FRANCIA; MORA, 1993).

A adição de AGP n-3 e vitamina E ao diluente incrementou as motilidades total e progressiva e a viabilidade do sêmen pós-descongelação, em relação a diluentes que

não continham estes componentes, em touros Pardo Suíço (TOWHIDI; PARKS, 2012) e Holandeses (NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012). Os autores verificaram que o efeito positivo encontrado é devido a maiores porcentagens de ácido docosahexaenóico (DHA, n-3) e da proporção de n-3/n-6 nos espermatozoides, antes e após a criopreservação. AGP podem se agregar na membrana lipídica dos espermatozoides, principalmente no flagelo, onde a fluidez resultante promoverá maior motilidade espermática.

Em contrapartida, o excesso de AGP (100 ng/mL de AGP n-3) adicionado ao diluente pré-congelação diminuiu a qualidade do sêmen descongelado (TOWHIDI; PARKS, 2012), provavelmente por aumentar a produção de radicais livres (MALDJIAN et al., 2005) com consequente danos às membranas espermáticas. Desta forma, maiores níveis de antioxidantes podem ser mais benéficos quando associados à adição de maiores níveis de AGP (TOWHIDI; PARKS, 2012).

2.5 Ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes adicionados à dieta

As principais famílias de ácidos graxos que afetam a reprodução são n-3 e n-6. O ácido linoleico dietético, abundante nos óleos vegetais, é um dos representantes da família n-6, o qual é convertido em ácido aracdônico, precursor das prostaglandinas dienóicas, como a PGF2 α . As mesmas enzimas, elongase e dessaturase, que atuam na conversão do ácido linoleico em aracdônico, também convertem o principal ácido graxo n-3, o ácido linolênico a DHA e ácido eicosapentaenóico (EPA), precursor das prostaglandinas trienóicas, como PGF3 α (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007; PAULENZ et al., 1995).

Os espermatozoides tem considerável quantidade de AGP n-3, principalmente DHA. Estes componentes tem um papel essencial na função, regulação do movimento celular, metabolismo lipídico e capacidade de fusão dos espermatozoides. Diferenças na composição dos AGP dos fosfolipídios podem afetar a flexibilidade e compressibilidade das membranas celulares. Existe evidência que a composição lipídica da membrana plasmática é a maior determinante da motilidade, sensibilidade à criopreservação, viabilidade espermática e a capacidade de fusão dos gametas, induzindo modificações da taxa de fertilidade (BLESBOIS et al., 1997; HAMMERSTEDT, 1993).

Estudos prévios demonstraram que a composição dos AGP nos espermatozoides é sensível à dieta, desde que esta promova diferenças na proporção n-6 e n-3 nos espermatozoides e no plasma seminal (DOLATPANAH et al., 2008). A diferença nos

ácidos graxos dos fosfolipídios dos espermatozoides pode modificar as estruturas da membrana, fluidez e susceptibilidade a lesões resultantes da peroxidação.

Em carneiros alimentados por 60 dias com óleo de girassol (rico em ácido linoleico), comparados a animais sob dieta com milho, a qualidade espermática foi incrementada por mudanças na membrana plasmática provavelmente pelos menores níveis de MDA. Estas alterações refletiram em maior motilidade do sêmen fresco e maiores integridade das membranas espermáticas e função mitocondrial, após o resfriamento do sêmen por 24 h. Entretanto, as dietas não influenciaram na fertilidade *in vitro* (taxa de clivagem) (SELVARAJU et al., 2012). A presença de girassol na dieta (óleo ou semente) promoveu aumento na motilidade e a integridade da membrana plasmática de espermatozoides de búfalos, submetidos à congelção (ADEEL et al., 2009).

Dolatpanah et al. (2008) realizaram um experimento fatorial 2 x 2 por 11 semanas, em que incluíram nas dietas de bodes, óleo de peixe (rico em AGP n-3, 2,5% em MS) e/ou vitamina E (0,3 g/kg em MS) e observaram que a combinação dos dois ingredientes afetou positivamente o número de espermatozoides, motilidades total e progressiva e porcentagem de espermatozoides viáveis. Assim como, Rooke, Shao e Speake (2001) reportaram que a suplementação de dietas com óleo de peixe associado com excesso de antioxidantes (acetato de α -tocoferol) por seis semanas provocaram aumento na viabilidade e proporção de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normal, em suínos.

Os achados do aumento na concentração espermática resultante da alimentação com dietas lipídicas baseiam-se na ação dos AGP em incrementar as concentrações de eicosanóides; estimular a espermatogênese e regular a expressão gênica e também a interação dos AGP ou seus derivados eicosanóides com o eixo hipotálamo-hipófise, controlando a espermatogênese (SURAI et al., 2000).

A inclusão de fonte de AGP n-3 (100g de fonte de DHA) na dieta, durante 12 semanas melhorou a qualidade de sêmen de touros holandeses (n = 19). A dieta com DHA comparada ao grupo controle proporcionou aumento na cinética, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática do sêmen fresco. Após a congelção, as maiores velocidades espermáticas foram encontradas para a dieta tratamento, após nove semanas de suplementação (GHOLAMI et al., 2010).

Strzeżek et al. (2004) investigaram o efeito da suplementação dietética contendo AGP e antioxidantes, como vitamina C e selênio nas características do sêmen de suínos. Esta dieta incrementou a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta, a resistência osmótica da membrana acrossomal e a viabilidade de espermatozoides preservados a 5°C. Além disso, foi observado aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, concomitante com a produção de MDA. Assim, a manipulação dietética causou aumento na peroxidação lipídica, entretanto foi compensado pela ação dos antioxidantes.

Ratos expostos ao estresse oxidativo do chumbo e suplementados por 6 semanas com vitaminas E e C tiveram proteção das células espermáticas contra a redução da motilidade e da capacidade de penetração ovocitária (HSU et al., 1998). Homens inférteis apresentaram aumento na quantidade de espermatozoides ao receberem doses orais de vitamina C (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005). Além disso, a suplementação *in vitro* de vitamina C e E separadamente promoveu efeito de proteção da integridade do DNA espermático contra irradiação (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005). Em estudo conduzido por Kodama et al. (1997), a terapia com glutathione, vitaminas C e E por 2 meses aumentou a concentração espermática e reduziu o nível de lesão oxidativa no DNA em espermatozoides de homens inférteis.

Castellini et al. (2000) verificaram efeito positivo da dieta com acetato de α -tocoferil e ácido ascórbico por 2 meses na qualidade relativa do sêmen e nas características de motilidade, estabilidade oxidativa e fertilidade de espermatozoides de coelhos armazenados por 24h a 5°C. O ácido ascórbico quando associado com maiores níveis de vitamina E, aumentou as concentrações desta e a estabilidade oxidativa do sêmen. Além disso, os antioxidantes juntos melhoraram a viabilidade e cinética dos espermatozoides com aumento da taxa de fertilidade em relação aos animais do grupo controle. Entretanto, Foote, Brockett e Kaproth (2002) não observaram efeito adicional na motilidade espermática pós-descongelação ao acrescentar ácido ascórbico no sêmen fresco de touros holandeses.

O selênio é um componente necessário para síntese de glutathione peroxidase e trabalha sinergicamente com a vitamina E (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005). Em um estudo em que selênio foi suplementado durante 3 meses houve diminuição nas concentrações de MDA no plasma seminal e melhora na motilidade espermática de homens (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005).

Suínos machos foram alimentados com dietas fortificadas com dois níveis de suplemento de selênio e vitamina E, do desmame até os 18 meses de idade. Dieta com menor quantidade de selênio não afetou o acrossomo ou núcleo espermático, entretanto maior quantidade de mitocôndrias, peça intermediária e cauda anormais foi encontrada, bem como menor concentração de ATP. Além disso, espermatozoides imaturos com gotas citoplasmáticas foram mais numerosos em relação aos espermatozoides dos animais alimentados com maior concentração de selênio. Estes efeitos contribuem para a redução da motilidade espermática e menor taxa de fecundação encontradas (MARIN-GUZMAN et al., 1997). Desta forma, os autores sugerem que o selênio contribui para maturação espermática no epidídimo, sendo que ele se incorpora em uma selenoproteína na membrana externa de mitocôndria de espermatozoides de ratos e touros durante a fase de maturação inicial da espermatogênese (MARIN-GUZMAN et al., 2000).

Em resumo, a criopreservação expõe o sêmen ao choque térmico e ao oxigênio atmosférico e consequentemente, aumenta a susceptibilidade em sofrer peroxidação lipídica (GADEA et al., 2008; NAIR et al., 2006), além disso este efeito está associado às diferenças na composição de AGP das membranas espermáticas que contribuem para sua flexibilidade (STRZEŻEK et al., 2004). Associada à capacidade antioxidante intracelular dos espermatozoides ser baixa e, além disso, reduzir, após processo de congelação-descongelação (GADEA et al., 2004), há necessidade de alternativas para melhorar a viabilidade espermática, especialmente, após a criopreservação.

Estes relatos foram observados em fêmeas também, em que novilhas Nelore superovuladas que foram suplementadas com gordura rica em ácido linoléico, após descongelação, os embriões provenientes destes animais tiveram comprometimento no seu desenvolvimento *in vitro*, provavelmente devido ao aumento na peroxidação lipídica (GUARDIEIRO et al., 2013).

Baseando-se no comprometimento celular causado pelo processo de congelação-descongelação, bem como, por não ter trabalhos com bovinos, o fornecimento de dietas ricas em AGP associado à suplementação de antioxidantes a touros, se torna interessante, uma vez que, pode contribuir para garantir a fluidez de membrana necessária para a resistência celular ao processo de congelação, bem como impedir a peroxidação lipídica no sêmen de bovinos refletindo em maior viabilidade espermática pós-descongelação.

2.6 Hipótese

Sêmen de touros suplementados com gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes concomitantemente possui melhor qualidade antes da congelação e é mais resistente ao processo de criopreservação do que o proveniente de animais que recebem estes componentes individualmente ou que não foram suplementados.

2.7 Objetivos

2.7.1 Objetivos gerais

Avaliar a viabilidade seminal pré e pós-congelação de sêmen de touros da raça Nelore alimentados com gordura protegida da degradação ruminal e/ou antioxidantes.

2.7.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito das dietas contendo gordura protegida ruminal e/ou antioxidantes:

- No desempenho, no consumo de matéria seca e no perímetro escrotal;
- Nas concentrações de selênio e ácidos graxos circulantes;
- Nas características seminais e espermáticas do sêmen fresco, como, volume, vigor, turbilhonamento, número total de espermatozoides, porcentagem de espermatozoides normais e anormais;
- Nas concentrações de glutathione peroxidase no plasma seminal e plasma sanguíneo;
- Nas características espermáticas do sêmen pós-descongelação, tais como, cinética dos espermatozoides, integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez da membrana plasmática, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Protocolo# 2010-3).

3.1 Animais e local

De uma fazenda da região de São Pedro-SP, 48 touros da raça Nelore (peso corporal inicial médio de $372,29 \pm 1,64$ kg e idade média de 2,5 anos) foram selecionados e transferidos para área experimental da ESALQ-USP para o presente estudo. Esta seleção baseou-se no exame andrológico inicial que constituiu de avaliação externa e interna do aparelho reprodutor e exames convencionais imediatos e mediatos do sêmen fresco e congelado, como recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998).

Após a seleção, os animais foram alocados em 16 baias (três touros/baia) e distribuídos em quatro grupos experimentais com 12 touros em cada grupo. As dimensões de cada baia foi de 8 m de comprimento por 4 m de largura, sendo que, o comprimento do cocho por baia foi de 4 m, de tal forma que todos os animais tinham acesso à ração fornecida.

3.2 Dietas experimentais

O experimento foi realizado de Outubro de 2011 a Fevereiro de 2012. Para isto, todos os animais foram mantidos em regime de confinamento e receberam uma ração padrão (15% de bagaço de cana de açúcar, 49,1% de polpa cítrica, 35% de farelo de glúten de milho, 0,6% de ureia, 0,3% de núcleo mineral em matéria seca, MS), durante o período de adaptação (30 dias). As dietas experimentais foram fornecidas durante 75 dias, uma vez ao dia, variando apenas a suplementação entre os grupos experimentais (Tabela 1): 1) G = gordura protegida da degradação ruminal (¹Megalac-E[®], 1,5% na MS); 2) A = ²EconomasE[®] (3 g/animal/dia, misturados na ração fornecida no cocho,

¹ Megalac-E[®], fornecidos pela Arm & Hammer, rico em ácido linoleico.

² EconomasE[®], fornecidos pela Alltech do Brasil Ltda. Nível de garantia - Selênio (mín 1500 mg/kg), composição básica: levedura enriquecida com selênio, levedura seca de cervejaria, farinha de algas marinhas, ácido ascórbico, produto de fermentação de *Aspergillus niger*.

como fonte de vitamina C e selênio); 3) GA = associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®] e 4) C = dieta controle (ração padrão).

A quantidade de cada ração ofertada foi definida com base no consumo do dia anterior, não permitindo sobras superiores a 10% da quantidade ofertada. Além disso, as sobras de cada dieta experimental foram pesadas, semanalmente, para estimar o consumo/baia.

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes das dietas experimentais (% na MS)

Item	Dietas experimentais ⁽¹⁾			
	C	G	A	GA
Bagaço de cana de açúcar (%)	15,0	15,0	15,0	15,0
Polpa cítrica (%)	49,1	48,2	49,1	48,2
Farelo de glúten de milho (%)	35,0	34,4	35	34,4
Ureia (%)	0,6	0,6	0,6	0,6
Núcleo Mineral (%) ⁽²⁾	0,3	0,3	0,3	0,3
Megalac-E (%)	–	1,5	–	1,5
EconomasE (g/baia)	–	–	9,0	9,0

⁽¹⁾ C= dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A=dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®]. Água foi adicionada às dietas para se obter 70% de MS na dieta.

⁽²⁾ Composição: Sódio (26%), cobalto (133 mg/Kg), cobre (2700 mg/Kg), iodo (180 mg/Kg), manganês (6000 mg/Kg), selênio (14 mg/Kg), zinco (4000 mg/Kg).

As rações fornecidas durante os períodos de adaptação e experimental, bem como, os ingredientes Megalac-E[®] e EconomasE[®] foram amostrados no início, meio e fim do período experimental e imediatamente armazenados (-18°C). Estas amostras foram utilizadas para determinação da composição bromatológica realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia do ESALQ, USP, Piracicaba-SP; concentração de selênio no Laboratório de Minerais do Departamento de Zootecnia da FZEA, USP, Pirassununga-SP e perfil de ácidos graxos realizada no laboratório, sob coordenação do Prof. Alexandre Vaz Pires do Departamento de Zootecnia, ESALQ.

Para a determinação da matéria seca (MS) e matéria mineral (MM) dos concentrados, as amostras foram pesadas e mantidas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas. Em seguida foram novamente pesadas e moídas em moinho com peneira de crivos de 1 mm, segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos utilizando α -amilase e sulfito de sódio (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). A

determinação de nitrogênio total foi realizada com base na combustão das amostras a 835°C (WILES; GRAY; KISSLING, 1998) utilizando o analisador LECO® (modelo FP-528). O teor de proteína bruta (PB) foi obtido por meio da multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os lipídios foram extraídos, seguindo a metodologia descrita por Feng, Lock e Gansworthy (2004) e determinados no aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de selênio foi determinada pelo método fluorimétrico, de acordo com Whetter e Ullrey (1978). A composição química das dietas, bem como a concentração de selênio, estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química do Megalac-E® e das dietas de adaptação e experimentais (% na MS)

Item	Megalac-E®	Dieta de adaptação	Dietas experimentais ⁽¹⁾			
			C	G	A	GA
Matéria seca (% da MO)	96,98	67,25	68,57	69,84	68,35	69,85
Matéria mineral	-	-	6,44	6,79	6,46	7,18
Proteína bruta	0,48	15,41	14,45	13,30	14,65	13,53
Energia Metabolizável (MCal/kg) ⁽²⁾	-	-	2,57	2,63	2,57	2,63
Fibra em detergente neutro	0,00	41,32	36,92	35,38	37,76	33,44
Selênio	-	-	0,04	0,03	0,36	0,42

⁽¹⁾ C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoleico; A = dieta com EconomasE® (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E® e EconomasE®.

⁽²⁾ Calculada utilizando o programa Large Ruminant Nutrition System (FOX et al., 2004).

Alíquotas do extrato de lipídios das rações experimentais e do Megalac-E® foram metiladas em duas etapas com 2 mL de 0,5M de metóxido de sódio (10 minutos a 50°C), seguida da adição de HCL metanoico (10 minutos a 80°C), conforme Kramer et al. (1997) e armazenada a -20°C em frascos âmbar de 1,5 mL contendo nitrogênio para evitar possível oxidação. Posteriormente, para a quantificação e determinação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies 7890A, equipado com detector de ionização de chama (7683B); e coluna capilar de sílica fundida (J & W 112-88A7, Agilent Technologies), de 100 m de comprimento e 250 µm de diâmetro interno, contendo 0,20 µm de cianopropil policiloxano. A aquisição dos dados foi realizada por meio do software ChemStation (Agilent Technologies). O tempo total da corrida cromatográfica foi 87,5 minutos divididos em quatro rampas de aquecimento,

conforme segue: 70°C (1 min), 100°C (5°C/min; 2 min), 175°C (10°C/min; 40 min), 225°C (5°C/min) e 245°C (20°C/min; 20 min). O H₂ foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1,0 mL/min; a temperatura do injetor e do detector foi de 260°C. O gás N₂ foi utilizado como Makeup, com fluxo de 30 mL/min. A opção split em uma relação de 50:1 foi utilizada. A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada com base no tempo de retenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos dos padrões. Utilizou-se um padrão de 37 compostos (Supelco mix C4 - C24/n. 18919), e padrões individuais para a identificação dos ácidos graxos C18:0, C18:2 cis-9, trans-11 e C18:2 trans-10,cis-12 (Nu-Chek Prep, Elysian, MN).

Tabela 3 – Composição dos principais ácidos graxos das dietas experimentais e do Megalac-E[®]

Ácido graxo mg/g(%)	Dietas experimentais ⁽¹⁾				
	Megalac-E [®]	C	G	A	GA
Láurico (C12:0)	1,76 (0,18%)	1,52 (0,12%)	4,70 (0,43%)	1,49 (0,13%)	5,21 (0,49%)
Mirístico (C14:0)	5,67 (0,56%)	2,71 (0,22%)	3,97 (0,37%)	2,68 (0,23%)	4,24 (0,40%)
Palmítico (C16:0)	36,12 (3,60%)	185,57 (15,15%)	186,52 (17,23%)	198,54 (16,69%)	179,06 (16,75%)
Estearico (C18:0)	11,20 (1,12%)	36,46 (2,98%)	48,05 (4,44%)	38,65 (3,25%)	48,94 (4,58%)
Vacênico (t11C18:1)	2,96 (0,29%)	0,44 (0,04%)	16,19 (1,50%)	0,52 (0,04%)	18,97 (1,77%)
Oleico (C18:1 <i>n</i> -9)	86,72 (8,63%)	222,60 (18,17%)	225,54 (20,83%)	229,77 (19,32%)	227,03 (21,24%)
Linoleico (C18:2 <i>n</i> -6)	149,85 (14,92%)	398,82 (32,56%)	393,90 (36,38%)	409,95 (34,47%)	399,60 (37,38%)
Ácido γ - linolênico (C18:3, <i>n</i> -6)	0	5,03 (0,41%)	4,69 (0,43%)	5,19 (0,44%)	4,75 (0,44%)
Linolênico (C18:3 <i>n</i> -3)	8,42 (0,84%)	34,13 (2,79%)	35,56 (3,28%)	35,26 (2,96%)	36,00 (3,37%)
t11 CLA	0	2,33 (0,19%)	3,39 (0,31%)	1,72 (0,14%)	3,81 (0,36%)
t10 CLA	0	0,53 (0,04%)	3,18 (0,29%)	0	3,69 (0,35%)
Outros	704,74 (70,16%)	335,37 (27,38%)	173,25 (16,00%)	266,18 (22,38%)	156,79 (14,67%)

⁽¹⁾ C= dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A=dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®].

3.3 Peso e perímetro escrotal

O peso corporal foi mensurado no início e final do período experimental. Para isto, os touros foram mantidos em jejum alimentar, por 14 horas, previamente à pesagem.

Operímetro escrotal foi aferida a cada manejo de colheita de sêmen para congelação, utilizando-se uma fita métrica.

3.4 Cronograma de amostragens

Anteriormente ao fornecimento das dietas experimentais, ou seja, durante o período de adaptação (Dia 0, Figura 1), para cada touro foi realizada uma colheita de sêmen por eletroejaculação, bem como as consequentes avaliações (descritas abaixo) e congelação de sêmen. Posteriormente, este procedimento foi repetido seis vezes, com 15, 30, 45, 55, 65 e 75 dias de fornecimento das dietas experimentais, totalizando sete colheitas de sêmen por animal (Figura 1).

O estímulo pela eletroejaculação foi realizado para obter a fração pré-seminal até a fração pós-seminal, sendo que somente foi colhida a fração contendo espermatozoides. As colheitas de sêmen foram realizadas em grupos de quatro touros, sendo um animal de cada tratamento, colhidos consecutivamente. Após as avaliações imediatas do sêmen (descritas abaixo), este foi submetido ao processo de congelação. Desta forma, foi realizada uma congelação de sêmen no período de adaptação 0 dias de fornecimento das dietas experimentais) e mais seis congelações (com 15, 30, 45, 55, 65 e 75 dias de fornecimento das dietas experimentais), totalizando sete repetições por animal (Figura 1).

Figura 1 – Delineamento experimental, as setas indicam os momentos em que o sêmen foi colhido, avaliado e posteriormente congelado, em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo que anterior ao dia 0 foi considerado o período de adaptação, e aquelas relacionadas com o período de fornecimento das dietas experimentais realizadas com 15, 30, 45, 55, 65 e 75 dias

3.5 Avaliações do sêmen fresco

Imediatamente após as colheitas, avaliações, descritas abaixo detalhadamente, como volume do ejaculado, vigor, turbilhonamento, concentração espermática e motilidade progressiva subjetiva foram realizadas. E para avaliações posteriores, como aglutinação de cabeça e morfologia espermática em contraste de fase, alíquotas do sêmen fresco foram fixadas em formol-salina a 1,6%.

O volume do ejaculado foi determinado baseando-se na marcação de um tubo cônico graduado de 15 mL. Para se avaliar o turbilhonamento (0 a 5), uma pequena gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina pré-aquecida a 37°C, em um microscópio de contraste de fase, utilizando-se objetiva de 10x. A motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis, 0 a 100%) e o vigor (força de movimento, 0 a 5) foram avaliados em uma gota de sêmen colocada entre uma lamínula e uma lâmina pré-aquecidas a 37°C, utilizando uma objetiva de 20x de um microscópio óptico de contraste de fase.

A concentração foi obtida por meio de diluição de 10 µL de sêmen fresco em 2 mL de solução formol-salina a 1,6% e posteriormente examinada na câmara de Neubauer em microscópio de luz. Para isto, os espermatozoides foram contados em cinco campos nos dois lados da câmara, sendo considerado o resultado obtido pela média de contagem de ambos os lados e expresso em espermatozoides x 10⁶/mL (CBRA, 1998). Os resultados de número total de espermatozoides foram calculados multiplicando-se a concentração espermática obtida em 10⁶/mL pelo volume (mL) de sêmen colhido.

Para morfologia espermática, os defeitos espermáticos foram categorizados em defeitos maiores ou menores e a somatória em defeitos totais, considerando anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda (BARTH; OKO, 1989; CBRA 1998). Para isto, gotas de sêmen foram diluídas em 1 mL de solução formol-salina tamponada a 1,6% até ocorrer a turvação do meio. Desta diluição, uma gota foi colocada em uma lâmina para contagem de 200 células, em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x, identificando a porcentagem de espermatozoides normais e de cabeças espermáticas aglutinadas.

3.5.1 Análise da atividade da glutathiona peroxidase no plasma seminal

Adicionalmente, colheitas adicionais de sêmen foram realizadas durante o fornecimento da dieta de adaptação, 35 e 75 d após início das dietas experimentais para a determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-PX, E.C.1.11.1.9) no plasma seminal. Para isto, após a colheita, o sêmen imediatamente mantido em gelo e levado ao laboratório para centrifugação por 15 minutos a $2430 \times g$ a 2°C (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA). O plasma seminal foi armazenado em freezer -80°C para posterior análise no Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

A atividade enzimática da GSH-PX foi determinada, de acordo com Nichi et al. (2006), a qual se baseia na mensuração do consumo de NADPH. A GSH-PX, juntamente com a enzima glutathiona redutase (GSSGr), catalisam a conversão da glutathiona dissulfeto (oxidada) em glutathiona reduzida (GSH), na reação com o hidróxido de peróxido, resultando no consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH).

Após a descongelação das amostras em temperatura ambiente, 100 μL de plasma seminal foram adicionados em uma solução contendo 1 mL de NADPH (0,12 mM, Sigma, St. Louis, EUA), 100 μL de GSH (1mM, Sigma, diluída em água deionizada), 20 μL GSSGr (0,25U/mL, Sigma) e 20 μL de azida sódica (0,25 mM, Fisher Scientific, Fair Lown, EUA), utilizada para inibir a reação da catalase. Posteriormente, o volume foi completado para 1,9 mL com tampão fosfato 143 mM, EDTA 6,3 mM (Sigma), pH 7,5. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de t-butilhidroperóxido (1,2 mM, Sigma) e o consumo de NADPH foi detectado em comprimento de onda de 340 nm, por 10 minutos a 37°C . Os resultados foram expressos em unidade de GSH-Px/mL de plasma seminal, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de excitação de NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BEUTLER, 1975).

3.6 Congelamento do sêmen

Para congelamento, 25 palhetas de cada touro foram preparadas com uma dose média de 30 milhões de espermatozoides móveis por palheta. Após diluir o sêmen com meio tradicional Tris-Gema-glicerol (Bovimix[®], Nutricell, Campinas), este foi envasado em palhetas de 0,25 mL, vedadas com álcool polivinílico e submetidas à técnica de criopreservação automatizada em congeladora TK 3000 SE[®] (TK, Uberaba, Brasil), seguindo curva de resfriamento de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ entre temperatura ambiente e 5°C , e

curva de congelação de 20°C/minuto entre 5°C e -120°C, segundo recomendações do fabricante. Após atingir -120°C, as palhetas foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C), distribuídas em raques e armazenadas em botijão criobiológico até posteriores avaliações.

3.7 Avaliações espermáticas do sêmen pós-descongelção

Para o sêmen após descongelção a 37°C por 30 segundos em banho maria, as avaliações da cinética espermática computadorizada foram determinadas por sistema computadorizado (CASA – computer-assisted semen analysis) e aquelas referentes à integridade de membrana plasmática e acrossoma, fluidez de membrana plasmática e potencial mitocondrial foram realizadas por citometria de fluxo. Além disso, a peroxidação lipídica e a atividade da glutathione peroxidase foram determinadas no sêmen pós-descongelção.

3.7.1 Análise computadorizada da cinética espermática

A cinética espermática do sêmen pós-descongelção foi obtida por CASA, realizada no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em colaboração com o Prof. Sony Dimas Bicudo. Para esta avaliação, seis microlitros de sêmen descongelado foram colocados em câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel), aquecida a 37°C, sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA, previamente ajustado para análise de sêmen bovino (Tabela 4).

Amostras pós-descongelção que não tiveram concentração espermática em torno de 48 milhões/mL, conforme recomendado por Davis; Rothmann; Overstreet (1992), foram diluídas em Bovimix[®]. No mínimo, três campos foram selecionados para a leitura e análise. Os parâmetros de cinética espermática mensurados foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF) e linearidade (%; LIN).

Tabela 4 – Configurações do software Hamilton Thorne Biosciences (IVOS-Ultimate 12) para avaliar a cinética de espermatozoides bovinos

Parâmetro	Configuração
Taxa de aquisição de imagens (Hz)	60
Imagens adquiridas por campo (no.)	30
Contraste mínimo da célula	60
Tamanho mínimo da célula (pixels)	5
Velocidade de trajeto (VAP) de células progressivas (µm/s)	75
Retilinearidade (%)	80
Valor de corte VAP (µm/s)	21,9
Valor de corte da velocidade retilínea (VSL, µm/s)	6
Ampliação	1,95 x
Frequência de vídeo (Hz)	60
Intensidade da iluminação	2400
Temperatura	37°C

3.7.2 Análise espermática da integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez da membrana plasmática e potencial mitocondrial por citometria de fluxo

As análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez de membrana plasmática e potencial mitocondrial dos espermatozoides foram realizadas por citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, São José, CA, EUA), contando-se 10.000 células por análise/animal/momento de congelamento, no Laboratório de Reprodução Animal, do grupo do Prof. Sony Dimas Bicudo.

Para definir as populações espermáticas e/ou debris, foram utilizados o *Forward-Scatter-Cluster-Height* (FSC-H) e o *Side-Scatter-Cluster-Height* (SSC-H), no gráfico de pontos, com base em diferenças de tamanho e complexidade (CHEUQUEMA et al., 2012). Os dados fornecidos em pontos bi-dimensionais numa escala logarítmica foram analisados pelo *software* CFlow Plus®.

De uma palheta descongelada a 39°C por 30 segundos, três alíquotas de sêmen de 30 µL foram transferidas para microtubos pré-aquecidos a 39°C, os quais continham soluções com fluorocromos para as respectivas análises (Tabela 5). Em seguida, as alíquotas e as sondas foram incubadas em banho maria a 39°C por 8 min.

De forma detalha, para avaliação da integridade de membrana e reação acrossomal foram utilizadas os fluorocromos *Pivum sativum agglutinin* conjugada ao isotocinato (FITC-PSA), o qual se liga ao açúcar α -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal, sendo permeável à célula, ou seja, quando há reação acrossomal. Associada

a esta sonda, foi adicionado iodeto de propídio que se liga ao DNA, penetrando na célula quando a membrana plasmática se encontra lesada (Tabela 5).

A fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada utilizando as sondas Yo-Pro 1, que se liga ao DNA, e a Merocianina 540 (Tabela 5), que é hidrofóbica e cora mais intensamente as membranas com translocação dos fosfolipídios na bicamada lipídica, o que ocorre em espermatozoides capacitados (HALLAP et al., 2006).

Para verificar o potencial mitocondrial dos espermatozoides utilizou-se a combinação das sondas, Yo-Pro 1 e Mitotracker Green FM (Tabela 5), a qual é passivamente difundida pela membrana plasmática e se acumula em mitocôndrias ativas.

Tabela 5 – Classificação espermática de acordo com o fluorocromo utilizado para análise por citometria de fluxo do sêmen pós-descongelção

Avaliação	Fluorocromo	Solução de trabalho	Classificação dos espermatozoides
Integridade de MP ⁽¹⁾ e MA ⁽²⁾	FITC- PSA ⁽³⁾	100 µg/mL	MP lesada e MA não reagida;
	IP ⁽⁴⁾	2 mg/mL	MP íntegra e MA reagida;
Fluidez de MP (capacitação espermática)	Merocianina 540	1 mM/mL	MP íntegra e MA não reagida;
	Yo-pro1	25 µM/mL	MP lesada e MA reagida
			Viáveis com estabilidade de MP
			Viáveis com desestabilidade de MP
			Mortos
Potencial mitocondrial	Mitotracker Green Yo-pro-1	1 mol/L 25 µM/mL	Presença de potencial mitocondrial Ausência de potencial mitocondrial

⁽¹⁾ MP: membrana plasmática do espermatozoide

⁽²⁾ MA: membrana acrossomal espermática

⁽³⁾ FITC-PSA: aglutinina de *Pisum sativum agglutinin* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína

⁽⁴⁾ IP: Iodeto de propídio

Em seguida, os microtubos foram acoplados ao aparelho de citometria de fluxo para análise das células espermáticas. Os pontos gerados pelo *software* para cada sonda estão nas Figuras 2 A, B e C.

Figura 2 – Gráfico dos pontos gerados pela análise de 10.000 células de cada avaliação por citometria de fluxo. Amostras de sêmen impregnadas com a associação dos fluorocromos aglutinina de *Pisum sativum agglutinin* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de propídio (IP), sendo que o quadrante UL representa espermatozoides com membrana plasmática (MP) lesada e membrana acrossomal (MA) não reagida, UR: MP íntegra e MA reagida, LL: MP íntegra e MA não reagida e LR: MP lesada e MA reagida (A); Yo-pro e merocianina 540 (M540), sendo UL e UR: espermatozoides mortos, LL: espermatozoides viáveis com estabilidade de MP e LR: espermatozoides viáveis com desestabilidade de MP (B) e IP associado à mitotracker green, sendo, R1 representa espermatozoides com potencial de mitocondrial e R2 sem potencial mitocondrial (C)

3.7.3 Análise da peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica foi realizada para o sêmen congelado de todos os animais nos sete procedimentos de congelamento, no Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. O método utilizado foi baseado em uma lipoperoxidação induzida pelo ferro e ascorbato de sódio e em uma reação de 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de MDA, a altas temperaturas e

baixo pH, resultando em cromógeno de coloração rósea, quantificado no espectrofotômetro (NICHII et al., 2007).

Para isto, 200 µL do sêmen descongelado foram diluídos em 1600 µL de *phosphate buffered saline* (PBS), seguida da centrifugação a 800 x g por 10 minutos, temperatura ambiente (Eppendorf 5804R, Hamburg, Alemanha). Este procedimento foi realizado por mais uma vez para retirar o diluente do sêmen. Posteriormente, ao sêmen sem diluente foi adicionado o sulfato ferroso (50 µL, 4 mM) e o ascorbato de sódio (50 µL, 20 mM) e incubados por 90 min a 37°C. Em seguida, colocou-se ácido tricloroacético a 10% (v:v) a 4°C na proporção 1:2 para subsequente centrifugação (19700 x g a 5°C por 10 min). Ao sobrenadante resultante, foi acrescentado o ácido tiobarbitúrico a 1% (v:v, diluído em 0,05 N de hidróxido de sódio) na proporção 1:1, seguida da incubação em banho maria a 100°C por 15 min. Após este período, a amostra foi resfriada em banho de gelo (0°C), com intuito de parar a reação química.

As concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram mensuradas em comprimento de onda de 532 nm, no espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro Spectrophotometer[®], Biochrom, Cambridge, Inglaterra), de acordo com adaptações nos protocolos de Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979) e Nichi et al. (2007). Os valores de absorbâncias gerados foram comparados a uma curva de calibração previamente preparada com solução de MDA padrão, nas concentrações que variam de 82,75 ng/mL; a 1655,06 ng/mL. O índice de peroxidação lipídica está expresso em ng de TBARS/10⁶ espermatozoides e foi calculado de acordo com a concentração espermática/palheta.

3.8 Parâmetros sanguíneos

Amostras de sangue foram colhidas de cada animal por punção dos vasos coccígeos em tubos contendo EDTA e acondicionados, em gelo, em um momento durante o fornecimento da dieta de adaptação, 35 e 75 d após início das dietas experimentais para a determinação da atividade da glutathione peroxidase (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). O sangue foi imediatamente centrifugado a 2430 x g por 15 min a 4°C (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA). O plasma sanguíneo foi armazenado em freezer -80°C para posterior análise no Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, conforme descrito acima para o plasma seminal.

Adicionalmente, nestas mesmas amostras colhidas aos 75 dias após início das dietas experimentais, o perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo foi determinado, conforme descrito acima para as rações experimentais.

Para determinar a concentração sérica de selênio, aos 55 dias de fornecimento de dietas experimentais, amostras adicionais foram obtidas de cada animal por punção dos vasos coccígeos em tubos contendo heparina sódica e acondicionadas, em gelo, até serem centrifugados a 1700 x g por 15 min (Centribio 80-2B, Hong Kong, China). A concentração de selênio foi mensurada pelo método fluorimétrico, de acordo com Whetter e Ullrey (1978).

3.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados, de acordo com peso corporal e perímetro escrotal, em um arranjo fatorial 2 x 2 (inclusão ou ausência de gordura protegida da degradação ruminal e inclusão ou ausência de antioxidantes na dieta).

Os dados relativos ao peso corporal, consumo de matéria seca, perímetro escrotal, análise do sêmen fresco e pós-descongelação e dos parâmetros sanguíneos foram analisados pelo procedimento PROC GLIMMIX do programa estatístico SAS (2002), utilizando medidas repetidas no tempo sendo que, cada baia (n = 16) foi considerada como unidade experimental. Exceto as variáveis respostas referentes ao perfil de ácidos graxos e selênio circulantes que não foram analisadas como medidas repetidas no tempo.

As médias dos tratamentos foram estimadas utilizando-se o “LSMEANS” e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio do teste “t” de “Student” e nível de significância de 10%.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis respostas foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + F_k + TF_{jk} + P_l + L_m + TFP_{jkl} + E_{ijklm}$$

onde:

μ = média geral

B_i = efeito do bloco

T_j = efeito da gordura protegida da degradação ruminal na dieta

F_k = efeito dos antioxidantes na dieta

TF_{jk} = interação da gordura protegida da degradação ruminal x antioxidantes

P_l = efeito do período l

TFP_{jkl} = interação da gordura protegida da degradação ruminal x antioxidantes x período

L_m = efeito da baia m

E_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ijkl}.

Os erros das variáveis de motilidade espermática do sêmen fresco seguiram uma distribuição Beta com função de ligação logarítmica e aqueles para as variáveis porcentagem de defeitos totais, maiores e menores, acrossoma, LIN, motilidade pós-descongelamento apresentaram distribuição Beta com função de ligação logit. Os demais erros seguiram uma distribuição normal com função de ligação identidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se nas evidências em que os AGP podem afetar a flexibilidade das membranas espermáticas e que os antioxidantes possuem efeito na proteção destas membranas contra a peroxidação lipídica, foi conduzido o presente estudo. Este foi o primeiro estudo em que se avaliou o efeito da gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes da dieta na viabilidade seminal antes e após a criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus*.

Devido à duração da espermatogênese em touros ser de 54 dias, o tempo de fornecimento das dietas experimentais foi acima deste período (75 dias), a fim de permitir que a espermatogênese e a maturação de nova geração de espermatozoides ocorressem (DOLATPANAH et al., 2008; GHOLAMI et al, 2010; MALDJIAN et al., 2005).

4.1 Quantidades circulantes de selênio e ácidos graxos

Dietas contendo antioxidantes tiveram efeito marcante ($P < 0,001$) em aumentar as concentrações de selênio sérico em relação às dietas que não os tinha em sua composição ($0,04 \pm 0,002$ vs $0,02 \pm 0,002$ mg/L), seguindo o perfil das concentrações de selênio dietético. Ślaweta, Waśowicz e Laskowska (1988) também encontraram valores semelhantes de selênio no sangue ($44,2 \pm 7,6$ ng/ml, ou seja, $0,0442$ mg/mL), o que refletiu no conteúdo de selênio do plasma seminal (257 ± 98 ng/mL) e dos espermatozoides bovinos (583 ± 143 ng/ 10^9 células).

O perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo, aos 75 dias após início do fornecimento das dietas experimentais diferiu entre os grupos (Tabela 6). Esperava-se

que, a inclusão da gordura fosse eficiente em aumentar as concentrações dos AGP totais, especialmente, linoleico e oleico. No entanto, incremento no linoleico somente foi verificado quando a gordura foi associada a antioxidantes (Tabela 6). Esta observação pode ser justificada pelo fato de os antioxidantes estarem envolvidos na preservação da molécula de ácido graxo linoleico. A enzima glutathione peroxidase por atuar na redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e apresentar maiores concentrações em animais que receberam dietas contendo selênio (Figura 6), pode ter auxiliado na proteção do ácido linoleico no sangue de animais recebendo GA. Foi observado também para o grupo GA, maiores concentrações de ácido vacênico que pode ser utilizado para a produção endógena de CLA (ácido linoleico conjugado) que é importante para fluidez da membrana celular (PEREIRA et al., 2007). Associado a estes relatos, o maior consumo de MS, também favoreceu a disponibilização de maiores concentrações circulantes destes AGP (Tabela 6). Além disso, a falta de incremento, em geral, de AGP plasmáticos nos touros do Grupo G em relação aos do Grupo C ou A, pode ser indicativo de falha na prevenção contra biohidrogenação do produto comercial utilizado.

Prévios estudos demonstraram que a composição de AGP de cadeia longa nos espermatozoides é sensível a dieta, uma vez que dietas lipídicas enriquecidas com AGP n-3 ou n-6 resultaram em diferenças nas proporções de n-6/n-3 nos espermatozoides e no plasma seminal. Alterações nos ácidos graxos fosfolipídios podem modificar a estrutura, fluidez e ou susceptibilidade a lesões peroxidativas (DOLATPANAH et al., 2008; SAMADIAN et al., 2010). De fato, dietas ricas em AGP de cadeia longa (especialmente n-3) alteraram a proporção de AGP n-3 e n-6 e influenciaram na qualidade seminal, em bodes (DOLATPANAH et al., 2008) e carneiros (SAMADIAN et al., 2010). Entretanto, apesar de suínos terem a proporção de AGP n-6 no sêmen aumentada, não foi observado efeito deste sêmen nas taxas de não retorno (PAULENZ et al., 1995).

Tabela 6 – Composição dos principais ácidos graxos do plasma sanguíneo de touros Nelore (n = 48) alimentados com dietas experimentais

Ácido graxo, mg/g de lipídeos (%)	Dietas experimentais ⁽¹⁾				Efeito (valor de P)		
	C	G	A	GA	G x A	G	A
Láurico (C12:0)	0	0	0	0			
Mirístico (C14:0)	7,06 ^a (0,61)	4,92 ^b (0,54)	5,72 ^b (0,54)	6,26 ^{ab} (0,67)	0,03	0,20	1,00
Palmítico (C16:0)	120,96 ^{ab} (9,73)	101,78 ^b (8,50)	106,42 ^b (8,47)	130,07 ^a (10,64)	0,03	0,82	0,47
Estearico (C18:0)	204,10 ^{bc} (15,04)	168,58 ^a (13,14)	189,84 ^{ab} (13,10)	229,56 ^c (16,44)	0,02	0,89	0,12
Vacênico (t11C18:1)	1,88 ^{ab} (1,18)	3,91 ^b (1,03)	1,82 ^b (1,03)	8,03 ^c (1,29)	0,08	0,002	0,09
Oleico (C18:1 <i>n</i> -9)	87,96 (9,11)	68,50 (7,96)	75,90 (7,93)	82,15 (9,96)	0,16	0,47	0,93
Linoleico (C18:2 <i>n</i> -6)	236,95 ^a (23,72)	226,63 ^a (20,72)	213,95 ^a (20,66)	295,92 ^b (25,93)	0,06	0,14	0,32
Ácido γ -linolênico (C18:3, <i>n</i> -6)	0	0	0	0	0	0	0
Linolênico (C18:3 <i>n</i> -3)	2,03 (2,21)	5,60 (1,93)	1,19 (1,93)	3,06 (2,42)	0,69	0,22	0,44
t11 CLA	0	0	0	0	0	0	0
t10 CLA	0	0	0	0	0	0	0
Outros	76,99 (26,98)	104,44 (23,57)	73,09 (23,50)	67,44 (29,49)	0,53	0,69	0,44
AGP <i>n</i> -6	240,55 ^{ab} (24,96)	230,40 ^a (21,80)	218,56 ^a (21,73)	299,48 ^b (27,28)	0,07	0,16	0,33
AGP <i>n</i> -3	5,12 (4,47)	11,57 (3,90)	4,97 (3,89)	3,11 (4,88)	0,34	0,61	0,33
Saturados	583,25 (44,40)	573,41 (38,78)	617,06 (38,66)	583,36 (48,53)	0,43	0,32	0,99
Monoinsaturados	92,32 (9,78)	74,57 (8,54)	78,48 (8,52)	91,47 (10,69)	0,12	0,81	0,87
AGP	247,92 (25,03)	246,66 (21,91)	226,21 (21,84)	302,42 (27,42)	0,12	0,14	0,49

⁽¹⁾ C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®]; CLA = Ácido linoleico conjugado; AGP = ácidos graxos poli-insaturados.

4.2 Peso corporal e consumo de matéria seca

O consumo médio de matéria seca (CMS) foi incrementado pela adição de gordura protegida da degradação ruminal e pelos antioxidantes (Tabela 7). Desta forma, o CMS do tratamento controle foi inferior às dietas experimentais. A gordura e os antioxidantes na dieta, provavelmente, produziram um efeito benéfico à microbiota ruminal. Sugere-se que a substituição parcial do farelo de glúten de milho e polpa cítrica nas dietas (G, A e GA), em relação a dieta controle, pode ter aumentado o pH ruminal e contribuído à saúde ruminal, além disso, a baixa quantidade de inclusão da gordura não foi capaz de afetar a fermentação ruminal, principalmente da fibra do bagaço de cana, o que favoreceram ao CMS.

A maioria dos experimentos não é conclusiva com relação aos efeitos da gordura protegida da degradação ruminal no CMS. Allen (2000) relata que a inclusão desta gordura pode diminuir o CMS. Outros estudos reportaram que a suplementação da gordura não apresentou efeitos no CMS (PALMIQUIST, 1991; PEREZ ALBA et al., 1997; SILVA et al., 2007). Entretanto, estes trabalhos utilizaram animais de aptidão leiteira. Concordando com os nossos resultados, Fiorentini et al. (2012) realizaram experimento com novilhas de corte e também observaram efeito favorável da gordura no CMS.

Tabela 7 – Consumo de matéria seca (CMS) por baia de touros Nelore (n = 48) alimentados com dietas experimentais

CMS (kg/baia)	Dietas experimentais ¹		Média (EP)	Efeito (valor de P)		
	Presença A	Ausência A		G x A	G	A
Presença G	29,76 (0,91)	26,65 (0,91)	28,21 ^A (0,65)	0,18	0,005	0,05
Ausência G	25,68 (0,91)	25,07 (0,91)	25,37 ^B (0,65)			
Média	27,72 ^a (0,65)	25,86 ^b (0,65)				

^{a,b} Letras minúsculas comparam médias de CMS da dieta com ou sem antioxidantes (A)

^{A,B} Letras maiúsculas comparam médias de CMS da dieta com ou sem gordura protegida da degradação ruminal (G)

O CMS por baia variou ao longo de período experimental ($P < 0,01$; Figura 3), podendo ser devido ao efeito da temperatura e umidade relativa do ar, durante o período experimental (Figura 4). O'Brien et al. (2010) verificaram que o estresse térmico

reduziu em 12% o consumo de alimentos, em bezerros holandeses em crescimento, usados como modelo para gado de corte.

Figura 3 – Consumo médio de matéria seca (MS) por baía $\pm$ erro padrão (kg) de touros Nelore (n = 48) alimentados com as dietas experimentais, de acordo com o tempo de fornecimento. $P < 0,01$

Figura 4 – Temperatura (t°C) e umidade relativa do ar (UR) dos meses referentes ao período experimental. (POSTO METEOROLÓGICO DE PIRACICABA, 2011)

O peso corporal não diferiu entre os tratamentos, após os 75 dias de fornecimento das dietas experimentais (C: $524,1 \pm 12,14$; G: $523,0 \pm 13,14$; A: $524,5 \pm 12,14$; GA: $545,4 \pm 12,14$ kg, $P = 0,37$). Devido às rações experimentais fornecidas serem isoenergéticas (Tabela 2), isto proporcionou que não se encontrasse efeito ($P > 0,05$) no ganho de peso total (diferença do peso entre o início e final do experimento, $\mu = 157,0$ kg e no ganho de peso diário; $\mu = 1,49$ kg/d). A taxa de ganho encontrada no experimento está dentro do esperado, visto que as dietas foram formuladas com este propósito e os animais estavam em fase de crescimento.

De acordo com estes resultados, Gholami et al. (2010) também encontraram aumento no ganho de peso para touros holandeses suplementados ou não (controle) com fonte de AGP n-3 e similarmente, não foram encontradas diferenças entre os pesos corporais médios de ambos grupos. O peso corporal de búfalos e carneiros alimentados, após 60 dias, com óleo de girassol (ricas em AGP n-6 e vitamina E) também não foi afetado, em relação às dietas sem este ingrediente ou à base de milho (ADEEL et al., 2009; SELVARAJU et al., 2012).

4.3 Perímetro escrotal

A média do perímetro escrotal (PE) durante o período de adaptação foi de $33,1 \pm 0,42$ cm, obtendo-se um aumento médio de 2,33 cm entre a primeira e a última mensuração ($P < 0,001$). Os PEs aumentaram ao longo do tempo de fornecimento das dietas experimentais (Figura 5).

Figura 5 – Perímetro escrotal $\pm$ erro padrão dos touros Nelore ($n = 48$) alimentados com as dietas experimentais, de acordo com o tempo de fornecimento. a, b e c diferem entre si ($P < 0,001$)

Este fato pode ser explicado pelo efeito do ganho de peso no tamanho do PE, associado com aumento na idade (AHMAD et al., 2011; TROCÓNIZ et al., 1991). Adicionalmente, altos teores de energia na dieta também resultam em aumento do desenvolvimento testicular (FOURIER et al., 2004; MUKASA-MUGERWA; EZAZ, 1992). Em um estudo com carneiros ($n = 114$), foi encontrado aumento linear do PE, que foi relacionado com a idade e peso corporal (MUKASA-MUGERWA; EZAZ, 1992). Similarmente, Ahmad et al. (2011) verificaram, em touros *Bos indicus* em crescimento, que o PE seguiu o mesmo perfil de desenvolvimento do peso corporal.

Baker, Vann e Neville (2002) observaram que o desenvolvimento testicular de touros de corte taurinos foi positivamente correlacionado com peso corporal ao final do regime de confinamento, especialmente quando se compararam touros alimentados com dietas ricas em concentrado em relação àquelas à base de forragens, de acordo com a baixa porcentagem de volumosos utilizada nas presentes dietas experimentais (Tabela 1).

A nutrição regula o eixo hipotálamo-hipófise-testículos pela modulação do núcleo gerador de pulsos de GnRH, no hipotálamo. Desta forma, dietas ricas em concentrado que maximizam as taxas de ganho no peso corporal, como é o caso do presente estudo,

podem resultar em aumento na frequência de pulsos de LH e maior desenvolvimento testicular (BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008).

Além disso, apesar de no presente estudo não terem sido mensuradas as concentrações circulantes de IGF-I, sabe-se que este metabólito é aumentado em dietas energéticas, proporcionando também maiores secreções de GnRH/LH, podendo ser considerado um potente fator mitogênico dos testículos (BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008). A leptina e insulina também podem promover o desenvolvimento testicular. De fato, estes autores encontraram correlações positivas destes hormônios com PE e volume testicular.

De acordo com o que se esperava, as dietas fornecidas não tiveram efeito no PE (C: $35,6 \pm 0,56$; G: $35,2 \pm 0,56$; A: $35,5 \pm 0,56$; GA: $35,6 \pm 0,56$, $P = 0,66$), pois a composição energética foi similar entre elas (Tabela 2). Da mesma forma, a suplementação de dieta contendo AGP n-3 por 12 semanas não influenciou na PE de touros holandeses (GHOLAMI et al., 2010).

4.4 Atividade da glutathione peroxidase no plasma seminal e plasma sanguíneo

Os espermatozoides possuem uma baixa resistência ao estresse oxidativo, sendo altamente dependentes da proteção antioxidante do plasma seminal (NICHII et al., 2006), justificando a importância da mensuração da GSH-PX, no presente estudo. As enzimas dependentes de selênio possuem um importante papel na proteção dos espermatozoides bovinos contra defeitos causados pela oxidação, sendo que reduções nos seus níveis podem comprometer a qualidade do sêmen de touros (STRADAIOLI et al., 2009).

Para a atividade plasmática da GSH-PX, houve uma interação ($P < 0,01$) do momento do período experimental e a presença de antioxidantes na dieta (Figura 6). Observou-se que a atividade plasmática da GSH-PX teve seu maior valor em dietas contendo antioxidantes (A e GA), especialmente aos 75 dias de fornecimento das dietas experimentais (Figura 6).

Figura 6 – Atividade da glutatona peroxidase $\pm$ erro padrão do plasma sanguíneo de touros Nelore ($n = 48$), durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,01$

Da mesma forma, no plasma do sêmen fresco, a atividade da GSH-PX foi maior em touros alimentados com as dietas contendo antioxidantes (A e GA) do que aquelas que não os continha (C e G; $P < 0,001$; Figura 7). Concentrações similares de GSH-PX ($510,3 \pm 62,8$ U/mL), no sêmen de touros Nelore foram obtidas por Nichi et al. (2006), durante o verão e inverno.

Figura 7 – Atividade da glutatona peroxidase $\pm$ erro padrão do plasma do sêmen fresco de touros Nelore ($n = 48$) alimentados com dietas contendo ou não antioxidantes em sua composição. $P < 0,001$

Dentre os antioxidantes, a presença do selênio na dieta A e GA pode ter sido a promotora de alterações na atividade da GSH-PX no plasma sanguíneo e seminal. Concordando com estes resultados, Ślaweta, Ważowicz e Laskowska (1988) verificaram que a atividade de GSH-PX foi associada positivamente com as concentrações de selênio ($r = 0,79$, $P \leq 0,01$) e negativamente com as concentrações de MDA ($r = -0,38$, $P < 0,01$), no plasma seminal de touros. Além disso, amostras espermáticas com menores concentrações de selênio e atividade GSH-Px total e maiores níveis de peróxido lipídico tenderam a ter motilidades inferiores. Em outro estudo, verificou-se que a injeção i.m. de selênio em touros holandeses também resultou em aumento em suas concentrações e da GSH-PX no plasma seminal, entretanto não houve relação com a qualidade seminal antes ou após congelamento (BARTLE; SENGGER; HILLERS, 1980).

No presente estudo, houve efeito do tempo de fornecimento de dietas ($P = 0,009$) na atividade da GSH-PX no plasma seminal (Figura 8), sendo que esta foi mais expressa aos 35 dias de fornecimento das dietas experimentais do que aos 75 dias e período de adaptação. Interessantemente, as concentrações de GSH-PX no plasma seminal (Figura 8) não acompanharam o perfil da GSH-PX no plasma sanguíneo (Figura 6). Uma provável explicação para este fato é que os níveis de GSH-PX no sangue são mais sensíveis a mudanças, por exemplo, nas concentrações de selênio no sangue e desta forma, a resposta da GSH-PX no plasma seminal seria mais tardia.

Além disso, em todos os momentos de avaliação, os valores da atividade da GSH-PX no plasma seminal foram mais expressos do que os do plasma sanguíneo (Figuras 6, 7 e 8). Brown et al. (1977) verificaram que os níveis de glutathione peroxidase não foram correlacionados com a concentração espermática, porém uma correlação positiva existiu entre a atividade da enzima/ejaculado e volume seminal ($r = 0,70$, $P < 0,01$), sugerindo que esta enzima é alta no plasma seminal e baixa nos espermatozoides de bovinos.

Figura 8 – Atividade da glutathione peroxidase $\pm$ erro padrão do sêmen fresco de touros Nelore ($n = 48$) durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,01$

Stradaoli et al. (2009) observaram em que alto conteúdo da enzima glutathione dependente de selênio (EC 1.11.1.12) encontrado em espermatozoides de touros de raças italianas ($n = 92$) foi associado com menor porcentagem de cabeças isoladas, peça intermediária anormal e gotas proximais, indicando, maior integridade morfológica. Além disso, encontraram direta correlação entre atividade desta enzima nos espermatozoides e motilidade progressiva. Estes achados mostram o papel importante das enzimas glutathione na garantia da correta arquitetura espermática, especialmente na peça intermediária e na capacidade cinética dos espermatozoides (STRADAIOLI et al., 2009). Baseando-se nestes achados, podem-se relacionar as características espermáticas do sêmen fresco, como volume seminal, com as concentrações de GSH-PX, encontradas no presente estudo.

4.5 Avaliações do sêmen fresco

O volume seminal, turbilhonamento, vigor, porcentagem de cabeças espermáticas aglutinadas do sêmen fresco não tiveram diferença entre os grupos experimentais (Tabela 8).

Tabela 8 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP do volume seminal (mL), turbilhonamento (0-5), vigor (0-5), número total de espermatozoides, porcentagem de cabeças aglutinadas do sêmen fresco de 48 touros alimentados com dietas experimentais, durante 75 dias

	Dietas experimentais ¹				
	C	G	A	GA	P
Volume (mL)	6,6 $\pm$ 0,56 (n = 70)	6,5 $\pm$ 0,56 (n = 70)	7,1 $\pm$ 0,56 (n = 64)	6,9 $\pm$ 0,56 (n = 64)	0,95
Turbilhonamento (0-5)	3,2 $\pm$ 0,28 (n = 70)	3,0 $\pm$ 0,28 (n = 67)	3,3 $\pm$ 0,28 (n = 64)	3,5 $\pm$ 0,28 (n = 64)	0,49
Vigor (0-5)	4,1 $\pm$ 0,14 (n = 70)	4,0 $\pm$ 0,14 (n = 68)	4,0 $\pm$ 0,14 (n = 63)	4,0 $\pm$ 0,14 (n = 63)	0,50
% cabeças espermáticas aglutinadas	3,9 $\pm$ 0,50 (n = 68)	3,6 $\pm$ 0,50 (n = 65)	3,2 $\pm$ 0,50 (n = 63)	2,9 $\pm$ 0,50 (n = 60)	0,93

¹C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®]. P > 0,10.

O perfil das motilidades progressivas anterior e posteriormente ao processo de diluição do sêmen fresco para cada grupo experimental está representado na Figura 9. A dieta GA aumentou a motilidade progressiva antes da diluição, em relação às dietas G e A (P = 0,06), porém, não diferiu do grupo controle.

Após a diluição do sêmen fresco, as motilidades progressivas não diferiram entre os tratamentos (P = 0,97), fato que deve ter ocorrido em função da composição do diluente com gema de ovo, a qual fornece lipídio e colesterol para manutenção das membranas espermáticas e consequente efeito benéfico à motilidade (AMIRAT et al, 2004).

Figura 9 – Motilidade média progressiva do sêmen fresco antes e após a diluição $\pm$ erro padrão de 48 touros Nelore alimentados com as dietas experimentais: C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®]. ^{a,b}P = 0,06

As dietas contendo gordura protegida da degradação ruminal (grupos G e GA) reduziram o total de espermatozoides no sêmen fresco ($3106,36 \pm 407,69 \times 10^6$) em relação às dietas na ausência deste ingrediente (grupos A e C, $4261,62 \pm 499,61 \times 10^6$; $P = 0,07$). Por outro lado, a presença dos antioxidantes nas dietas (dietas A e GA) incrementou o número total de espermatozoides em relação às dietas sem antioxidantes (dietas C e G, $4224,09 \pm 496,88 \times 10^6$ vs $3133,96 \pm 410,2 \times 10^6$, respectivamente; $P = 0,09$). O selênio presente nos órgãos reprodutivos foi correlacionado com a concentração espermática do sêmen de touros (SMITH et al., 1979) e em humanos, as concentrações de selênio presentes no plasma seminal tiveram correlações positivas com o número total de espermatozoides (OLDEREID; THOMASSEN; PURVIS, 1998). Por outro lado, a concentração espermática e o volume do sêmen de búfalos não foram diferentes quando foram alimentados, por 63 dias, com dieta rica em AGP n-6 e vitamina E, em relação ao controle (ADEEL et al., 2009). Já, amostras seminais de carneiros alimentados com óleo de girassol apresentaram maior concentração espermática do que o sêmen de animais sob dieta contendo milho (SELVARAJU et al., 2012).

A porcentagem de espermatozoides normais foi reduzida pelas dietas contendo gordura protegida da degradação ruminal (GA e G; $89,14 \pm 0,77\%$), em relação à sua ausência nas dietas (A e C; $91,11 \pm 0,77\%$; $P = 0,09$). Aos 75 dias de período experimental, touros que receberam dietas contendo gordura protegida da degradação ruminal também tiveram maior porcentagem de defeitos totais ($P = 0,03$), em relação às dietas que não a continha em sua composição (Figura 10). Porém, nos outros momentos de avaliações, não foi encontrada diferença entre os grupos experimentais (C: $8,65 \pm 0,87\%$, G: $6,67 \pm 0,95\%$, A: $5,31 \pm 0,82\%$ e GA: $6,39 \pm 0,94\%$; $P = 0,75$). Similarmente, as porcentagens de defeitos maiores ($P = 0,82$) e menores ($P = 0,67$) também não foram influenciadas pelas dietas (Figura 11).

A redução no número de espermatozoides totais e aumento dos defeitos totais no sêmen fresco de touros que receberam gordura protegida da degradação ruminal, podem estar relacionados ao excesso de AGP, nos espermatozoides. Towhidi e Parks (2012) adicionaram AGP n-3 ao diluente seminal e verificaram que em concentrações maiores (100 ng/mL) diminuem a qualidade do sêmen descongelado, provavelmente por promover oxidação lipídica, com consequentes danos às membranas espermáticas. Apesar de não se ter realizado a análise da peroxidação lipídica no sêmen fresco, estes resultados podem ser associados a menor atividade de GSH-PX, no plasma seminal de touros alimentados com dietas sem antioxidantes (Figura 7), sendo insuficiente para controlar o processo de peroxidação lipídica. Desta forma, a sua deficiência pode resultar na emergência de anormalidades morfológicas (STRADAIOLI et al., 2009).

Por outro lado, ao se avaliar os defeitos no acrossoma, menor porcentagem foi detectada ($P = 0,07$) para o grupo alimentado com dieta GA ($0,62 \pm 0,19\%$) em relação à A ($1,18 \pm 0,26\%$), porém não diferiram dos outros grupos (C: $0,70 \pm 0,20\%$ e G: $1,03 \pm 0,27\%$). Apesar disso, a porcentagem de defeitos de acrossoma nos grupos experimentais está dentro dos limites recomendados pelo CBRA (1998).

Figura 10 – Porcentagem dos defeitos totais dos espermatozoides $\pm$ erro padrão do sêmen fresco de 48 touros Nelore alimentados por 75 dias com as dietas na presença ou ausência da gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico. *P = 0,03

Figura 11 – Porcentagem dos defeitos maiores e menores dos espermatozoides $\pm$ erro padrão do sêmen fresco de 48 touros Nelore alimentados com as dietas experimentais: C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com Economase[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e Economase[®]. P > 0,10

Há poucos experimentos que avaliaram o efeito das dietas com gordura e/ou antioxidantes nas características seminais de ruminantes, sendo que em sua maioria foi utilizado óleo de peixe (fonte de ácidos graxos n-3) e vitamina E, como antioxidante (DOLATPANAH et al., 2008; GHOLAMI et al., 2010). Apenas dois estudos utilizaram dieta com girassol (rica em ácido linoleico e vitamina E) no intuito de incrementar a qualidade seminal de ruminantes (ADEEL et al., 2009; SELVARAJU et al., 2012).

Os resultados relacionados ao sêmen fresco, obtidos no presente estudo foram contrários à hipótese inicial, em que se esperava superioridade na qualidade seminal pela combinação da gordura e antioxidantes na dieta em relação às outras dietas.

A motilidade espermática pré-congelação não foi afetada pela dieta com óleo de girassol (rico em AGP n-6 e α -tocoferol), fornecida por 63 dias para búfalos (ADEEL et al., 2009). Por outro lado, após 60 dias de suplementação com óleo de girassol, foi observada maior motilidade progressiva e velocidade espermática, em relação, aqueles animais alimentados com dieta à base de milho (SELVARAJU et al., 2012).

Dolatpanah et al. (2008) realizaram um experimento fatorial 2 x 2 por 11 semanas, em que incluíram, nas dietas de caprinos (n = 16), óleo de peixe (2,5% em MS) e/ou vitamina E (0,3 g/kg em MS) e observaram que a combinação dos dois ingredientes afetou positivamente o número de espermatozoides, motilidades total e progressiva e porcentagem de espermatozoides viáveis (avaliados pela coloração com eosina-nigrosina). Entretanto, apesar de o sêmen ter sido colhido por vagina artificial, o volume seminal não foi afetado pelas dietas experimentais, concordando com os nossos resultados.

A inclusão de fonte de AGP n-3 (100 g de fonte de DHA) na dieta, durante 12 semanas melhorou a qualidade de sêmen de touros holandeses (n = 19; GHOLAMI et al., 2010). O volume seminal (sêmen colhido por vagina artificial), a concentração e o total de espermatozoides não foram afetados, similar aos resultados do nosso estudo. Contudo, após nove semanas de suplementação, a dieta com DHA comparada ao grupo controle, proporcionou no sêmen fresco, aumento ($P < 0,05$) na motilidade total ($84,9 \pm 2,0$ vs $76,0 \pm 2,0\%$) e progressiva ($64 \pm 1,7$ vs $58,2 \pm 1,6\%$) avaliadas pelo sistema CASA, na VAP ($126, 3 \pm 2,8$ vs $118,1 \pm 2,6 \mu\text{m/s}$), integridade de membrana plasmática ($59,7 \pm 2,0$ vs $51,8 \pm 2,0\%$) e proporção de espermatozoides rápidos ($82,4 \pm 2,5$ vs $72,0 \pm 2,3\%$). Após 12 semanas de suplementação, a proporção de espermatozoides viáveis do sêmen fresco também foi maior para o grupo tratado ($73,6 \pm 4,9$ vs $59,2 \pm 4,6\%$). Por outro lado, quando a motilidade do sêmen foi avaliada

subjetivamente, assim como obtivemos em nossos resultados, a suplementação não interferiu neste parâmetro (GHOLAMI et al., 2010). Além disso, Samadian et al. (2010) verificaram que dieta a base de óleo de peixe, fornecidas por 13 semanas, atenuou o declínio na qualidade de sêmen de carneiros ($n = 8$) devido a mudanças sazonais. Esta dieta proporcionou maiores concentrações espermáticas ($4,3 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^8$ vs $3,9 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^8$ espermatozoides/mL) e porcentagem de espermatozoides moveis ($77,25 \pm 3,34$ vs $60,8 \pm 3,34\%$) e com motilidade progressiva ($74,13 \pm 1,69$ vs $62,69 \pm 1,69\%$), em relação ao grupo controle.

Em suínos, Rooke, Shao e Speake (2001) reportaram que a suplementação de dietas com óleo de peixe associado ao excesso de antioxidante (acetato de α -tocoferol) por 6 semanas provocou aumento na viabilidade, proporção de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normal. Entretanto, a concentração espermática não variou entre os tratamentos. De acordo com nossos achados, a combinação de AGP (n-3) e antioxidante aumentou a porcentagem de espermatozoides com acrossoma normal, em relação à dieta controle (na ausência de gordura).

Strzeżek et al. (2004) investigaram o efeito da suplementação dietética contendo AGP com maior proporção n-3/n-6 e antioxidantes como vitaminas E e C e selênio, por 24 semanas, nas características do sêmen de suínos. Esta dieta incrementou a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e a resistência osmótica da membrana acrossomal. No entanto, concordando com nossos resultados, esta dieta não afetou a porcentagem de espermatozoides móveis e anormais. Em outro estudo, fonte de AGP n-3 adicionada à dieta por nove semanas, apesar de alterar a proporção de AGP n-6 no sêmen de suínos, não afetou as taxas de não retorno ao cio de fêmeas suínas inseminadas com este sêmen (PAULENZ et al., 1995). Da mesma forma, a adição de gordura animal hidrogenada, óleo de peixe contendo 18% de DHA e 15% de EPA ou 33% de DHA e 6,5% de EPA em dietas para suínos por seis meses, também não interferiu na motilidade, morfologia, viabilidade, integridade acrossomal, integridade de cromatina e susceptibilidade a oxidação de espermatozoides, antes da criopreservação (CASTELLANO et al., 2010).

Apesar de não haver interação entre o período e os tipos de dietas experimentais fornecidos ($P = 0,80$), ocorreu uma queda significativa ($P < 0,001$) de 21,5% na motilidade progressiva do sêmen fresco, do início ao término do período experimental (Figura 12).

Figura 12 – Motilidade média progressiva do sêmen fresco $\pm$ erro padrão de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,001$

Houve efeito ($P < 0,01$) do tempo de fornecimento das dietas experimentais no volume seminal (Figura 13A), número total de espermatozoides (Figura 13B), turbilhonamento (Figura 13C), vigor (Figura 13D), porcentagem de defeitos espermáticos total, maiores e menores (Figura 13E) e porcentagem de cabeças espermáticas aglutinadas (Figura 13F). Os valores correspondentes à morfologia espermática ao longo do período experimental (Figura 13 E) estão dentro dos limites preconizados pelo CBRA (1998).

A **B**

C

D

E

F

Figura 13 – Volume (A), número total de espermatozoides (B), turbilhonamento (C), vigor (D), porcentagem de defeitos espermáticos totais, maiores e menores (E), porcentagem de cabeças espermáticas aglutinadas (F) $\pm$ EP do sêmen fresco de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,01$

Associado aos nossos resultados em que utilizamos dietas com alta energia, Fourie et al. (2004) e Labuschagne et al. (2002) indicaram que em geral, maiores níveis energéticos na dieta de touros novos e carneiros, respectivamente, é vantajoso para o desempenho produtivo, entretanto pode comprometer as características seminais, devido à deposição de gordura na bolsa escrotal (BARTH et al., 2008; FOURIE et al. 2004; LABUSCHAGNÉ et al., 2002), principalmente no plexo pampiniforme. Esta gordura pode interferir com processos termorregulatórios dos testículos, os quais são vitais para a espermatogênese. De fato, Fourie et al. (2004) relataram queda motilidade total e do turbilhonamento do sêmen, quando carneiros ($n = 32$) foram transferidos do sistema extensivo a pasto para intensivo com fornecimento de dieta *ad libitum* ($80,5 \pm 2,3\%$ e $3,3 \pm 0,2$ vs $50,1 \pm 3,8\%$ e $2,3 \pm 0,3$, respectivamente).

Além disso, podem ter contribuído para redução nos parâmetros do sêmen fresco, no período experimental, possíveis efeitos de estresse de manejo intenso dos animais para colheita de sêmen e estresse térmico do verão, período em que foi realizado o presente estudo (Figura 4).

A temperatura ambiente e o índice pluviométrico foram positivamente relacionados com a porcentagem de espermatozoides anormais (CHACÓN et al., 1999) e a diminuição no número espermático (TAYLOR et al., 1985). Nichi et al. (2006)

encontraram similar motilidade espermática no verão e no inverno, porém maior proporção de defeito espermáticos totais e menores foi observada no verão para touros Nelore (*Bos taurus indicus*, n = 11), criados extensivamente. Touros Nelore (n = 10) apresentaram superioridade seminal quanto à diminuição da motilidade, defeitos menores e totais, na estação seca em relação à chuvosa, entretanto a motilidade espermática foi superior no verão (SILVA, 2012). A produção espermática (volume do ejaculado, concentração espermática e número total de espermatozoides) e a porcentagem de células espermática normais diminuíram durante a estação quente em touros zebuínos, na África (IGBOELI; RAKHA, 1971).

Altas temperaturas ambientais causam aumento na temperatura testicular e consequentemente, comprometimento da produção e qualidade espermática devido à geração de ERO resultante da hipóxia testicular (SETCHELL, 1998). Baseando-se nas mudanças encontradas na atividade da GSH-PX (Figura 6), sugere-se que isto ocorreu em resposta ao estresse oxidativo nos animais, devido ao estresse de manejo e/ou estresse térmico.

Sabe-se que amostras espermáticas que possuíram menores concentrações de selênio e atividade GSH-Px total e maiores níveis de peróxido lipídico tenderam a ter motilidades inferiores. Balić et al. (2012) encontraram, durante o verão, redução na motilidade progressiva, o que pode estar associada ao maior processo oxidativo encontrado no plasma seminal (TBARS) e nos espermatozoides (TBARS e conteúdo de carbonil protéico) e à atividade insuficiente da GSH-Px dos espermatozoides para neutralizar esta oxidação da motilidade progressiva. A mimetização do estresse térmico pela insulação escrotal por apenas quatro dias, em touros Nelore (n=12), foi suficiente para diminuir, por um período de 31 dias após, o número total de espermatozoides, a motilidade, a proporção de espermatozoides normais (BRITO et al., 2003). Em touro curraleiro raça adaptada ao clima do Brasil também tiveram queda na motilidade, vigor e número de espermatozoides após insulação escrotal (PEZZINI et al., 2006).

Por outro lado, Chacur et al. (2013) não verificaram, no verão, alteração na motilidade espermática e na morfologia espermática de touros Nelore (n = 5). Similarmente, não houve efeito da temperatura ambiental na produção e qualidade espermática de touros *Bos indicus* avaliados por 2 anos consecutivos (BRITO et al., 2002). Uma melhor qualidade do pasto no verão observada nos trabalhos apresentados pode ter contribuído para estas diferenças dos resultados encontrados em nosso experimento em que os animais foram confinados. Além disso, pequenas variações de

temperatura ambiental relatadas nestes estudos podem ter sido incapazes de mostrar efeito do fator temperatura sob a redução dos parâmetros espermáticos.

A técnica de colheita de sêmen por eletroejaculação foi utilizada, pois os touros não estavam treinados para que o sêmen fosse colhido por vagina artificial. Entretanto, o método por eletroejaculação pode produzir maiores volumes e menor concentração espermática, provavelmente devido à estimulação elétrica das glândulas anexas e consequente alteração em sua função secretória de fluido (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012). Além disso, o manejo intenso de colheita de sêmen por eletroejaculação pode provocar estresse aos animais, sendo um provável fator de comprometimento da qualidade seminal, ao longo do período experimental. Carneiros (n = 10) submetidos à eletroejaculação, por 11 vezes com intervalo de duas semanas entre elas, tiveram respostas ao estresse, tais como, aumento da vocalização; concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, proteínas totais e creatina quinase; frequências cardíaca e respiratória e, redução do hematócrito, hemoglobina, células vermelhas e concentrações de fosfatase alcalina e testosterona (DAMIÁN; UNGERFELD, 2011). O fato de as concentrações de testosterona diminuírem, após o procedimento de colheita de sêmen, pode estar associado a um mecanismo de supressão dos corticoides à liberação de GnRH ou LH (JUNIEWICZ; JOHNSON; BOLT, 1987; MATTERI; WATSON; MOBERG, 1984). Da mesma forma, em touros de corte (n = 9) após a eletroejaculação, houve aumento na vocalização e nas concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona, biomarcadores do estresse, secretados pelas adrenais, em relação aos animais que tiveram a probe retal inserida sem estímulo da eletroejaculação ou aqueles que não foram manejados para colheita de sêmen (WHITLOCK et al., 2012).

4.6 Avaliações espermáticas do sêmen pós-descongelção

4.6.1 Análise da peroxidação lipídica

As membranas espermáticas são ricas em AGP e possuem limitado componente antioxidante no citoplasma, assim os espermatozoides são susceptíveis à peroxidação lipídica na presença de ERO. Além disso, algumas etapas do processo de criopreservação são envolvidas na produção de ERO (BILODEAU et al., 2000).

Uma simples ferramenta para avaliar o efeito da peroxidação lipídica nos espermatozoides é por meio da determinação de malanoaldeído (MDA), uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico que é um produto estável da peroxidação lipídica

(KASIMANICKAM et al., 2007), já que ERO possuem meia-vida curta, sendo difíceis de serem mensuradas diretamente.

Este foi o primeiro trabalho em que se avaliou a peroxidação lipídica pós-descongelação de sêmen de bovinos sob dietas contendo ou não antioxidantes/gordura protegida da degradação ruminal.

A produção de TBARS do sêmen pós-descongelação não diferiu entre os tratamentos (C: $105,72 \pm 5,82$; G: $112,04 \pm 5,82$; A: $116,65 \pm 5,82$, GA: $114,92 \pm 5,82$ ng/ 10^6 espermatozoides; $P = 0,50$). De acordo com estes achados, Castellano et al. (2010) trabalhando com três dietas para suínos, contendo gordura animal hidrogenada, óleo de peixe (18% de DHA e 15% de EPA) e outra contendo óleo de peixe com 33% de DHA e 6,5 % de EPA) também não encontraram diferença nos níveis de peroxidação lipídica para o sêmen após estocagem a 17°C por 15 dias ($n = 18$) e criopreservação convencional ($n = 18$). Por outro lado, a formação de MDA no sêmen fresco de carneiros alimentados com óleo de girassol foi menor do que aqueles que receberam milho, como fonte de energia (SELVARAJU et al., 2012).

As concentrações de TBARS variaram durante o período experimental ($P < 0,001$; Figura 14), apesar de os valores serem menores do que os relatados por Nichi et al. (2006), que encontraram concentrações médias de $728,1 \pm 79,3$ ng/mL, no verão e $423,8 \pm 72,6$ ng/mL, no inverno, no sêmen de touros Nelore.

Contrariando os resultados encontrados, a suplementação dietética com fonte de n-3 com antioxidantes causou aumento na peroxidação lipídica (MDA) que foi compensado pela ação da atividade da enzima superóxido dismutase, nos espermatozoides e plasma seminal, associados a maior concentração de ascorbato no plasma seminal (STRZEZEK et al., 2004).

Figura 14 – Concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBRAS) $\pm$ EP do sêmen pós-descongelamento de 48 touros Nelore alimentados com dietas com ou sem gordura protegida da degradação ruminal, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,001$

Valores mais elevados de TBARS no sêmen podem comprometer a qualidade espermática. A peroxidação lipídica dos espermatozoides foi identificada como um importante preditor da fertilidade de touros (OLIVEIRA et al., 2013). Nichi et al. (2006) verificaram uma correlação positiva entre a intensidade da peroxidação lipídica e defeitos primários dos espermatozoides do sêmen fresco de touros Simental. A peroxidação lipídica (TBARS) do sêmen descongelado de touros (holandeses, $n = 4$ e Jersey, $n = 4$) foi negativamente relacionada com o número de descendentes ($r = -0,78$; $P < 0,05$), integridade de membrana plasmática ($r = -0,78$; $P < 0,05$) e motilidade progressiva ($r = -0,83$; $P < 0,05$) e positivamente com o índice de fragmentação de DNA ($r = 0,86$; $P < 0,001$; KASIMANICKAM et al., 2007).

As maiores concentrações de TBARS relatadas ao longo do período experimental (Figura 14) podem estar associadas às mudanças na temperatura ambiental (Figura 4), no momento em que o sêmen foi colhido, conforme discutimos acima, tornando-o mais susceptível ao estresse oxidativo após o processo de congelamento/descongelamento.

4.6.2 Análise computadorizada da cinética espermática

A utilização do sistema CASA é importante para determinar a qualidade do sêmen, pois são realizadas análises repetidas de múltiplas características da motilidade espermática (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, os seus parâmetros cinéticos podem ser associados a efeitos da fertilidade *in vivo* de touros. Avaliando-se a relação entre análise computadorizada das características espermáticas e as taxas de concepção de touros (Angus, n = 3) utilizados em um mesmo programa de inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore, foram encontrados como importantes preditores da fertilidade: as motilidades total e progressiva, BCF (após 2 horas de incubação térmica do sêmen) e porcentagem de células em movimento rápido (OLIVEIRA et al., 2013). As VCL e VAP também foram relacionadas com o processo de fecundação, uma vez que, são aumentadas após a capacitação espermática (VERSTEGEN et al., 2002).

A motilidade total avaliada no sistema CASA foi fracamente correlacionada com a fertilidade a campo ($r = 0,34$), enquanto a motilidade progressiva, ALH, BCF e VSL tiveram 0,89 de correlação (FARRELL et al., 1998). Além disso, a motilidade progressiva associada com um movimento lateral de cabeça aumentado foi relacionada com a habilidade do espermatozoide em penetrar no muco cervical (MORTIMER; MAXWELL, 2004).

Este foi o primeiro experimento em que se avaliou o efeito de dietas contendo gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes na qualidade seminal pós-criopreservação do sêmen de ruminantes. A maioria dos estudos relata a utilização de óleo de peixe como fonte de AGP na dieta e a adição de antioxidantes no diluente.

Esperava-se que os AGPs fornecidos pelas dietas experimentais aumentassem a fluidez da membrana plasmática espermática, especialmente para o sêmen pós-descongelado. Por outro lado, os AGPs poderiam também elevar a susceptibilidade a peroxidação lipídica. Desta forma, dietas contendo antioxidantes poderiam controlar este processo e resultados superiores da qualidade seminal para a combinação da gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes na dieta foram hipotetizados. Entretanto, contrariando a hipótese inicial, as motilidades total e progressiva do sêmen pós-descongelamento foram similares entre os grupos experimentais ($P > 0,10$; Figura 15).

Figura 15 – Motilidades total e progressiva $\pm$ erro padrão do sêmen pós-descongelamento de 48 touros Nelore alimentados com as dietas experimentais: C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®]. $P > 0,10$

A adição de gordura protegida da degradação ruminal e/ou antioxidantes na dieta também não interferiu nos parâmetros de cinética espermática (Tabela 9), apesar de a BCF apresentar tendência ($P = 0,10$) de aumento no sêmen pós-descongelamento de touros alimentados com a dieta G em relação à C e GA, não diferindo da dieta A (Tabela 9).

Tabela 9 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da cinética espermática avaliada por sistema computadorizado do sêmen pós-descongelamento de 48 touros alimentados com dietas experimentais, durante 75 dias

Parâmetro ⁽²⁾	Dietas experimentais ⁽¹⁾				
	C	G	A	GA	P
VAP	65,0 $\pm$ 1,94	64,0 $\pm$ 1,94	63,3 $\pm$ 1,94	63,6 $\pm$ 1,94	0,74
$\mu\text{m/s}$	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	
VSL	53,7 $\pm$ 1,30	52,2 $\pm$ 1,30	52,2 $\pm$ 1,30	51,6 $\pm$ 1,30	0,72
$\mu\text{m/s}$	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	
VCL	107,4 $\pm$ 3,10	104,5 $\pm$ 3,10	102,9 $\pm$ 3,10	105,1 $\pm$ 3,10	0,41
$\mu\text{m/s}$	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	
ALH	5,6 $\pm$ 0,24	5,6 $\pm$ 0,24	5,4 $\pm$ 0,24	5,3 $\pm$ 0,24	0,97
μm	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	
BCF	24,4 $\pm$ 0,81a	25,8 $\pm$ 0,81b	25,0 $\pm$ 0,81ab	23,4 $\pm$ 0,81a	0,10
Hz	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	
LIN	52,5 $\pm$ 1,37	51,3 $\pm$ 1,37	51,9 $\pm$ 1,37	50,2 $\pm$ 1,37	0,85
%	(n = 67)	(n = 70)	(n = 67)	(n = 68)	

⁽¹⁾ C = dieta controle; G = dieta com gordura protegida da degradação ruminal rica em ácido linoléico; A = dieta com EconomasE[®] (fonte de vitamina C e selênio); GA = dieta com associação de Megalac-E[®] e EconomasE[®].

⁽²⁾ VAP = velocidade de trajeto; VSL = velocidade retilínea; VCL = velocidade curvilínea; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimentos; LIN = linearidade.

Corroborando nossos achados, Gholami et al. (2010) não encontraram diferença nos parâmetros de motilidade e velocidades espermáticas, avaliadas pelo sistema CASA, de sêmen pós-criopreservação proveniente de touros suplementados ou não com fonte de AGP n-3. Resultados semelhantes foram obtidos por Castellano et al. (2010), em que machos suínos foram alocados em três dietas, as quais foram fornecidas por longo período (6-7 meses), sendo a dieta basal acrescida de: 1) gordura animal hidrogenada, 2) óleo de peixe, fonte de 18% de DHA e 15% de EPA e 3) óleo de peixe contendo 33% de DHA e 6,5% de EPA. A suplementação lipídica não influenciou na motilidade e integridades acrossomal e cromatínica de espermatozoides de sêmen de suíno, após estocagem do sêmen a 17°C ou após criopreservação convencional.

Trabalhos relacionados ao efeito dos antioxidantes e especialmente de AGP dietéticos nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de sêmen de ruminantes são escassos, sendo que a maioria deles encontrou efeitos positivos.

Ao contrário dos nossos achados, a alimentação com óleo de girassol (rico em AGP n-6 e α -tocoferol) aumentou a motilidade após a congelação do sêmen de búfalos (ADEEL et al., 2009). Dieta contendo AGP com maior proporção n-3/n-6 e antioxidantes como vitaminas E e C e selênio também elevou a motilidade e a porcentagem de espermatozoides com resistência osmótica da membrana acrossomal, preservados a 5°C (STRZEŹEK et al., 2004). Além disso, foi observado aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, concomitante com a produção de MDA. Assim, a dieta rica em AGP causou aumento na peroxidação lipídica que foi compensado pela ação dos antioxidantes (STRZEŹEK et al., 2004).

Apesar de as concentrações séricas de selênio terem sido maiores para os animais que receberam dietas com antioxidantes, não foi possível obter diferenças na qualidade seminal pós-congelação. Porém a maioria dos estudos encontrados mostra que ao adicionar-se selênio ou vitamina C ao diluente previamente à criopreservação obtiveram-se resultados favoráveis. Por outro lado, sêmen bovino congelado com diluente contendo ascorbato também não teve alteração na motilidade espermática (FOOTE; BROCKETT; KAPROTH, 2002).

Contrariando os resultados do presente experimento, efeitos positivos foram encontrados pela adição de AGP n-3 e vitamina E ao diluente, incrementando as motilidades total e progressiva pós-descongelação, em relação a diluentes que não continham estes componentes ($54,3 \pm 1,3$ vs $30,2 \pm 1,3\%$ e $48,6 \pm 0,7$ vs $28,5 \pm 0,7\%$, $P \leq 0,05$, respectivamente) em touros Pardo Suíço (TOWHIDI; PARKS, 2012) e em Holandeses ($50,0 \pm 0,45$ vs $23,8 \pm 0,45\%$ e $45,0 \pm 0,28$ vs $19,3 \pm 0,28\%$, respectivamente; $P \leq 0,05$; NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012). Os autores verificaram que o efeito positivo encontrado foi devido a maiores porcentagem de DHA e proporção de n-3/n-6 nos espermatozoides, antes e após a criopreservação. Além disso, AGP podem se agregar na membrana lipídica dos espermatozoides, principalmente no flagelo, onde a maior fluidez resultante promove maior motilidade espermática. Adicionalmente, maiores motilidade espermática, VSL, LIN, VAP, ALH e integridade de acrossoma também foram alcançadas para sêmen de touro congelado com diluente contendo ácido ascórbico (HU et al., 2010). Para sêmen de touros de alta qualidade (motilidade progressiva entre 60 a 80% e vigor de 5) congelados na presença de antioxidantes (vitamina E e ácido ascórbico), houve maior motilidade e porcentagem de acrossoma e mitocôndria intactos e menor produção de MDA. Entretanto, para

sêmen de baixa qualidade (motilidade progressiva de 30 a 50%, vigor de 2) por pré-existirem alterações na membrana plasmática, não foi observado este efeito protetor dos antioxidantes nas membranas espermáticas (BECONI; FRANCIA; MORA, 1993).

A porcentagem média de redução da motilidade progressiva do sêmen pós-descongelção em relação à motilidade progressiva do sêmen fresco diminuiu em 14,34% do período de adaptação para o período de fornecimento das dietas experimentais ($83,80 \pm 2,25$ vs $69,46 \pm 1,76\%$, respectivamente; $P < 0,001$), porém não foi afetada pelos tratamentos ($P = 0,47$).

Durante o período experimental, houve alterações ($P < 0,001$) na porcentagem da motilidades total e progressiva (Figura 16A) e na porcentagem de redução da motilidade progressiva do sêmen pós-descongelção em relação à motilidade progressiva do sêmen fresco (Figura 16B). Esta queda na relação das motilidades pré e pós-congelção pode ser relacionada ao método de colheita de sêmen utilizado. A eletroejaculação pode alterar a composição química (proteína, concentrações de sódio, antioxidantes) do plasma seminal ao se estimular as glândulas anexas e consequente mudança da sobrevivência espermática à congelção (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012).

A recuperação da motilidade total e progressiva pós-descongelção, ao longo do período experimental, pode ser devido às menores concentrações espermáticas de TBARS encontradas (Figura 14). Sabe-se que ERO lesam a estrutura da membrana plasmática e compromete a função e motilidade espermáticas (AITKEN; BAKER, 2006).

A

B

Figura 16 – Porcentagem de motilidades total e progressiva (A) e redução motilidade progressiva do sêmen pós-descongelamento em relação à motilidade progressiva do sêmen fresco (B) $\pm$ EP do sêmen pós-descongelamento de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,001$

Os processos de congelamento e descongelamento comprometem negativamente as características espermáticas, relacionadas à ultraestrutura, bioquímica e funcional, resultando em redução na motilidade (YOSHIDA, 2000). A criopreservação diminuiu a proporção de espermatozoides móveis e viáveis, a integridade acrossomal e aumentou a fragmentação do DNA e a peroxidação lipídica (CASTELLANO et al., 2010; MAIA et al., 2010). Além disso, os diluentes são fonte de geração de ROS, mesmo na ausência de

células (MAIA et al., 2010). As perdas na motilidade progressiva (Figura 14 B) relacionadas ao processo de criopreservação do sêmen, em outros estudos, foram menores do que as encontradas no presente estudo, provavelmente por não termos selecionado touros, baseando-se na congelabilidade do sêmen. Gholami et al. (2010) relataram perda de 50,41% e 53,55% para motilidade total e 47,93% e 49,13% para motilidade progressiva de touros suplementados com dietas controle e com fonte de DHA, respectivamente.

Não houve efeito do período experimental nas VAP ($64,74 \pm 1,5 \mu\text{m/s}$; $P = 0,48$), VSL ($53,32 \pm 1,09 \mu\text{m/s}$; $P = 0,44$), VCL ($103,69 \pm 2,54 \mu\text{m/s}$; $P = 0,33$), BCF ($22,84 \pm 0,73 \text{ Hz}$; $P = 0,39$) e LIN ($53,36 \pm 1,15\%$; $P = 0,77$). Entretanto, a ALH variou durante o período experimental ($P = 0,07$; Figura 17). Alterações observadas na ALH podem ser relacionadas à hiperativação e capacitação espermática que favorecem a penetração do ovócito (SUAREZ et al., 1991), porém não houve efeito de período experimental para avaliação de espermatozoides capacitados (porcentagem de espermatozoides viáveis com desestabilização de MP, resultados mostrados adiante). De fato, a hiperativação espermática foi definida por Mortimer e Maxwell (1999) quando os valores de VCL e ALH foram superiores a $250 \mu\text{m/s}$ e $9 \mu\text{m}$, respectivamente; VSL e LIN menores ou iguais a $100 \mu\text{m/s}$ e 30%, o que não foi relatado neste estudo.

Figura 17 – Amplitude lateral da cabeça espermática $\pm$ EP do sêmen pós-descongelção de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,10$

4.6.3 Análise espermática da integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez da membrana plasmática e potencial mitocondrial por citometria de fluxo

Este foi o primeiro trabalho em que se utilizou a citometria de fluxo para avaliar o sêmen congelado de bovinos sob dietas com gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes.

A utilização da citometria de fluxo utilizada para avaliações espermáticas é objetiva e possui alta repetibilidade experimental, permitindo analisar milhares de células em curto tempo, e usar fluorocromos combinados para verificar alterações na estrutura e função dos espermatozoides (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; HALLAP et al., 2006).

A integridade das membranas espermáticas do sêmen de touros pós-descongelamento é considerada um bom parâmetro preditor da taxa de concepção de vacas Nelore (JANUSKAUSKAS, JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; OLIVEIRA et al., 2013), ou seja, está envolvida na capacidade de um touro em fertilizar (KASINANICKAM et al., 2007). Além disso, a peroxidação lipídica foi negativamente relacionada à integridade da membrana plasmática, o que implica na redução do potencial de fecundação dos espermatozoides (KASINANICKAM et al., 2007).

Houve interação entre o tipo de dieta (presença ou ausência da gordura protegida na dieta) e o período experimental avaliado ($P = 0,04$) para a porcentagem de espermatozoides com MP íntegra e MA não reagida (Figura 18). Aos 75 dias de fornecimento das dietas experimentais, a porcentagem de espermatozoides com MP íntegra e MA não reagida foi maior para touros alimentados com dietas que não continham gordura em sua composição ($62,19 \pm 2,87\%$ vs $53,34 \pm 2,87\%$; $P < 0,05$; Figura 18). Por outro lado, em outro estudo, a integridade das membranas plasmática e acrossomal, após a incubação do sêmen por 24 horas a 4°C , foi maior para espermatozoides de carneiros alimentados com dieta rica em ácido linoleico (óleo de girassol), em relação ao milho (SELVARAJU et al., 2012). Para touros holandeses sob dieta rica em AGP n-3, encontrou-se tendência ($P = 0,10$) em aumentar a porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (positivos ao teste hiposmótico), no sêmen pós-descongelamento (GHOLAMI et al., 2010). Similarmente, maior integridade da membrana foi encontrada para sêmen de touros congelados com diluente contendo ácido ascórbico (HU et al., 2010).

Figura 18 – Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática (MP) íntegra e membrana acrossomal (MA) não reagida $\pm$ EP do sêmen pós-descongelção de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). * $P < 0,05$

Touros que receberam dietas ausentes de antioxidantes (C e G), por 65 dias apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com MP lesada e MA reagida, em relação às dietas que os continha ($5,23 \pm 1,13\%$ vs $1,99 \pm 1,13\%$, $P = 0,04$. Figura 19). Da mesma forma, maior porcentagem de acrossomas intactos foi relatada para sêmen de touros congelados com diluente contendo ácido ascórbico (HU et al., 2010) e vitamina E (BECONI; FRANCA; MORA, 1993). Além disso, o nível de selênio nos espermatozoides foi correlacionado com a porcentagem de membranas espermáticas intactas e com a taxa de prenhez, no sêmen de equinos (BERTELSMANN et al., 2010). Em sêmen de coelhos alimentados com óleo de linhaça (rico em AGP n-3), a vitamina E protegeu a espermatozoides da reação acrossomal (MOURVAKI et al., 2010).

Figura 19 – Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática (MP) lesada e membrana acrossomal (MA) reagida $\pm$ EP do sêmen pós-descongelção de 48 touros Nelore, alimentados com dietas com ou sem antioxidantes, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). * $P < 0,05$

As dietas não afetaram a porcentagem de espermatozoides com MP lesada e MA não reagida (C: $36,09 \pm 3,09\%$; G: $38,52 \pm 3,09\%$; A: $35,58 \pm 3,09\%$; GA: $35,48 \pm 3,09\%$, $P = 0,69$), MP íntegra e MA reagida (C: $5,42 \pm 0,99\%$; G: $6,74 \pm 0,99\%$; A: $6,80 \pm 0,99\%$; GA: $6,56 \pm 0,99\%$, $P = 0,44$). Entretanto, estes parâmetros variaram ao longo do período experimental ($P < 0,01$, Figura 20).

Figura 20 – Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática (MP) lesada e membrana acrossomal (MA) não reagida (%); MP íntegra e MA reagida (C) $\pm$ EP do sêmen pós-descongelamento de 48 touros Nelore, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). $P < 0,05$

O status da capacitação foi verificado utilizando fluorocromo merocianina, o qual detecta o nível de desorganização dos lipídios da membrana plasmática, que ocorre no início da capacitação pelas alterações na membrana (HALLAP et al., 2006). Em relação ao fluorocromo Yo-Pro1, combinado à merocianina, detecta-se a viabilidade espermática, uma vez que, é impermeável à membrana e quando é lesada, consegue se ligar ao DNA (HALLAP et al., 2006). A porcentagem de espermatozoides viáveis com estabilidade de membrana plasmática (não capacitados) pós-descongelamento foi

influenciada pelo tempo de fornecimento das dietas experimentais e a presença ou ausência na dieta da gordura protegida da degradação ruminal ($P = 0,05$). Aos 15 dias, dietas A e C aumentaram a proporção de espermatozoides viáveis com MP estável em relação àquelas na presença da gordura ($60,30 \pm 4,25\%$ vs $49,07 \pm 4,25\%$, respectivamente), porém, aos 65 dias, a proporção de espermatozoides viáveis com MP estável em relação àquelas na presença da gordura foi reduzida ($52,71 \pm 2,62\%$ vs $60,42 \pm 2,62\%$, Figura 21).

Figura 21 – Porcentagem de espermatozoides viáveis com membrana plasmática (MP) estável $\pm$ EP do sêmen pós-descongelamento de 48 touros Nelore alimentados com dietas com ou sem gordura protegida da degradação ruminal, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). * $P = 0,05$

Além disso, houve tendência ($P = 0,10$) de maior porcentagem de espermatozoides mortos pós-descongelamento de touros que receberam dietas contendo gordura (G e GA) por 15 d, em relação àqueles que foram alimentados com dietas em sua ausência (A e C, Figura 22), sugerindo que pode ter ocorrido maior peroxidação lipídica nos espermatozoides provenientes de touros que receberam gordura na dieta, resultando em morte celular. Porém, a presença de antioxidantes (GA) não foi suficiente para evitar este processo de lesão celular.

Contrariando os resultados do presente experimento, efeitos positivos foram encontrados pela dieta rica em AGP n-3 que teve tendência ($P = 0,10$) em aumentar a porcentagem de espermatozoides viáveis de sêmen pós-descongelado de touros

(GHOLAMI et al., 2010). Da mesma forma, a adição de AGP n-3 e vitamina E ao diluente aumentou a viabilidade do sêmen pós-descongelção, em relação a diluentes que não continham estes componentes em touros Pardo Suíço ($57,3 \pm 0,3$ vs $37,3 \pm 0,3\%$, respectivamente; $P \leq 0,05$; TOWHIDI; PARKS, 2012) e em Holandeses ($55,0 \pm 0,68$ vs $29,2 \pm 0,68\%$, respectivamente; $P \leq 0,05$; NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012). A sobrevivência de espermatozoides preservados a 5°C e 16°C foi maior para suínos suplementados com a combinação dietética de AGP n-3 e antioxidantes (STRZEZEK et al., 2004). Por outro lado, nenhum efeito foi encontrado na viabilidade espermática após estocagem a 17°C ou após criopreservação convencional do sêmen de suínos alimentados com fonte de AGP n-3 (CASTELLANO et al., 2010).

Figura 22 – Porcentagem de espermatozoides mortos $\pm$ EP do sêmen pós-descongelção de 48 touros Nelore alimentados com dietas com ou sem gordura protegida da degradação ruminal, durante o período experimental (em relação ao período de fornecimento das dietas experimentais, sendo aquela referente ao período de adaptação realizada no Dia 0). ** $P = 0,10$

A porcentagem de espermatozoides viáveis com desestabilidade de MP (capacitados) foi similar entre os tratamentos (C: $0,52 \pm 0,02$; G: $0,11 \pm 0,02$; A: $0,11 \pm 0,02$; GA: $0,11 \pm 0,02\%$; $P = 0,28$), além disso, não houve efeito de período experimental ($0,21 \pm 0,09\%$; $P = 0,35$). Comparando a porcentagem de espermatozoides viáveis com desestabilidade de membrana plasmática do sêmen pós-descongelção com a proporção de cabeças espermáticas aglutinadas do sêmen fresco (Figura 13 F), valores foram similares após a criopreservação, sugerindo que este processo não afetou a capacitação espermática. Da mesma forma, Mourvaki et al. (2010) suplementaram

coelhos com dietas em ácido linolênico e não obtiveram efeito na capacitação espermática.

Sabe-se que, antioxidantes podem proporcionar a redução na porcentagem de espermatozoides capacitados de sêmen bovino, visto na adição das vitaminas E e C ao diluente (O'FLAHERTY; BECONI; BEORLEGUI, 1997). Além disso, a redução no nível de colesterol e o aumento nos AGPs espermáticos podem aumentar a susceptibilidade da célula à capacitação e reação acrossomal. Por outro lado, a presença de antioxidantes na dieta pode reduzir estes processos (MOURVAKI et al., 2010). Provavelmente, o conteúdo de AGP nas membranas espermáticas, proveniente da dieta, no presente estudo, não foi capaz de aumentar a desorganização lipídica e resultar em espermatozoides capacitados, propiciando maior estabilidade da membrana plasmática (Figura 21).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo fluorocromo o qual é transportado ativamente na respiração espermática e se acumula na mitocôndria, fluorescendo em verde, permite identificar a função mitocondrial (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). Alta correlação positiva ($r = 0,87$) foi encontrada entre a função mitocondrial e motilidade progressiva pós-congelação (CELEGHINI et al., 2007; HALLAP et al., 2006), uma vez que os espermatozoides precisam de mais energia produzida pelas mitocôndrias para o batimento flagelar (FORERO-GONZALEZ et al., 2012). A proporção de espermatozoides sem (C: $39,44 \pm 2,97$; G: $40,35 \pm 2,97$; A: $40,51 \pm 2,97$, GA: $40,35 \pm 2,97\%$; $P = 0,85$) ou com potencial mitocondrial (C: $60,15 \pm 2,97$; G: $59,42 \pm 2,97$; A: $59,28 \pm 2,97$, GA: $59,37 \pm 2,97\%$; $P = 0,89$) foi similar entre os tratamentos e ao longo do período experimental ($41,97 \pm 2,56\%$; $P = 0,46$ e $57,6 \pm 2,53\%$; $P = 0,45$, respectivamente). Entretanto, Selvaraju et al. (2012) verificaram maior potencial mitocondrial após a incubação por 24 horas a 4°C de espermatozoides de carneiros alimentados com dieta rica em ácido linoleico, do que aqueles que receberam dieta com milho. Os valores foram superiores aos relatados por Celeghini et al. (2008), que obtiveram em torno de 24% de função mitocondrial. Contrariando os nossos achados, a suplementação com óleo de girassol (rico em ácido graxo linoleico) por 60 dias reduziu os níveis de peroxidação lipídica do sêmen incubado a 4°C por 24 horas e maior potencial da membrana mitocondrial foram obtidos (SELVARAJU et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

A combinação de gordura protegida da degradação ruminal e antioxidantes na dieta não incrementaram a qualidade espermática antes e após o processo de criopreservação.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A maioria dos efeitos negativos para viabilidade seminal pós-descongelação foi relacionada ao sêmen de touros alimentados com gordura. Pelo fato de os animais não terem sido selecionados pela congelabilidade seminal, especula-se que espermatozoides destes animais apresentavam baixos níveis de AGP, os quais podem ter sido altamente susceptíveis à peroxidação lipídica, o que pode ter resultado em comprometimento da fluidez da membrana plasmática. Associado a este fato, as concentrações circulantes de AGP podem ter refletido uma proteção ruminal inadequada da gordura, permitindo que tenha maior biohidrogenação com consequente menor absorção de AGP. Uma alternativa seria aumentar o nível de inclusão de AGP na dieta para garantir maiores concentrações circulantes e espermáticas.

Por outro lado, a dieta contendo antioxidante foi capaz de proteger as células espermáticas, antes e após o processo de criopreservação, por meio do aumento nas concentrações de selênio e da enzima glutathione peroxidase.

Como aplicações práticas, sugere-se o uso de antioxidantes na dieta com intuito de se obter melhores resultados para qualidade de espermatozoides de touros, especialmente para aqueles que possuem sêmen de baixa congelabilidade.

Na realização do presente experimento pode-se notar a importância de um trabalho em equipe e, além disso, que em experimentos com o uso de animais, devem-se respeitar suas condições fisiológicas, tornando flexíveis os momentos de colheita de amostras.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M.; REHMAN, H.; YOUSAF, M.S.; JABBAR, M. A. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1220-1225, 2009.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 26, p. 654-660, 2005.
- AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R.T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 18, p. 431-437, 1969.
- AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z.; ALEEM, M.; KHAN, M.S.; ASHIQ, M.; YOUNIS, M. Relationsh ip of age to body weight, scrotal circumference, testicu lar ultrasono grams, and semen quality in Sahiwa l bulls. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 43, p. 159-164, 2011.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 250, p. 66-69, 2006.
- ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1598-1624, 2000.
- AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 7, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 895-907, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS. **Moisture in animal feed by distillation with toluene**. Virginia, 1990, 69p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMNAÇÃO ARTIFICIAL. **Índex ASBIA: Importação, Exportação e Comercialização de sêmen**. Uberaba, 2012. 19p.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, I.U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p.185-192, 1997.
- BAKER; J.F.; VANN, R.C.; NEVILLE Jr, W.E. Evaluations of genotype x environment interactions of beef bulls performance-tested in feedlot or pasture. **Journal of Animal Science** , Champaign, v. 80, p. 1716-1724, 2002.

BALIĆ, I.M.; MILINKOVIĆ-TUR, S.; SAMARDŽIJA, M.; VINCE, S. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p.423-431, 2012.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, Amsterdam, v.10, p.49-62, 2009.

BARTH, A.D.; BRITO, L.F.C.; KASTELIC, J.P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 485-494, 2008.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa: Ames, Iowa State University press, 1989. 285p.

BARTLE, J.L.; SENGER, P.L.; HILLERS J.K. Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 23, p.1007-1013, 1980.

BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 841-851, 1993.

BERTELSMANN, H.; KEPPLER, S.; HÖLTERSHINKEN, M.; BOLLWEIN, H.; BEHNE, D.; ALBER, D.; BUKALIS, G.; KYRIAKOPOULOS, A.; SIEME, H. Selenium in blood, semen, seminal plasma and spermatozoa of stallions and its relationship to sperm quality. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 22, p. 886-891, 2010.

BEUTLER, E. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. In: ----- . **Glutathione**. New York: Grune & Stratton, 1975. p. 112- 114.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction And Development**, New York, v. 55, p. 282-288, 2000.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUIS, J.M.; HERMIER, D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 56, p.1216-1220, 1997.

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; BARBOSA, R.T.; UNANIAN, M.M.; KASTELIC J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 1-15, 2003.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.G.; KASTELIC, J.P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm

production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 70, p. 181-190, 2002.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.35, p. 1382-1391, 2003.

BROWN, D.V.; SENGER, P.L.; STONE S. L.; FROSETH J. A.; BECKER W. C. Glutathione peroxidase in bovine semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, p.117-118, 1977.
CASTELLANO, C.A.; AUDET, I.; BAILEY, J.L.; LAFOREST, J.P.; MATTE, J.J., Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1482-1490, 2010.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; BERNARDINI, M.; DAL BOSCO, A. Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5°C. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 523-533, 2000.

CELEGHINI, E.C.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, p. 119-131, 2008

CHABORY, E.; DAMON, C.; LENOIR, A.; HENRY-BERGER, J.; VERNET, P.; CADET, R.; SAEZ, F.; DREVET, J.R. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 1321-1331, 2010.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 221-231, 1999.

CHACUR, M.G.M; MIZUSAKI, K.T; GABRIEL FILHO, L.R.A.; OBA, E.; RAMOS, A.A. Seasonal effects on semen and testosterone in zebu and taurine bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 41, p.1-5, 2013.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 54, p. 27-35, 2007.

CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 60, p. 498-506, 2001.

CHEUQUEMÁN, C.; BRAVO, P.; TREULÉN, F.; GIOJALAS, L.C.; VILLEGAS, J.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Sperm Membrane Functionality in the Dog Assessed by Flow Cytometry, . **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.47, p. 39-43, 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T. Effect of (α -tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. **Theriogenology**, Stoneham, v.49, p. 619-627, 1998.

DAMIÁN J. P.; UNGERFELD R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.46, p. 646-650, 2011.

DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.57, p.648-653, 1992.

DAWRA, R.K.; SHARMA, O.P.; MAKKAR, H.P. Lipid peroxidation in bovine semen. **International Journal of Fertility**, Washington, v.28 , p.231-234, 1983.

DAWRA, R.K.; SHARMA, O.P.; MAKKAR, H.P. Evidence for a novel antioxidant in bovine seminal plasma. **Biochemistry International**, Marrickville, v. 8, p. 655-659, 1984.

DOLATPANAH; M.B.; TOWHIDI, A.; FARSHAD, A.; RASHIDI, A.; REZAYAZDI, A. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, Geneva , v. 21, p. 29-34, 2008.

DREVET, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.250, p. 70-79, 2006.

EBISCH, I.M.W.; THOMAS, C.M.G.; PETERS, W.H.M.; BRAAT, D.D.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.13, p.163-174, 2007.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 871–879, 1998.

FENG, S.; LOCK, A.L.; GANSWORTHY, P.C. Technical note: a rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 3785-3788, 2004.

FIORENTINI, G.; SANTANA, M.C.A.; SAMPAIO, A.A.M.; REIS, R.A.; RIBEIRO, A.F.; BERCHIELLI, T.T. Intake and performance of confined crossbred heifers fed different lipid

Sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 1490-1498, 2012.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.71, p. 13-23, 2002.

FORERO-GONZALEZ, R.A.; CELEGHINI, E.C.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A. F.; BRESSAN, F.F.; ARRUDA, R.P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, Berlin, v. 44, suppl. 1, p. 154-159, 2012.

FOURIE, P.J.; SCHWALBACH, L.M.; NESER, F.W.C.; VAN DER WESTHUIZEN, C. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 54, p. 53-59, 2004.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L.O.; TYLUTKI, T. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E.; CHASE, L. E.; PELL, A. N.; OVERTON, T.R. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v, 112, p. 29-78, 2004.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GRULLÓN, L.A.; GARDÓN, J.C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **International Journal of Fertility**, Washington, v.31, p. 40-49, 2008.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.; RUIZ S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 690-701, 2004.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M.H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1548-1558, 2010.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 445-457, 2005.

GUARDIEIRO, M.M.; MACHADO, G.M.; BASTOS, M.R.; MOURÃO, G.B.; CARRIJO, L.H.D.; DODE, M.A.N.; LEROY, J.L.M.R.; SARTORI, R. A diet enriched in linoleic acid compromises cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, 2013. In press.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

HAMMERSTEDT, R.H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 5, p. 675-690, 1993.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 11, p. 73-88, 1990.

HARRIS, W.A.; HARDEN, T.E.; DAWSON, E.B. Apparent effect of ascorbic acid medication on semen metal levels. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 32, p. 455-459, 1979.

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

HSU, P.; LIU, M.; HSU, C.; CHEN, L.; GUO, Y.L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, Limerick, v. 128, p. 169-179, 1998.

HU, J.H.; TIAN, W.Q.; ZHAO, X.L.; ZAN, L.S.; WANG, H.; LI, Q.W.; XIN, Y.P. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, p. 72-77, 2010.

IGBOELI, G.; RAKHA, A.M. Seasonal changes in the ejaculate characteristics of Angoni (short horn Zebu) bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 33, p. 651-654, 1971.

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; DEL OLMO, E.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; BISBAL, A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.132, p. 88-95, 2012.

JUNIEWICZ, P.E.; JOHNSON, B.H.; BOLT, D.J. Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the ram. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 8, p. 190-196, 1987.

KANTOLA, M.; SAARANEN, M.; VANHA-PERTTULA, T. Selenium and glutathione peroxidase in seminal plasma of men and bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 83, p.785-794, 1988.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C.D.; NEBEL, R.L.; CASSELL, B.G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 1004-1012, 2007.

KELSO, K.A.; REDPATH, A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.109, p. 1-6, 1997.

KODAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patient. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 68, p.519-524, 1997.

KOPPERS, A.J.; GARG, M.L.; AITKEN, R.J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.48, p. 112-119, 2010.

KRAMER, J.K.; FELLNER, V.; DUGAN, M.E.; SAUER, F.D.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of Milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 32, p. 1219-1228, 1997.

LABUSCHAGNÉ, H.S.; SCHWALBACH, L.M.J.; TAYLOR, G.J.; WEBB. The effect of age on reproductive and productive characteristics of young Bonsmara bulls fed a high-energy diet. In: NATIONAL CONGRESS OF THE SOUTH AFRICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 39., 2002, Cristiana. **Anais...**Cristiana: South African Society of Animal Science, 2002. p.154.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, New York, v. 2, p. 246-256, 1996.

LINDHOLMER, C. The important of seminal plasma for human sperm motility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.10, p. 533-542, 1974.

LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLE, R.A. Minireview: Ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.52, p. 262-266, 1995.

MAIA, M.A.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C.; RODELLO, L.; GALLEGU, I.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.122, p. 118-123, 2010.

MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R.,: Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 411-421, 2005.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p. 2994–3003, 1997.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; 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. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, p.1544-1550, 2000.

MATTERI, R.L.; WATSON, J.G.; MOBERG, G.P: Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppresses LHRH-induced LH release in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.72, p. 385-393, 1984.

MORTIMER, S.J.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction** New York, v. 127, p. 285-291, 2004.

MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; CORAZZI, L.; CASTELLINI, C. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p.629-637, 2010.

MUKASA-MUGERWA, E.; EZAZ, Z. Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. **Theriogenology**, Stoneham, v. 38, p.979-988, 1992.

NAIR, S.; BRAR, A.S.; AHUJA, C.S.; SANGHA, S.P.S.; CHAUDHARY, K.C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, p. 21–29, 2006.

NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, Berlin, v. 44, suppl. 1, p. 550-555, 2012.

NICHI, M.; BOLS, P.E.; ZÜGE, R.M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 334-340, 2007.

NONOGAKI, T.; NODA, Y.; GOTO, Y. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Oxford, v.11, p.482-488, 1994.

O'BRIEN, M.D.; RHOADS, R.P.; SANDERS, S.R.; DUFF, G.C.; BAUMGARD, L.H. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.38, p. 86-94, 2010.

O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, Berlin, v.29, p. 269-275, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, p.351-358, 1979.

OLDEREID, N.B.; THOMASSEN, Y.; PURVIS, K. Selenium in human male reproductive organs. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, p. 2172-2176, 1998.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; REEB, P.D.; MARTINS, J.P.N.; SANTOS, R.M.S.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 137, p. 145-155, 2013.

PALMQUIST, D.L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.1354-1360, 1991.

PAULENZ, H.; TAUGBØL, O.; HOFMO, P.O.; SAAREM, K. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.19, p. 273-284, 1995.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS e SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Reproduction Science**, New York, v.98, p.293-301, 2007.

PEREZ ALBA, L.M.; DE SOUZA CAVALCANTI, S.; PEREZ HERNANDEZ, M. et al. Calcium soaps of olive fatty acids in the diets of manchega dairy ewes: effects on digestibility and production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.3316-3324, 1997.

PEZZINI, T.G.; SARTORI, R.; SILVA, T.A.S.N.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S. Características seminais de touros curraleiros e holandes submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.863-868, 2006.

POSTO METEOROLÓGICO DE PIRACICABA, SP. **Base de dados da estação convencional**. Área de física e meteorologia – LEB, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/postocon.html>>. Acesso em: 16 abril 2013.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 38, p. 312-318, 2003.

ROOKE, J.A.; SHAO, C.C.; SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, Cambridge, v.121, p. 315-322, 2001.

SAMADIAN, F.; TOWHIDI, A.; REZAYAZDI, K.; BAHREINI, M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. **Animal**, New York, v.4 , p. 2017-2022, 2010.

SELVARAJU, S.; RAJU, P.; RAO, S.B.; RAGHAVENDRA, S.; NANDI, S.; DINESHKUMAR, D.; THAYAKUMAR, A.; PARTHIPAN, S.; RAVINDRA, J.P. Evaluation of maize grain and polyunsaturated fatty acid (PUFA) as energy sources for breeding rams based on hormonal, sperm functional parameters and fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 24, p. 669-678, 2012.

SETCHELL, B.P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.114, p. 179-194, 1998.

SŁAWETA, R.; WAŚOWICZ, W.; LASKOWSKA, T. Selenium content, glutathione peroxidase activity, and lipid peroxide level in fresh bull semen and its relationship to motility of spermatozoa after freezing-thawing. **Zentralblatt für veterinärmedizin**, Berlin, v. 35, p. 455-460, 1988.

SMITH, D.G.; SENGER, P.L.; MCCUTCHAN, J.F.; LANDA, C.A. Selenium and glutathione peroxidase distribution in bovine semen and selenium-75 retention by the tissues of the reproductive tract in the bull. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 20, p. 377-383, 1979.

SILVA, A.A. DA. **Efeito dos fatores climáticos nos parâmetros seminais, nas proteínas do plasma seminal, na concentração sérica de cortisol e testosterona e na temperatura escrotal em touros Nelore (Bos taurus indicus)**. 2012. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2012.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWELL, R.L. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 44, p. 375-381, 1991.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; MONACI, M.; MAIORINO, M. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 91-98, 2009.

STRZEŻEK, J.; FRASER, L.; KUKLIŃSKA, M.; DZIEKOŃSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproductive Biology**, Oxford, v. 4, p. 271-287, 2004.

SURAI, P.F.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.; SPEAKE, B.K. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.120, p. 257-264, 2000.

TOWHIDI, A.; PARKS, J. E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 29 p.1051-1056, 2012.

TROCÓNIZ, J.F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H.; LARREAL. H.; BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nellore bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, p. 815-826, 1991.

VAISBERG, C.N.; JELEZARSKY, L.V.; DISHLIANOVA, B.; CHAUSHEV, T.A. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 416-428, 2005.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for extraction fiber: neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, p. 3583-3597, 1991.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham , v.57, p.149-179, 2002.

WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D.J.; LOUGHLIN, K.R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, Secaucus, v.49, p. 921-925, 1997.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 77, p. 190-201, 2007.

WHITLOCK, B.K.; COFFMAN, E.A.; COETZEE, J.F.; DANIEL, J.A. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78 , p.737-746, 2012.

WHETTER, P.A. ;ULLREY, D.E. Improved fluorimetric method for determining selenium. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.4, n. 61, p. 927-930, 1978.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of AOAC International**, Washington, v. 81, p. 620-632, 1998.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 349-355, 2000.