

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

WILLIAM MORAIS MACHADO

**ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO ÁCIDO ASCÓRBICO NO
DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

FEVEREIRO - 2016

WILLIAM MORAIS MACHADO

**ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO ÁCIDO ASCÓRBICO NO
DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Pires Barbosa

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

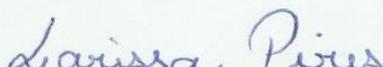
FEVEREIRO - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

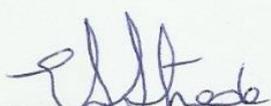
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

WILLIAM MORAIS MACHADO

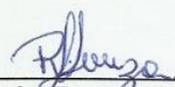
ÓLEO DE PEIXE ASSOCIADO AO ÁCIDO ASCÓRBICO NO DILUIDOR PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO



Profa. Dsc. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. Dsc. Evani Souza de Oliveira Strada
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. Dsc. Rosiléia Silva Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 12 de fevereiro de 2016.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

De acordo com os trâmites legais da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, na sua Reunião Ordinária, ocorrida no dia 18 de agosto de 2014, considerou “**APROVADO**” os procedimentos éticos apresentados nesse projeto, registrado sob o número 23007.006635/2014-60.

Aos outros eu dou o direito de ser como são, a mim, dou o dever de ser cada dia melhor”

(Chico Xavier)

O Bode do Nordeste

"A cabra não seca durante a seca. Nutre-se da própria devastação da estiagem: casca de árvores e arbustos, folhas secas, palha. Sobe aonde o outro gado não sobe, para consumir resíduos vegetais e ocultos entre as pedras das colinas. Come assim o que os outros animais rejeitam, até o ígneo aveloz. Estica-se com apoio das patas traseiras - bípede provisório - para atingir os ramos altos que sobrem para serem comidos e, nessa postura, simboliza a própria luta pela sobrevivência..." (Mauro Mota).

Este trabalho é dedicado à minha avó, Hilda Pereira Machado (*In memoriam*), com gratidão e todo meu amor.

Aos meus pais, Vanda Moraes Machado e Antônio Jose Pereira Machado, com muito amor e carinho.

À minha irmã Manuella, com amor.

À minha sobrinha Laura, com todas as formas de amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar todos os dias.

À família Machado, pelo amor e apoio incondicional a mim concedido, por sempre deixarem claro que acreditam em mim e por serem os melhores exemplos de pessoas que conheço. Meu muito obrigado.

À tia Lucinha, pelo amor e carinho.

À UFRB, por me mostrar a busca do saber.

À minha querida orientadora, Larissa Pires Barbosa, pela paciência, dedicação, pelos preciosos ensinamentos, por ser uma pessoa simples e humana, pelas risadas mais contagiantes e amizade. “Se pude ver mais longe, foi porque subi no ombro de gigantes” (Isaac Newton). Meu muito obrigado.

À minha amiga e segunda orientadora, Rosiléia Silva Souza, pelo companheirismo, ensinamentos, pela gentileza, sinceridade, conversas e amizade. Meu muito obrigado.

À toda família NERA, não poderia ter escolhido melhor! Em especial: Caline, Claudinéia, Léia, Mariana, Monna, Raísa e Renan, pela grande amizade.

À turma 2010.2 e agregados, pela alegria diária vivenciada, vocês são os melhores! Em especial: Bianca, Caline, Diana, Delcivan, Gabriel, Jaiala, Keila, Lourival, Luana e Sânorá.

Aos meus amigos, Cleidiane, Karlene, Lêda, Marcos, Maria Fernanda e Sanderson, pela amizade verdadeira e presente até com a distância!

Aos meus irmãos da Zootecnia, Cristiane Simplício e Roberto Filho, pela amizade, atenção e tudo que passamos juntos esses anos.

À residência TRIO ELÉTRICO, por ser minha casa todos esses anos e por me presentear com grandes amigos, em especial: Arlete, Bruna, Diego, Dourado, Jacson, Patrícia e Wilma.

À todos os funcionários da UFRB, em especial aos do R.U., pelo carinho e atenção todos os dias.

À melhor amiga de mobilidade acadêmica, Alana Ferreira, pela amizade e alegria. Saudades moça!

Aos membros da Banca Examinadora deste Trabalho de Conclusão de Curso, Evani Strada e Rosiléia Souza, por estarem mais uma vez contribuindo para minha formação profissional. Muito obrigado.

À todos que estiveram envolvidos diretamente ou indiretamente na minha vida pessoal e profissional.

Obrigado!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Motilidade espermática progressiva do sêmen de caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.

Figura 2 – Espermatozoides caprinos em teste de integridade de membrana plasmática (Hiposmótico – HO).

Figura 3 – Porcentagem de acrossomas íntegros de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.

Figura 4 – Acrossoma irregular de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.

Figura 5 – Espermatozoides caprinos corados pelo método do Vermelho Congo e violeta Genciana para classificação da integridade acrossomal.

Figura 6 – Espermatozoides caprinos corados com azul de toluidina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Motilidade espermática progressiva e vigor espermático no Teste de Termorresistência do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de peixe no diluidor.

Tabela 2 – Teste Hiposmótico do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo peixe no diluidor.

Tabela 3 – Teste de integridade acrossomal do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo peixe no diluidor.

Tabela 4 – Compactação da cromatina espermática do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de peixe no diluidor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturado
ALA	Alfa-linolênico
C ₆ H ₆ O ₆	Ácido ascórbico
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCAAB	Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e tecnológicas
cm ³	Centímetro cúbico
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
g	Gramma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HO	Teste hiposmotico
HO ₂	Hidroperoxila
IA	Inseminação artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoprotéina de baixa densidade
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro

mm ³	Milímetro cúbico
MS	Matéria seca
n-3	Ômega 3
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Hidroxila
PUFAs	Poly Insaturated Fatty Acid
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TE	Transferência de embriões
TTR	Teste de termorresistência
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados dois machos da raça Boer com idade de $18 \pm 1,19$ meses, com $60,12 \pm 2,34$ Kg e condição corporal de 3, criados em sistema semi-intensivo. As coletas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana, pelo método de vagina artificial. Após a coleta, os ejaculados avaliados quanto aos aspectos físicos e morfológicos, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Após avaliação, houve formação de um pool, seguindo-se do fracionamento em cinco grupos (G): G1 (controle): diluidor citrato-gema (Mies Filho, 1987) acrescido de 0,05% de ácido ascórbico (Synth®) e G2, G3, G4 e G5: diluidor citrato-gema acrescido de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe (Nature Made®) + 1% de lauril sulfato de sódio e 0,05% de ácido ascórbico, respectivamente. O sêmen foi criopreservado em máquina automatizada. Após descongelamento, foram realizadas avaliações físicas do sêmen pós-descongelamento e os testes complementares de termorresistência lento (TTR), teste hiposmótico (HO), integridade acrossomal e compactação da cromatina espermática. Os dados foram avaliados por Análise de Regressão a 5% de significância. Houve comportamento linear crescente ($P < 0,05$) para motilidade pós-descongelamento. Não houve diferença ($P > 0,05$) para vigor pós-descongelamento, com média de $2,00 \pm 0,24$. No TTR não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para motilidade e vigor espermáticos entre os tempos 5 a 180 min, como médias inicial e final de $62,17 \pm 12,13$ e $14,29 \pm 10,55$, para motilidade e $2,00 \pm 0,52$ e $0,49 \pm 0,44$, para vigor. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos no HO, com porcentagem média de espermatozoides reativos de $23,5 \pm 5,96\%$. Para integridade acrossomal houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$) para acrossoma íntegro e acrossoma irregular, com comportamento linear crescente e decrescente, respectivamente. Não houve diferença ($P > 0,05$) na compactação da cromatina, com porcentagem de $97,06 \pm 1,17\%$ de cromatina íntegra. Desta forma, a inclusão de até 4% de óleo de peixe acrescido de 0,05% de ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino melhorou motilidade e integridade de acrossoma após a criopreservação.

Palavras-chave: lipídios, membrana celular, viabilidade espermática

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of fish oil inclusion associated with ascorbic acid in the thinner for goat semen cryopreservation. They used two males Boer aged 18 ± 1.19 months and $60.12 \pm 2,34$ Kg and body condition of 3, raised in semi-intensive system. Semen samples were taken twice a week, the artificial vagina method. After collection, the evaluated ejaculates how the physical and morphological aspects, according to the Brazilian College Animal Reproduction (CBRA, 2013). After evaluation, the formation of a pool, followed by the split into five groups (G): G1 (control): yolk-citrate extender (Mies Son, 1987) plus 0.05% ascorbic acid (Synth®) and G2, G3, G4 and G5: yolk-citrate extender plus 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0% fish oil (Nature Made®) + 1% sodium lauryl sulfate and 0.05% ascorbic acid, respectively. The semen was cryopreserved in TK 3000® freezing machine using the curve for goats. After thawing, they were conducted physical evaluations of post-thaw semen and additional testing slow heat resistance (TTR), hiposmotic test (HO), acrosome integrity and compression of sperm chromatin. Data were evaluated by regression analysis at 5% significance. There was linear increase ($P < 0.05$) for post-thaw motility. There was no difference ($P > 0.05$) for post-thaw effect, with an average of $2,00 \pm 0,24$. The TTR there was no difference ($P > 0.05$) between treatments for sperm motility and vigor between times 5-180 min as the initial and final means of $62,17 \pm 12,13$ and $14,29 \pm 10,55$, for motility and $2,00 \pm 0,52$ and $0,49 \pm 0,44$, to force. There was no difference ($P > 0.05$) between treatments in HO, with an average percentage of reactive sperm $23.5 \pm 5.96\%$. For acrosome integrity was no difference between treatments ($P < 0.05$) for intact acrosome and acrosome irregular, with increasing and decreasing linear behaviors, respectively. There was no difference ($P > 0.05$) in the compaction of chromatin, with percentage of $97.06 \pm 1.17\%$ of full chromatin. Thus, the inclusion of up to 4% fish oil plus 0.05% ascorbic acid in diluter for goat semen cryopreservation improved sperm viability after cryopreservation by means of motility and acrosome integrity.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, membranes, viability

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVO.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 Caprinocultura no Brasil.....	25
3.2 Característica do ejaculado caprino	26
3.3 Óleo de peixe na reprodução	28
3.4 Lipídios na reprodução.....	31
3.4.2 Lipídios nos diluidores.....	33
3.5 Antioxidante ácido ascórbico na reprodução	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6 - CONCLUSÃO	52
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A demanda dos sistemas de produção por animais geneticamente melhorados vem impulsionando o aprimoramento das biotecnologias empregadas à reprodução animal, visando uma maior aplicabilidade das mesmas, o que permite condições para o aumento da eficiência produtiva desses animais (FIGUEIREDO et al., 2002).

Dentre essas biotecnologias, a inseminação artificial (IA) é a que mais contribuiu para o avanço do melhoramento genético em um curto espaço de tempo, devido ao uso de reprodutores selecionados, gerando um número elevado de doses inseminantes e maior número de descendente nascido por ano (BETINI et al., 1998; NUNES et al., 2002; SIMPLÍCIO et al., 2005). Devido a isso, a tecnologia de sêmen tornou-se alvo de inúmeras pesquisas, para maior eficiência dentro dos programas reprodutivos nas diversas espécies domésticas (ANDRADE, M.M.J, 2002; MOTAMEDI et al., 2014; KÜÇÜK et al., 2014; GÜRLER et al., 2015).

O processo de criopreservação seminal apresenta como principal vantagem aumentar o tempo de utilização de determinado ejaculado (SILVA e GUERRA, 2011). Porém, esse processo apresenta entrave para a exploração do sêmen criopreservado, porque o processo criogênico leva a uma diminuição na porcentagem de células viáveis e na capacidade fecundante após o descongelamento, assim como, lesão na membrana plasmática e ultraestrutura celular (WATSON, 2000), com perdas de até 28% do colesterol presente nas membranas (SAMPAIO et al., 2015).

Desta forma, estratégias vêm sendo desenvolvidas para incrementar a resistência das células espermáticas ao processo de criopreservação. Dentre elas, a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e antioxidantes no diluente seminal, sendo uma alternativa em melhorar a fluidez de membrana e diminuir a ação dos radicais livres sobre as células (BRINSKO et al., 2005; NASIRI et al., 2012; TOWHIDI e PARKS, 2012; CASTILHO et al., 2009).

Algumas fontes de AGPI já foram testadas como aditivos em meio de congelamento e seus efeitos benéficos para o processo da criopreservação seminal, como ácido linoleico (LA) (TAKAHASHI et al., 2012), alfa-linolênico (ALA) (KAKA et

al., 2015), docosahexaenóico (DHA) (NASIRI, A.H. et al., 2012) e ácido araquidônico (AA) (EJAZ et al., 2014). Como o óleo de peixe é rico em DHA e em ácido eicosapentaenoico (EPA), torna-se uma alternativa promissora como componente em diluentes seminais (DEL VALLE et al., 2013).

2 OBJETIVO

Avaliar a inclusão de óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluente para criopreservação do sêmen caprino.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caprinocultura no Brasil

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2014, o efetivo de caprinos no Brasil foi de 8.851.879 cabeças, com a Região Nordeste sendo detentora de 8.109.672 caprinos, destacando-se com o maior rebanho do país, e a Bahia, com um rebanho estimado em 2.360.683 caprinos, o maior da Região Nordeste.

No ano de 2011, o Brasil somou um total 2.534.000 abates de caprinos, com produção de 5.068 toneladas de couro e com produção de 148.149 litros de leite. Com os maiores contingentes do rebanho caprino, a região Nordeste tem como foco a produção de carne, leite e pele, porém esse cenário vem mudando, e a caprinocultura vem se solidificando em outras regiões, com mostra a região Sudeste, que se mostra estruturada e ranqueando o terceiro lugar na produção de leite de cabra do país (FAO, 2012).

A caprinocultura de corte e de leite no Brasil não apresenta um crescimento qualitativo (GOUVEIA, 2003). Segundo Pinheiro et al. (2000), a caprinocultura no Nordeste é influenciada por fatores que acarretam a entaves no seu desenvolvimento, como a alta ocorrência de problemas sanitários, somados a um controle profilático muitas vezes deficiente levando a ocorrência de doenças, em conjunto a uma deficiência nutricional ocasionada pelas condições climáticas, que não favorece a disponibilidade de forragem de qualidade ao longo do ano, refletindo no baixo desempenho produtivo e reprodutivo dos animais.

O baixo nível tecnológico, associado à criação dos caprinos durante muitos anos, justifica-se em parte por se tratar de uma cultura muitas vezes de subsistência, associada a agricultura familiar (COELHO et al., 2011). Essa imagem vem sendo reformulada devido à criação de associações de produtores, onde tem se buscado implementação de tecnologias e melhoria dos sistemas de produção, tornando-se uma alternativa para ações extensionistas e melhoras progressivas da caprinocultura (LEMOS et al., 2012).

Essas mudanças impulsionaram a expansão da caprinocultura nos últimos anos, com emprego crescente de várias biotecnologias reprodutivas, contribuindo para o sucesso dessa cultura, dentre elas destacam-se a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e mais recentemente, a produção *in vitro* de embriões (PIV) (COGNIÉ et al., 2003; PAULA et al., 2008). Junto a isso, a tecnologia do sêmen desenvolve-se ao mesmo ritmo. Em 2014, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) definiu os requisitos sanitários para processamento e comercialização de sêmen caprino e ovino no território brasileiro, mostrando um avanço importante na tecnologia de sêmen dessas espécies.

3.2 Característica do ejaculado caprino

Os caprinos apresentam um ejaculado com volume variando de 0,2 até 2mL e com valores médios de 0,8mL (SALVIANO et al., 2008; SOUZA, A.P, 2009). Essa característica é bastante variável, pois, os métodos de coleta, espécie, raça, idade, número de coleta, tempo de excitação, estacionalidade reprodutiva, dentre outros fatores causam variação do volume final do ejaculado (SIMPLÍCIO, 1991; CHEMINEAU et al., 2004; SANTOS, F.C.B, et al., 2005; SALVIANO, et al., 2008; SOUZA, A.P, et al., 2009).

Segundo o CBRA (2013) os ejaculados dos caprinos apresentam aspecto que pode ser classificado em creme grosso, creme, creme fino, leite, turvo e claro, tendo relação direta com a concentração espermática do ejaculado, sua coloração pode ser classificada na cor branca ou amarelo-marfim em um ejaculado normal.

Só o sêmen dos ruminantes tem presente à característica do movimento de massa/turbilhonamento, existe uma alta relação entre a intensidade do movimento em massa e a motilidade, vigor e concentração espermática do ejaculado. O mesmo é classificado em uma escala de zero a cinco, de forma subjetiva, na espécie caprina o ejaculado é considerado apto para processamento, quando os valores para turbilhonamento são maiores ou iguais a quatro (CBRA, 2013).

Mies Filho (1987) relaciona a motilidade espermática como a principal característica em um exame andrológico, pois, representa a população de espermatozoides dotados de movimento. Segundo o CBRA (2013), a motilidade deve ser expressa em porcentagem, e para a espécie caprina os ejaculados que

apresentam valores iguais ou superiores a setenta por cento estão classificados aptos.

O vigor espermático também apresenta uma classificação de zero a cinco e representa a força de movimento da célula espermática. O zero representa a ausência de movimento ou movimento inexpressivo e o cinco representa um movimento vigoroso celular (CHEMINEU et al., 1991). Os ejaculados de caprinos devem apresentar valores de vigor espermático iguais ou superiores a três (CBRA, 2013).

Outra variável analisada na espécie caprina de alta correlação com a fertilidade é a concentração espermática, esta pode ser expressa em milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$). Os padrões exigidos pelo CBRA (2013) para a espécie caprina para concentração total de células por ejaculado de 3 a 5 bilhões.

A avaliação da morfologia espermática é um parâmetro de suma importância em todas as espécies. Para realização desse, pode-se usar as técnicas de esfregaço corado ou pela preparação úmida, com avaliação em microscópio de contraste ou de interferência diferencial de fases, os caprinos devem apresentar um total de 80% de células normais em um ejaculado (CBRA, 2013). A classificação das anormalidades segue o padrão descrito por vários autores (BLOM e CHRISTENSEN, 1951; GARCIA, 1971; RÃO, 1971 e BLOM, 1972).

O sêmen é formado pelo líquido seminal com espermatozoides em suspensão, o plasma seminal tem, entre outras, a função de veículo para as células espermáticas, sendo um importante constituinte dessa solução (MILLER et al., 1990). Existem várias pesquisas sobre o efeito do plasma seminal dos caprinos nos fosfolípidios contidos em diluidores seminais e seu efeito deletério sobre a motilidade e estrutura das células. A fosfolipase A2 também apresenta papel importante no processo de maturação espermática, pois está envolvida na ocorrência de modificações importantes dos fosfolípidios da membrana espermática e faz parte do processo de maturação dos espermatozoides epididimários (UPRETI et al., 1999; ARAÚJO e CAMPOS, 2005).

As glândulas bulbo uretrais nessa espécie secreta a fosfolipase A2, essa enzima promove hidrólise nas lecitinas presentes na gema do ovo, componente quase obrigatório dos diluentes seminais, gerando lisolecitinas que têm efeito tóxico sobre as células espermáticas, com ação deletéria aos lipídios presentes nas membranas celulares (NUNES, 1982, PELLICER-RUBIO et al., 1997, PURDY, 2006). Essa ação deletéria leva a fragilização da célula ao processo de criopreservação, induz reação acrossômica e descondensação da cromatina (FERRARI JUNIOR, 2013).

Como a gema do ovo é um componente muito usado nos diluentes dessa espécie, garantindo proteção para membrana plasmática e acrossoma contra lesões relacionadas com a diminuição da temperatura, e é rica em fosfolipídios associados com outros componentes, as células espermáticas terão redução da composição de seus fosfolipídios, pela hidrólise dos componentes da gema do ovo além de reduzir o efeito protetor da mesma (SURAI et al., 2000).

A busca por diluentes de alta eficiência para a espécie caprina vem sendo realizada há um longo período, diante disso, os diluentes vêm sendo incrementados com uma série de substâncias que de alguma forma confirmam efeito protetor às células espermáticas contra os efeitos deletérios da criopreservação (UYVAL e BUCAK, 2007; MARA et al., 2007; ANSARI et al., 2012; SOUZA, R.S, 2012; PENITENTE-FILHO et al., 2014; SILVA, M.S.F, 2015).

3.3 Óleo de peixe na reprodução

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2010), o consumo mundial de pescado vem aumentando paulatinamente nessas últimas décadas no Brasil, com aumento de aproximadamente 8% no ano de 2010 (BRASIL, 2010), gerando maiores níveis de resíduos desse produto. As vísceras, escamas e esqueletos são destinados como matérias-primas para a fabricação das farinhas, silagens e óleos de peixe, comumente empregados na alimentação animal (LIMA, 2013).

Os subprodutos do pescado vêm ganhando várias utilidades, em diversas áreas, tanto como constituintes da dieta humana, animal, suplementos e até medicamentos alternativos para algumas doenças humanas. A produção a partir

desses resíduos mostra-se uma alternativa para reduzir o impacto dos mesmos ao meio ambiente, sendo gerado produtos como: biodiesel, silagem de peixe e extração de colágeno, a partir da pele desses animais (NUTEC, 2010).

Devido ao alto valor protéico, sua utilidade para produção animal vem ganhando espaço, sendo a produção de farinha de peixe um dos destinos desses resíduos, pois, o produto gerado tem cerca de 70% de proteína e baixo custo (FELTES et al., 2010). O óleo de peixe é um outro subproduto obtido pela cocção a vapor, decantação, filtração e centrifugação. Segundo o Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), esse subproduto apresenta níveis elevados de AGPI, principalmente os ácidos EPA e DHA (MARTINS, M.B, et al., 2008). Além desses ácidos, destacam-se na composição dos óleos de peixe, os ácidos mirístico, palmítico; esteárico; oleico; vestígios para eicosenoico; araquidônico; e docosapentaenoico (SAIFY et al., 2000; SUSENO et al., 2014).

A composição do óleo de peixe tem sua determinação pelo perfil de ácidos graxos que o compõe, esse por sua vez é diretamente influenciado por fatores ambientais, tais como: a geografia local, temperatura da água e estação do ano na captura dos peixes (EFSA, 2010). Os peixes são os animais que apresentam a maior concentração de AGPI na sua composição de membrana, devido a essa característica esses animais apresentam alta capacidade de sobrevivência, frente a grande variação de temperatura imposta pelo ambiente, mantendo a fluidez de suas membranas (AMORIM, 2008). Devido a isso, estudos vêm sendo desenvolvidos com uso de fontes ricas em AGPI, como o óleo de peixe, óleo de canola, óleo de linhaça, dentre outras, e sua capacidade de incorporação dessas fontes lipídicas exógenas às membranas espermáticas, seja pela adição lipídica na dieta ou diretamente ao diluente (BONGALHARDO et al., 2009, MOCÈ et al., 2010, MORAES et al., 2010 RATES, 2011 e SOUZA, R.S, 2012).

Dependendo das insaturações dos seus ácidos graxos, o óleo de peixe apresenta uma alta susceptibilidade a processos oxidativos, que comprometem a integridade das duplas ligações, a concentração e a funcionalidade principalmente dos ácidos graxos EPA e DHA (SHAHIDI, 1998; CASANOVA e MEDEIROS, 2011). Os mesmos podem sofrer essas alterações por outros processos, como: reações

hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e autoxidação (RAMALHO e JORGE, 2006).

Os AGPI já foram identificados há vários anos como constituintes das membranas celulares dentre as várias espécies de animais (POULOS et al., 1986), com importância na manutenção celular, pois, além de serem constituintes das membranas celulares, participam da resposta imunológica e inflamatória (PERINI et al., 2010). Os principais efeitos celulares estudados dos AGPI estão descritos a seguir.

Ácidos graxos das séries n-3 e n-6 são precursores da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, envolvidos em processos importantes como os de coagulação e inflamação, enzimas atuam sobre esses ácidos, por exemplo, o ácido linoleico é convertido a araquidônico sendo o precursor das prostaglandinas E₂ (PGE₂), leucotrienos B₄ (LTB₄), os quais são importantes eicosanoides pró-inflamatórios, e a tromboxana A₂ (TXA₂), potente vasoconstritor e agregador plaquetário, seguindo pela via das lipoxigenases, o EPA é convertido em prostaglandinas E₃ (PGE₃), leucotrieno B₅ (LTB₅) e a tromboxana A₃ (TXA₃) (LOTTENBERG, 2009).

Os AGPI apresentam características importantes no desenvolvimento fetal e no desenvolvimento cerebral (ELIAS e INNIS, 2001; INNIS, 2005). O cérebro apresenta em sua constituição uma elevada quantidade de AGPI da série n-3 e n-6, sendo estes relacionados com funções importantes, como o crescimento neuronal, envolvidos na transdução de sinais e excitabilidade das membranas neurais, e na expressão de genes que regulam a diferenciação celular e o crescimento (UAUY e DANGOUR, 2006). O DHA é encontrado de forma representativa, tendo uma alta relação com o sistema visual, pois, está presente nos cones e bastonetes, isso vem indicando um papel importante dos mesmos para funcionalidade do sistema visual e neural (JENSEN et al., 2005, LIMA et al., 2004).

Outro fator importante é a fluidez das membranas, que é esperado em células espermáticas, pode ser demonstrado pela eficiência dos AGPI sobre as membranas neuronais, pois, com o passar da idade os ataques das espécies reativas ao oxigênio (ROS) levam a uma redução dos níveis de AGPI, tendo um aumento da

proporção de colesterol sobre os mesmos, resultante desse processo de inversão tem-se uma rigidez das membranas cerebrais (JOSEPH et al., 1998, ANGELIE et al., 2001).

O funcionamento fisiológico normal da membrana neuronal é altamente dependente de suas estruturas, e ao mesmo tempo, muitos fatores podem influenciar na sua fluidez, um dos principais fatores é a composição lipídica da membrana, onde o colesterol reduz a fluidez da membrana e os AGPI podem aumentá-la (YEHUDA et al., 2002). Da mesma forma, a célula espermática se comporta frente à redução de AGPI em sua composição e em relação ao colesterol, levando a redução da fluidez das membranas tornando mais susceptíveis a danos causados pelo processo de criopreservação (AMANN e GRAHAM, 1992).

Em trabalhos recentes, Kaeoket et al. (2010) demonstraram aumento da motilidade progressiva e da integridade de membrana plasmática com o uso de níveis de óleo de peixe ao diluente de suínos, assim como Del Valle et al. (2013), usando uma fonte de óleo vegetal (óleo de coco) no sêmen ovino, obtiveram melhor porcentagem de células com acrossoma íntegros. Isso por uma possível incorporação dos AGPI presentes nesses óleos à membrana espermática.

3.4 Lipídios na reprodução

O uso de ácidos graxos, como uma alternativa em melhorar a qualidade espermática, é demonstrado em vários estudos, comprovando a influência da inclusão de lipídios sobre a qualidade dos espermatozoides de diversas espécies, seja por meio da inclusão diretamente na dieta dos animais, como descrito para frangos (ZANINE et al., 2003; RODENAS et al., 2005), suínos (STRZEZEK et al., 2004, OLIVEIRA, S.R et al., 2006), bovinos (MORAES et al., 2010), ovinos (MOCÈ et al., 2010) e caprinos (DOLATPANAH et al., 2008), ou com a adição no diluidor seminal, como demonstrado para asinino (RATES et al., 2011), bovinos (PURDY e GRAHAM, 2004; AMORIM et al., 2009; MORAES et al., 2010), equinos (SIPIZZIRI et al., 2010), ovinos (MOCE et al., 2010) e caprinos (ANSARI et al., 2012; SILVA, M.S.F, 2015).

3.4.1 Lipídios na alimentação

Dolatpanah et al. (2008) trabalharam com suplementação de caprinos com óleo de peixe na dieta, encontrando aumento da quantidade de AGPI nas células espermáticas e melhoria na qualidade seminal com a adição de 2,5% de óleo na matéria seca e 0,30g por kg/MS de vitamina E. Da mesma forma, Oliveira, R.S et al. (2006), ao trabalhar com suínos, verificaram uma melhora na qualidade do sêmen *in natura* no grupo tratado com suplementação de óleo comercial PUFA® na dieta, em relação ao grupo controle, nos aspectos como volume do ejaculado e na concentração espermática, sendo justificado pela correlação do maior desenvolvimento dos diâmetro dos túbulos seminíferos, podendo ser um dos contribuintes para esse resultado. Resultados semelhantes foram encontrados em frangos, com suplementação de diferentes fontes de óleo na dieta (óleo de girassol, soja, canola, linhaça, soja e peixe), sendo observado o aumento no volume seminal com a suplementação com óleo de soja (ZANINI et al., 2003). Corroborando com esses achados, Souza, R.S (2012) utilizou níveis de semente de linhaça 0%, 4%, 8% e 12% na dieta de caprinos e encontrou diferença para os parâmetros de volume seminal, vigor, motilidade progressiva e concentração espermáticas, em relação ao grupo controle, sendo 12% o melhor nível de inclusão na dieta.

A incorporação de AGPI à dieta animal, tanto de origem animal ou vegetal, apresenta um fator importante para elevação das concentrações do colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), hormônio do crescimento, insulina, triglicerídeos e progesterona, eles são fatores responsáveis por influenciar processos reprodutivos em animais (CAVALIERI et al., 2005). Correlaciona-se a suplementação em dietas ricas de lipídios em machos reprodutores a aumento da concentração celular no ejaculado, isso por que o aporte dos AGPI tem ação nas concentrações dos eicosanoides e reflete diretamente sobre a espermatogênese, além de regular a expressão gênica (SURAI et al., 2000).

Além disso, o fornecimento de ácidos graxos da série n-3 tem efeito sobre as membranas celulares levando a alterações estruturais e funcionais. Isso reflete em uma maior fluidez da membrana celular, ocorrendo diretamente uma maior mobilidade das proteínas com maior troca de sinais de transdução, interação hormônio-receptor e transporte de substratos entre os meios intracelular e extracelular (PIMENTEL et al., 2005).

3.4.2 Lipídios nos diluidores

A adição de fontes de lipídios aos diluidores seminais é outra forma de utilização, que vem sendo realizada com o intuito de promover à incorporação desses à membrana espermática, melhorando a resistência celular frente ao processo de criopreservação e descongelamento (ANSARI et al., 2012; TOWHIDI et al., 2013; EJAZ et al., 2014; KAKA et al., 2015).

Ejaculados de diversas espécies vem sendo diluídos com meios diluidores com adição de fontes de lipídios, resultando em melhor qualidade das células espermáticas pós-descongelamento em bovinos (TOWHIDI e PARKS; 2012; KAKA et al., 2015), ovinos (TOWHIDI et al., 2013; ABDI-BENEMAR et al., 2015) e caprinos (ANSARI et al., 2012)

Essa incorporação de óleo de peixe ao diluidor foi demonstrada por Kaeoket et al. (2010) e encontraram células espermáticas de suínos mais resistentes ao processo de criopreservação, resultante de maior motilidade progressiva, número de células com acrossoma íntegro, tornando assim, esses espermatozoides mais resistentes às etapas de processamento.

Mesmo apresentando efeitos benéficos, concentrações elevadas de AGPI dentro das frações lipídicas dos espermatozoides, torna os mesmos altamente susceptíveis à peroxidação, com conseqüente risco de danos na estrutura celular (NIKI et al., 1993). Portanto, há necessidade de se utilizar um sistema antioxidante juntamente com fontes de lipídios, para proteção contra danos peroxidativos (CECIL e BAKST, 1993; AITKEN, 1994). A relação entre AGPI e antioxidantes vem se mostrando uma alternativa viável para aumentar a fluidez da membrana plasmática, com a concomitante proteção ao ataque das ROS às duplas ligações desses lipídios e melhores resultados ao processo de criopreservação (SAMPAIO, 2015).

As ROS incluem todos os radicais derivados do metabolismo do oxigênio e são encontrados em todos os sistemas biológicos, as mais estudadas são o radical ânion superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO^\cdot) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MAIA e BICUDO, 2009).

As ROS têm sua ocorrência pela não compensação de compostos com efeito antioxidantes, sobre a produção dos radicais livres ou simplesmente capacidade de neutralização dos mesmos (BARBOSA et al., 2010). Elas entram em contato com as membranas das células e organelas e promovem uma reação sobre o EPA, nessa reação tem liberação de um hidrogênio processo de peroxidação lipídica que gera as ROS (SILVA, R.O.C, 2011).

Como a célula espermática dos mamíferos possui em suas membranas uma grande proporção de AGPI, isso os torna alvos do processo de lipoperoxidação (KOTHARI et al., 2010; LOPES et al., 2011). Como citado por Aitken (1997); Maia e Bicudo (2009), essa reação leva a danos em funções vitais das membranas plasmáticas, que resultam em células espermáticas com reduzido vigor espermático, viabilidade e aumento de defeitos de peça intermediária, que prejudicam a capacitação espermática e reação acrossômica.

A inibição ou redução dos danos causados pelas ROS são suprimidas ou minimizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Vários mecanismos são ativados para impedir a formação, neutralizar e reparar estruturas biológicas lesadas (RODRIGUES, 2009; BARBOSA et al., 2010).

3.5 Antioxidante ácido ascórbico na reprodução

Os antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos, sendo os enzimáticos, com função de quebrar e remover as ROS. As enzimas são as constituintes desse sistema e simplificam produtos oxidativos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, em seguida, a água, em um processo multi-passo, na presença de co-fatores, tais como o cobre, zinco, manganês e ferro. Antioxidantes não enzimáticos tem ação de interromper as reações em cadeia para formação das ROS (SHAHIDI e ZHONG, 2010).

Os componentes desses sistemas enzimáticos e não enzimáticos são, respectivamente: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas; e catalase, SOD, glutathiona e outros tiois, taurina, hipotaurina e vitamina E (OVERVELD et al., 2000; ZINI et al., 2000; NICHI, 2003).

Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias de baixo peso molecular, na reprodução os que apresentam maior número de pesquisa e discussão sobre seus efeitos sobre células espermáticas são a vitamina C, o alfa-tocoferol e glutathione (ANDRADE, E.R, et al., 2010; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

O ácido ascórbico ($C_6H_6O_6$) é um antioxidante solúvel em água, presente nos fluidos corporais, apresentando uma elevada concentração no plasma seminal em relação aos demais fluidos (SONG et al., 2006). O ácido ascórbico tem a capacidade de reduzir o α -tocoferol, peróxidos e ROS, e atua também impedindo a formação de hidropéroxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, e com isso gera uma proteção as células (NORDBERG e ÁRNER, 2001).

O uso do ácido ascórbico vem sendo empregado na biotecnologia voltada ao sêmen de diversas espécies: bovinos (BORGES, 2008; HU et al., 2010; SOHAIL et al., 2015), caprinos (CASTILHO et al., 2009; MEMON et al., 2013), ovinos (PEIXOTO et al., 2008); equinos (AURICH et al., 1997); Javali (YOSHIMOTO, et al., 2008), entre outras espécies.

Castilho et al. (2009), em experimento com caprinos da raça Alpina, verificaram que a suplementação no diluente com 0,25 e 0,50% de ácido ascórbico preservou a qualidade da membrana plasmática dos espermatozoides frente ao processo de criopreservação. Corroborando com esses achados, Memon et al. (2013) trabalharam com a adição de 2,5; 4,5; 6,5; e 8,5mg/mL ácido ascórbico ao diluente para criopreservação e obtiveram valores superiores nos parâmetros de morfologia espermática, integridade da membrana, integridade acrossomal e viabilidade pós-descongelamento de espermatozoides caprinos, em comparação ao grupo controle.

Os resultados encontrados se comportam de forma semelhante entre as várias espécies. HU et al. (2010) avaliaram a adição de 2,5, 4,5, 6,5 e 8,5 mg/mL de ácido ascórbico ao meio de diluição, e encontraram melhores parâmetros de motilidade, integridade acrossomal e de membrana plasmática no grupo tratado com ácido ascórbico em comparação com o grupo controle.

Esses resultados podem ser atribuídos à capacidade do ácido ascórbico como um agente antioxidante com baixa toxicidade e muito eficiente em sequestrar as

ROS, capacidade de regeneração de antioxidante, além de atuar sinergicamente com agentes complexantes ou na redução de produtos indesejáveis da oxidação, que são subprodutos tóxicos que promovem os danos celulares (DAWSON et al., 1992; RAMALHO e JORGE, 2006; HU et al., 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período compreendido entre os meses de junho e julho de 2015, no Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), na cidade de Cruz das Almas – Bahia, situada a 12° 40' 12" de Latitude Sul e 39° 06' 07" de Longitude Oeste de Greenwich, a uma altitude de 200m acima do nível do mar, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2015).

O município apresenta clima tropical quente e úmido, segundo a classificação de Koppen com pluviosidade média anual de 1,224mm e maior incidência de chuvas no período compreendido entre março e junho. A umidade relativa do ar é de aproximadamente 80% e a temperatura média anual, de 24,5°C (INMET, 2015).

Foram utilizados dois machos caprinos, clinicamente sadios e sexualmente maduros, da raça Boer, com idade média de 18±0,35 meses e peso vivo de 60,12±2,34Kg, com escore de condição corporal (ECC) de 3,0; segundo Morand-Fehr e Hervieur (1999). Os animais foram avaliados previamente por meio de exame andrológico, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Para manejo dos animais, foi utilizado o sistema semi-intensivo de produção, considerando o consumo médio de matéria seca de 3% do peso corporal, com fornecimento de concentrado formulado segundo o NRC (2007), contendo 85% de farelo de milho, 11% de farelo de soja, 2% de ureia e 2% de mistura mineral e capim *in natura*, na proporção de volumoso:concentrado de 50:50 e água *ad libitum*. Antes do início experimental foi realizado controle sanitário, com administração de anti-helmíntico.

As coletas seminais foram realizadas pelo método de vagina artificial com uma cabra em estro como manequim, na frequência de duas vezes por semana, totalizando 12 coletas. Após as coletas, os ejaculados foram encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal da UFRB, em caixa isotérmica na temperatura de 37°C e acondicionada em banho maria à 37°C.

Após avaliação física do sêmen foi formado um pool, com retirada das amostras para patologia e determinação da concentração espermática, segundo o CBRA (2013). A concentração espermática foi determinada com o uso da câmara de Neubauer sob microscopia óptica com aumento de 400 vezes. O exame morfológico foi realizado por meio de confecção úmida, entre lâmina e lamínula, corada com rosa bengala à 5%, sob microscopia óptica com aumento de 1.000 vezes sob imersão. Do pool formado foram retiradas alíquotas de 0,5mL para compor os grupos experimentais, com diluição em citrato-gema (MIES FILHO, 1987), inicialmente em uma proporção de 1:1 de sêmen e diluente.

Os grupos experimentais foram: grupo 1 (G1) - Controle, diluidor citrato-gema (Mies Filho, 1987) acrescido de 0,05% de ácido ascórbico (Synth®); G2, G3, G4 e G5: diluidor citrato-gema com inclusão de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe (Nature Made®) mais 0,05% de ácido ascórbico, respectivamente. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL.

A fonte de óleo de peixe utilizada apresenta em sua composição 2.000mg de óleo de peixe concentrado no conteúdo de duas cápsulas, com total de 600mg de ômega da série n-3 e ácidos gordurosos, sendo 500mg de EPA e DHA e 100mg de outros ácidos da série n- 3.

Após diluição final para obtenção da concentração de 100×10^6 espermatozoides por dose, o sêmen foi criopreservado em máquina de criopreservação (TK 3000®) em duas etapas, sendo a primeira etapa referente à curva positiva (resfriamento a $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ até alcançar $+5^\circ\text{C}$ iniciando em 32°C) e a segunda etapa referente à curva negativa, dividida em duas fases: congelamento a partir de $+5^\circ\text{C}$, em uma velocidade de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir -120°C . Com o fim do processo de congelamento as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico.

Após descongelamento o sêmen foi avaliado quanto à motilidade e vigor espermáticos e foram realizados os testes complementares para avaliação da: integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, integridade de cromatina e teste de termorresistência lento (TTR). Para a avaliação da integridade de membrana plasmática espermática pós-descongelamento foi empregado o Teste

Hiposmótico (HO) utilizando-se um tubo contendo 1mL de solução hiposmótica a base de frutose (100mOsmol/Kg), acrescida de 10µL de sêmen e incubada por 30 minutos em banho maria a 37°C.

Para quantificação do HO, 200 células espermáticas foram classificadas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes, os espermatozoides que apresentaram uma cauda dobrada e edemaciada foram considerados células portadoras de uma membrana plasmática funcional (CBRA, 2013). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao HO foi realizado por intermédio da fórmula citada por Melo e Henry (1999). $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HO})$.

A determinação da integridade acrossomal espermática pós-criopreservação foi empregada à técnica vermelho congo e violenta genciana a 0,5%, segundo o CBRA (2013). Duzentas células foram contadas e classificadas como: acrossoma íntegro; acrossoma irregular; desprendimento parcial do acrossoma e desprendimento total do acrossoma.

Para a determinação da integridade de cromatina utilizou-se o protocolo de Beletti e Mello (2004). Foram confeccionados esfregaços delgados secos ao ar e fixados em solução Carnoy's durante 1 minuto e, em seguida, em etanol 70%, durante 3 minutos. Para realização da hidrólise, foi utilizado um ácido clorídrico na concentração 4N por um tempo de 15 minutos, as lâminas passaram por uma lavagem em água destilada e seca ao ar. Foi empregado uma solução do corante Azul de Toluidina a 0,025% em tampão Mc Ilvaine, pH 4,0, para coloração dos esfregaços, o mesmo foi depositado entre lâmina e lamínula (MELLO, 1982). Quinhentas células foram avaliadas em microscopia de luz, usando a objetiva de imersão de 100 vezes, e classificadas quanto à característica da cromatina, em: cromatina compacta (região da cabeça corada em azul claro) ou descompactação da cromatina (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta).

O sêmen foi avaliado pelo TTR por um tempo de 180 minutos. Uma palheta de cada tratamento foi descongelada a 37°C e o seu conteúdo total foi transferido para microtubos de polietileno, que já se encontravam aquecido em banho maria na mesma temperatura. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C pelo

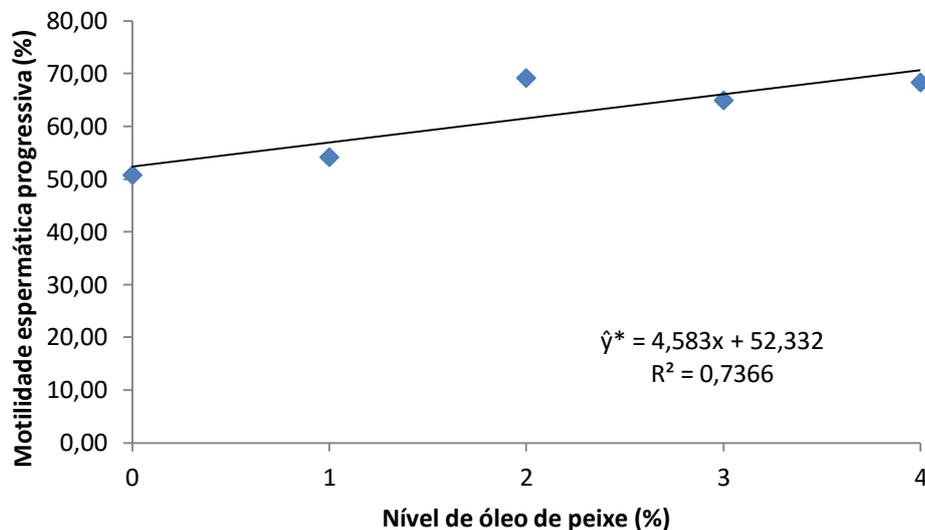
tempo determinado na análise, sendo cobertas por uma camada fina de óleo mineral previamente aquecido, e avaliadas nos tempos 0, 5, 60, 120, 180 minutos quanto aos parâmetros de motilidade espermática progressiva (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5) por meio de montagem de lâmina e lamínula e avaliados em microscopia de contraste de fase, usando a objetiva de 40 vezes (CBRA, 2013).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA), Teste de Regressão e a correlação de Pearson, adotando uma significância de 5%. Para as variáveis não-paramétricas (Vigor 0, 5, 60 e motilidade 60) foi aplicado o teste Kruskal-Wallis e a correlação de Spearman a 5% de significância. Foi utilizado o programa SPSS versão 21 (1989 – 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve comportamento linear crescente para motilidade espermática progressiva pós-descongelamento ($P < 0,05$) (Figura 1 e Tabela 1). Esse resultado demonstra que a adição de até 4% de óleo de peixe apresenta um efeito benéfico na motilidade espermática progressiva frente ao processo de criopreservação e consequentemente na qualidade seminal pós-descongelamento.

Figura 1 – Motilidade espermática progressiva do sêmen de caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.



Dados de motilidade progressiva pós descongelamento contendo 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe mais 0,05% de ácido ascórbico ao diluente. Os dados foram avaliados por meio de Análise Regressão à 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Ansari et al. (2012), com a adição de 10ng.mL^{-1} de uma fonte de ácido graxo da série n-3 ao meio diluidor seminal para caprinos, obtendo melhores valores de motilidade espermática pós-descongelamento com a inclusão da fonte de lipídio, devido a incorporação do DHA às membranas das células espermáticas, principalmente na região da cauda, resultando em uma melhor fluidez e flexibilidade, com melhora na motilidade progressiva.

Tabela 1 - Motilidade espermática progressiva e vigor espermático no Teste de Termorresistência do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de peixe no diluidor.

Parâmetros	Níveis de óleo de peixe (%)				
	0 (C)	1	2	3	4
Motilidade (%)					
Mot pós-desc.	50,83±7,35	54,17±12,81	69,16±12,00	65,00±17,32	68,33±10,32
TTR Mot 5'	55,00±8,94	57,50±10,84	70,00±12,65	64,17±16,25	64,17±12,01
TTR Mot 60'(*)	55,00±17,50	45,00±25,00	62,50±32,50	60,00±18,75	57,50±22,50
TTR Mot 120'	35,00±13,78	25,83±15,62	37,50±26,22	32,50±14,75	28,33±13,66
TTR Mot 180'	16,83±11,84	12,67±10,13	13,67±13,64	16,00±8,83	12,33±8,33
Vigor (0 a 5)					
Vig pós-desc.(*)	2,00±0,13	2,00±0,00	2,00±0,13	2,00±0,13	2,00±0,83
TTR Vig 5'(*)	2,00±0,50	2,00±0,25	2,25±0,50	2,50±0,63	2,50±0,75
TTR Vig 60'(*)	1,50±0,50	2,00±0,63	2,00±0,63	2,00±0,13	2,00±0,75
TTR Vig 120'	1,17±0,41	1,08±0,49	1,58±0,97	1,17±0,26	1,08±0,58
TTR Vig 180'	0,60±0,35	0,45±0,33	0,63±0,76	0,53±0,40	0,38±0,36

C= Controle;TTR = Teste de Termorresistência; Mot = Motilidade espermática; Vig= Vigor espermático. Os dados foram analisados por Análise de Regressão a 5% de significância. Os dados referem-se às médias±desvio padrão e (*) refere-se a mediana e Amplitude interquartil.

Corroborando com esses resultados, Nasiri et al. (2012) também utilizaram 10ng.mL⁻¹ de uma fonte de ácido graxo da série n-3 e obtiveram valores superiores de motilidade espermática progressiva no sêmen de bovinos com a inclusão da fonte de ômega. Divergindo desses resultados, Silva, M.S.F (2015) usou óleo de linhaça, como uma fonte de AGPI nas concentrações de 0,13; 0,29 e 0,45g no meio de

criopreservação de sêmen caprino e não obteve melhoras nos valores de motilidade espermática progressiva após o processo criogênico.

Ceylan e Serin (2007) relataram que a peroxidação dos lipídios da membrana dos espermatozoides é uma das principais causas para a perda de motilidade e capacidade fertilizante nos mamíferos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos para vigor espermático pós-descongelamento, com média geral para os tratamentos de $2,00 \pm 0,24$ (Tabela 1), atendendo os requisitos mínimos exigidos pelo CBRA (2013) de 2 para vigor pós-descongelamento. Este resultado é semelhante ao encontrado por Silva, M.S.F (2015), que ao suplementar o meio de criopreservação de caprinos com níveis de óleo de linhaça não encontraram nenhuma diferença entre os grupos tratados e o controle.

Não houve diferença ($P > 0,05$) no Teste de Termorresistência lento (TTR) para as variáveis avaliadas de motilidade espermática progressiva e vigor espermático em todos os tempos de avaliação (5, 60, 120 e 180 minutos) (Tabela 1). Mesmo não apresentando diferença, as amostras dos diluentes que continham óleo de peixe foram às únicas que permaneceram com valores de vigor espermático no tempo 60 minutos, o CBRA (2013) informa que o sêmen caprino após o descongelamento deve permanecer com o valor mínimo de dois de vigor.

A queda da qualidade seminal após o processo de criopreservação está atribuído em grande parte aos danos ocasionados às membranas, podendo ocorrer de diversas formas, como alterações na sua organização, na fluidez, na permeabilidade, na composição lipídica ou na sua ruptura total (AMANN e GRAHAM, 1993). A perda significativa dos AGPI presentes na membrana plasmática tem correlação negativa com a motilidade espermática (CHAKRABARTY et al., 2007). Outro fator que interfere diretamente na qualidade seminal são os processos de formação de ROS pelo processo de criopreservação (WATSON, 1995).

A criopreservação gera um declínio esperado da motilidade espermática, a sobrevivência de uma população de células é determinada pelo protocolo de criopreservação, sensibilidade das células ao estresse osmótico durante a adição e remoção dos crioprotetores e durante o resfriamento e o aquecimento (WATSON,

2000). Em estudos, Forero-Gonzalez (2004) verificou que somente 15% dos espermatozoides permaneceram intactos após o processo de criopreservação. Resultado semelhante foi obtido por Celeghini (2005), que encontrou percentuais variando de 18 a 28% de células íntegras após a criopreservação, utilizando Bioxcell® e Botu-Bov® como diluentes.

Takahashi et al. (2012) observaram que a suplementação de diluentes com fontes de AGPI para bovinos que já apresentavam uma crioresistência reduzida, resultou em uma melhor motilidade progressiva após o descongelamento. Resultados semelhantes foram descrito por Santos, B.M.B (2013), que fez a adição de óleo de coco em um diluidor à base de água de coco em pó (ACP-101c), obtendo melhores resultados de motilidade espermática progressiva espermática pós-descongelamento.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos para a integridade da membrana plasmática (Tabela 2) (Figura 2). Os resultados obtidos por meio do Teste HO mostram que a porcentagem média de células reativas foi de $23,5\pm 5,96\%$, ou seja, menos de 30% dos espermatozoides de todos os grupos apresentaram membranas plasmáticas íntegras após criopreservação.

Tabela 2. Teste Hiposmótico do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo peixe no diluidor.

HO (%)	Níveis de óleo de peixe (%)				
	0 (C)	1	2	3	4
Reativos	$21,50\pm 5,25$	$22,50\pm 3,16$	$25,08\pm 8,70$	$23,75\pm 7,02$	$24,67\pm 5,69$
Não reativos	$78,50\pm 5,25$	$77,50\pm 3,16$	$73,25\pm 7,22$	$76,25\pm 7,03$	$75,33\pm 5,69$

C= Controle; HO=Teste de Hiposmótico. Os dados foram analisados por Análise de Regressão a 5% de probabilidade.

Nesse estudo ocorreu uma correlação positiva média entre células reativas no teste de HO e vigor espermático no tempo zero minuto e motilidade no tempo de cinco minutos ($r=0,67$) e ($r=0,61$), respectivamente. As correlações dentro dos estudos desenvolvidos apresentam resultados controversos, como demonstrado por

Oliveira, I.R.S et al. (2013) que não acharam correlação entre o teste de HO para nenhuma característica seminal em caprinos. Corroborando com esses resultados, Santos, A.D.F, et al. (2006) também não encontraram nenhuma correlação entre as características seminais de caprinos e o teste de HO (NUR et al., 2005; CASTILHO et al., 2009).

Figura 2 - Espermatozoides caprinos em teste de integridade de membrana plasmática (Hiposmótico – HO).

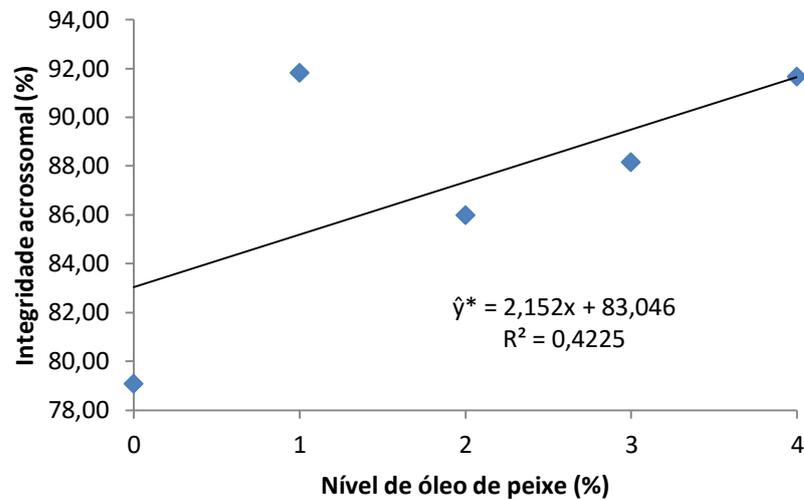


Fonte: Arquivo Pessoal. 1. células regentes ao teste de HO, 2. célula não reagente ao teste de HO.

Um dos principais fatores que contribuem para baixa qualidade seminal pós-descongelamento é o estresse oxidativo. O processo de criopreservação origina grandes modificações na membrana plasmática do espermatozoide, as quais resultam em uma progressiva diminuição do potencial fecundante dessas células, isso é refletido com uma redução da motilidade e viabilidade espermática, danos na integridade de membrana e funções espermáticas (BUCAK et al., 2010).

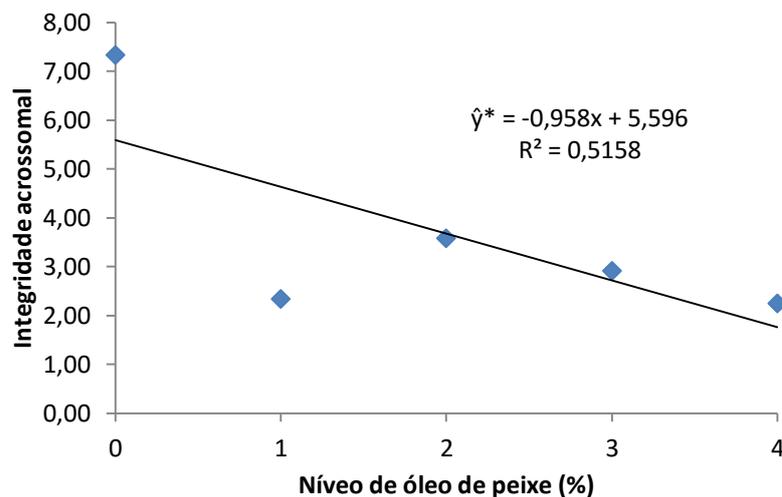
Para integridade acrossomal houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$), para número de acrossoma íntegros (Figura 3) e irregular (Figura 4) com comportamento linear crescente e linear decrescente, respectivamente (Tabela 3). Isso demonstra que o diluente testado foi eficaz em preservar a integridade acrossomal das amostras (Figura 5).

Figura 3 – Porcentagem de acrossomas íntegros de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.



Porcentagem de acrossomas íntegros de sêmen de caprinos após o processo de criopreservação, contendo 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe mais 0,05% de ácido ascórbico ao diluente. Os dados foram avaliados por meio de Análise Regressão a 5% de probabilidade.

Figura 4 - Acrossoma irregular de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação utilizando níveis de óleo de peixe no diluente.



Dados de acrossoma irregular de sêmen de caprinos após o processo de criopreservação, contendo 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe mais 0,05% de ácido ascórbico ao diluente. Os dados foram avaliados por meio de Análise Regressão à 5% de probabilidade.

O DHA presente no óleo de peixe pode ter incorporado à membrana acrossomal, conferindo uma maior resistência ao processo de criopreservação, todos os grupos que tiveram a adição de óleo peixe foram superiores ao grupo

controle para a porcentagem de acrossomas íntegro e irregular. Os níveis de 1% e 4% foram os que mais tiveram a população de células espermáticas com acrossoma íntegro e menor número de células com acrossoma irregular. Mesmo sem diferença significativa, os dados de desprendimento parcial de acrossoma se comportaram da mesma forma.

A capacidade de incorporação do DHA às membranas se dar pela alta afinidade com proteínas estruturais das mesmas. A molécula de DHA é composta por um grupamento de 22 átomos de carbono apresentando seis duplas ligações, isso facilita sua incorporação nas membranas celulares, resultando em aumento de sua fluidez pela formação de domínios mutável de formas (GARWRISCH et al., 2003; WASSALL e STILLWELL, 2009). Devido a isso, é possível modificar o perfil lipoproteico da membrana plasmática, o que modifica a temperatura da transição de fase, permeabilidade e fusão entre membranas (SAMPAIO, 2015).

Tabela 3. Teste de integridade acrossomal do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo peixe no diluidor.

Acrossoma (%)	Níveis de óleo de peixe (%)				
	0 (C)	1	2	3	4
Íntegro	79,08±9,86	91,83±2,84	86,00±5,46	88,17±6,34	91,67±2,16
Irregular	7,33±5,89	2,33±1,99	3,58±3,05	2,91±2,85	2,25±1,72
Desprendimento parcial	4,50±2,96	1,16±1,12	3,16±1,91	2,91±2,03	1,83±1,47
Desprendimento total	7,42±4,63	5,58±2,82	7,25±2,79	6,08±2,58	4,17±1,63

C= Controle. Os dados foram analisados por Análise de Regressão a 5% de probabilidade.

Dolatpanah et al. (2008) demonstraram que os AGPI são um dos responsáveis pela maior capacidade em manter a integridade do acrossoma. A destruição do

acrossoma e suas lesões podem ser decorrentes por vários fatores: envelhecimento celular, choque térmico, manipulação indevida do sêmen durante o processamento de criopreservação (SOUZA, R.S, et al., 2012).

Figura 5 - Espermatozoides caprinos corados pelo método do Vermelho Congo e violeta Genciana para classificação da integridade acrossomal.



Fonte: Arquivo pessoal. 1- acrossoma íntegro, 2 – sem acrossoma, 3 – acrossoma irregular, 4 – desprendimento parcial do acrossoma.

A Integridade acrossomal é de suma importância, pois, é um atributo essencial para garantir um bom potencial de fertilidade dos espermatozoides, independente da espécie (LUZ et al., 2000, GIL et al., 2003, BERNARDI, 2008 e SOARES e GUERRA, 2009). Martins, C.F, et al. (2007) fizeram uma correlação entre a integridade acrossomal de espermatozoides de touros post-mortem com maior número de acrossoma íntegros com fertilização, e obtiveram maior número de blastócitos nos dias 2 e 7.

Os trabalhos de suplementação com fontes de lipídios aos meios de diluição apresentam resultados variados, apresentando sucesso em determinados estudos ou nenhuma influência quando utilizados em outros. Como demonstrando em seu estudo SILVA, M.S.F (2015), não obteve nenhuma melhora na integridade acrossomal de sêmen de caprinos com a adição de óleo de linhaça ao meio citrato-

gema. Essa variação pode ser devido a fonte de AGPI utilizada, variando o perfil de ácidos graxos encontrado nas mesmas.

Da mesma forma, Del Valle et al. (2013) utilizaram óleo de coco no diluente para ovinos e não conseguiram melhorar a qualidade acrossomal das amostras após o processo de criopreservação, esses resultados também são encontrados em sêmen de bovinos suplementados por fontes purificadas de DHA (TOWHIDI e PARKS, 2012). Kaeoket, et al. (2010) utilizaram uma fonte de DHA (óleo de peixe) ao diluidor para criopreservação de sêmen suíno e obtiveram maior integridade das membranas e aumento da motilidade progressiva na avaliação pós-criopreservação pela possível incorporação desses AGPI às membranas, nota-se que foi a testada a mesma fonte de ácidos graxos do presente estudo. Em outro estudo, Andreeva et al. (2008) avaliaram o efeito dos lipídios na criopreservação de sêmen de truta sobre a formação de cristais de gelos, observaram maior resistência das membranas as formações dos cristais durante o processo.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos para a integridade da compactação da cromatina (Tabela 4 e Figura 6). Os resultados obtidos por meio do teste de metacromasia mostraram que a porcentagem média de células com cromatina íntegra foi de $97,06\pm 1,17\%$ e $2,94\pm 2,97,83\%$ de células com fragmentação de cromatina, isso mostra uma baixa ocorrência de células apresentando danos ao DNA após o processo de criopreservação.

Kamimura et al. (2010) afirmaram que no sêmen fresco de caprinos a porcentagem média de espermatozoides exibindo fragmentação da cromatina foi de até $2,40\pm 0,20$. Isso demonstra que o diluente testado manteve a integridade de cromatina nos espermatozoides após o processo de criopreservação, apresentando um número significativo de células com sua cromatina íntegra.

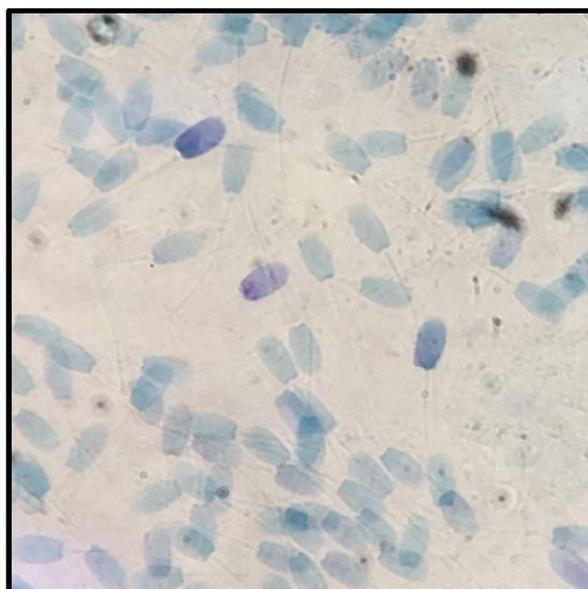
Tabela 4. Compactação da cromatina espermática do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de peixe no diluidor.

Cromatina (%)	Níveis de óleo de peixe (%)				
	0 (C)	1	2	3	4
Íntegra	96,73±1,02	98,63±0,70	96,73±1,46	96,66±1,30	96,56±1,37
Fragmentada	3,26±1,02	1,46±0,53	3,26±1,46	3,33±1,30	3,43±1,37

C= Controle. Os dados foram analisados por Análise de Regressão a 5% de probabilidade. Os dados referem-se às médias \pm desvio padrão.

A integridade da cromatina tem um papel importante para o desenvolvimento embrionário, pois, nela está contida as informações paternas. Vários estudos demonstram a existência de uma correlação entre a presença de danos na cromatina e os resultados de fecundação e desenvolvimento embrionários (BOCHENEK et al., 2001; MORRELL et al., 2008; SOUZA, A.P., et al., 2009).

Figura 6 - Espermatozoides caprinos corados com azul de toluidina.



Fonte: Arquivo pessoal. Espermatozoides caprinos de coloração clara (cromatina íntegra); de coloração azul escura ou violeta (cromatina fragmentada).

Na literatura não foram encontrados trabalhos correlacionando o uso de AGPI e sua ação sobre a integridade de DNA das células espermáticas frente aos processos criogênicos e seu mecanismo de ação.

O óleo de peixe, dentre as possíveis fontes de aditivos para diluentes, apresenta grande potencial pela grande quantidade de AGPI que tem em sua composição. Nesse estudo óleo de peixe foi responsável talvez por uma incorporação do DHA nas membranas espermáticas, conferindo maior resistência frente ao processo de criopreservação e melhorando alguns parâmetros seminais importantes, como a motilidade progressiva pós-descongelamento. Contudo, esperava-se uma melhor integridade da membrana plasmática, talvez não sendo eficientes os níveis testados nesse estudo para tal parâmetro. Poucos são os estudos com adição de óleo de peixe diretamente ao diluidor de sêmen caprino, sendo necessária realização de outros estudos para avaliar concentração maiores ou associação com outras substâncias e com isso obter resultados superiores ao desta pesquisa.

6 - CONCLUSÃO

A inclusão de até 4% de óleo de peixe acrescido de 0,05% de ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino melhorou a viabilidade espermática após a criopreservação, por meio da motilidade pós-descongelamento e integridade de acrossoma.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI-BENEMAR, H. et al., Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.130, p. 166-170, 2015.

AITKEN R.J. Molecular mechanisms regulating sperm function. *Mol Hum Reprod*; v 3:169–73 1997

AITKEN, R.J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, v.16, p.259-267, 1994.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. 1ª.ed. Philadelphia: Lea & Febinger, cap. 80, p. 715- 746, 1992.

AMORIM, E. A. et al., Effect of Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v.58, p.201-2014, 2009.

AMORIM, E.A.M. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

ANDRADE, E.R et al., Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ANDRADE, M.M.J. Insulina e hipoglicemiantes orais. In: *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, São Paulo: Guanabara Koogan, p. 345-353, 2002.

ANDREEVA, A.A. et al., Influence of lipids on ice formation during the freezing of cryoprotective medium. *Biofizika*, v.53, p.598–601, 2008

ANGELIE, E. et al., Regional differences and metabolic changes in normal aging of the human brain: proton MR spectroscopic imaging study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* v. 22 ,p. 119–127, 2001.

ANSARI, M. et al., Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Slovak Journal of Animal Science*, v. 45, n. 1, p. 7-13, 2012.

ARAÚJO, A.A.; CAMPOS, A.C.N. Fatores e critérios importantes para o sucesso da inseminação artificial ovina e caprina IN: CAMPOS, A.C.N (Coordenação Geral) Do Campus para o Campo: Tecnologia para Produção de Ovinos e Caprinos, p. 267-286, 2005.

AURICH, J.E. et al., Effects of antioxidants motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.185-192, 1997.

BARBOSA, K.B.F. et al., Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* v. 23. 2010

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotechnic & Histochemistry*, Baltimore, v.79, p.17-23, 2004.

BERNARDI, M.L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade, *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 36, p. 5-16, 2008.

BETINI, C.M.; MORAES, G.V.; RIGOLON, R.P. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. *Acta Scientiarum*. v. 20, p. 361-365, 1998.

Blom E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. In: *Symposium International di Zootechnie, Milano. Atti ... Milano: The Symposium, 1972. p.125-139, 1972.*

BLOM, E; CHRISTENSEN, N.O. congenital absence of the epididymis, ductus deferens and glândula vesicularis (aplasia segmentalis ductus wolffi) in the bull. Copenhagen: Royal Veterinary and Agricultural University, 1951.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, v. 56, p. 557-567, 2001.

BONGALHARDO, D.C; LEESON, S; BUHR, M.M. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. *Poult Sci*, v.88, p.1060-1069, 2009.

BORGES, J.C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Caderno de consolidação de dados estatísticos. Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008-2009. Brasília, DF, 2010.

BRINSKO, S.T. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v.63, p.1519-1527, 2005.

BUCAK MN. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res*, v.89, p.24-30, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v.51, p.15-25, 2013.

CASANOVA, M.A; MEDEIROS, F. Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 na doença cardiovascular. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*. Vol. 10, 2011.

CASTILHO, E.F. et al. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *R. Bras. Zootec.* v. 38, p. 2335-2345, 2009.

CAVALIERI, F.L.B. et al. Efeitos de duas fontes de gordura (LAC-100 ou linhaça em grão) na dieta na produção de embriões de vacas leiteiras da raça Holoandesa. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 217, 2005.

CECIL, H.C; BAKST, M.R. In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa. *Poult. Sci.*, v.72, p.1370-1378, 1993.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. *Acta Scientiae Veterinaria*. v. 33, p. 327, 2005.

CEYLAN, A., SERIN, I. Influence of ascorbic acid addition to the extender on dog sperm motility, viability and acrosomal integrity during cooled storage. *Revue Méd. Vét.* 158,v. 7,p. 384-387, 2007.

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.

CHEMINEAU, P. et al. Seasonal ovulatory activity exist in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a template photoperiod. *BMC Physiol*, v. 27, p.4-12, 2004.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y. Collection and preservation of spermatozoa. In CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.;VALLET, J.C. (Ed.) *Training manual on artificial insemination in sheep and goats* *Animal Reproduction Science*, 1.ed. FAO, p. 115-157, 1991.

COELHO, M.C.S.C. et al. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos criados em assentamentos no município de Petrolina-PE, *Revista Semiárido De Visu*, v.1, p. 32-40, 2011

COGNIÉ Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v. 59, p. 171-188, 2003.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 104, 2013.

DAWSON, M.E; Nuechterlein K.H; Schell A.M. Electrodermal anomalies in recent-onset schizophrenia: Relationships to symptoms and prognosis. *Schizophr Bull* v. 18, p. 295-311, 1992.

DEL VALLE, I. et al. Function of ram 589 spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, v. 138, p. 213-219, 2013.

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

EJAZ, R. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. *Reprod Domest Anim.*, v 49, p.122-125, 2014.

ELIAS, S.L; INNIS, S.M. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am J Clin Nutr.* v.73, p. 807-14, 2001.

European Food Safety Authority (EFSA) Scientific opinion on fish oil for human consumption. Food hygiene, including rancidity. Panel on Biological Hazards(BIOHAZ). *EFSA Journal*, v.8, p.1874-1922, 2010.

FAO. Aquaculture development: Ecosystem approach to aquaculture. FAO technical guidelines for responsible fisheries. Rome, IT, n. 5, supl. 4, 2010.

FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* v. 14, p. 669-677, 2010.

FERRARI JUNIOR, W.D. Adição de lipídios na ração e no sêmen sobre o consumo, digestibilidade e qualidade espermática de caprinos. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), p. 111, 2013.

FIGUEIREDO, J.R; RODRIGUES, A.P.R; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, São Paulo: Varela, p. 227-260. 2002.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Production: live animals, livestock primary, livestock processed; Trade: countries by commodity

(imports and exports). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. acessado em 10/08/2015, 2012.

FORERO-GONZALEZ, R. A. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, p. 92, 2004.

GARCIA, O.S. Características físicas e morfológicas do sêmen de touros normais e de touros com distúrbios reprodutivos, de raças européias e indianas criadas no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, Tese Mestrado, UFMG, 61p, 1971.

GAWRISCH, K., ELDHO, N.V., HOLTE, L.L. The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids*, v.38, p.445-452, 2003.

GIL, J.et al., Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. v. 59, p. 1157-1170, 2003.

GOUVEIA, A.M G. Aspectos sanitários da caprino-ovinocultura no Brasil. Anais II SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, João Pessoa, PB, p.115-131, 2003.

GÜRLER, H; CALISICI, Ó; BOLLWEIN, H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim Sci Reprod*, v. 155, p. 99-105, 2015.

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

HU, J.H.et al. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality, *Animal Reproduction Science*, v. 121, p. 72–77, 2010.

INNIS, S.M. Essential fatty acids transfer and fetal development. *Placenta*. v. 26, p. 70-75, 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Estatísticas: pecuária (rebanhos). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. 2014. Acesso em: 10/08/2015.

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br> . 2014. Acesso em: 03/08/2015.

JENSEN, C.L. et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr.* v. 82, p. 125-32, 2005.

JOSEPH, J.A. et al. Cao Age-related neurodegeneration and oxidative stress: putative nutritional intervention *Neurol. Clin.* v. 16, p. 747–755, 1998.

KAEOKET, K. et al. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.458- 463, 2010.

KAKA, A. et al. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Animal reproduction science*, v. 153, p. 1-7, 2015.

KAMIMURA, C. F; JACOMINI, J. O; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Ciência e agrotecnologia*, v. 34, p. 212-219, 2010.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.48, p.425-435, 2010.

KÜÇÜK, N. et al. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology.* v. 68, p. 327-331, 2014.

LEMOS, C.G. et al. Avaliação da condição produtiva de caprinovinocultores, dos municípios de Ouricuri-PE e Santa Filomena-PE, no Sertão do Araripe, associados à ACOCAMA, v. 7, 2012.

LIMA, L.K.F. reaproveitamento de resíduos sólidos na cadeia agroindustrial do pescado, Embrapa Pesca e Aquicultura Palmas, TO, 2013.

LIMA, M.F. et al. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr.* V. 28, p. 65-77, 2004.

LOPES, B.V.et al. Avaliação do estresse oxidativo no plasma seminal de cães férteis e subférteis após suplementação oral com vitamina C e E. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, p.452-461, 2011.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab* v. 53, 2009.

LUZ, S.L.N., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 37, p. 136-140, 2000.

LUZ.R.K. et al., Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 23, p. 246-248, 1999.

MAIA, M.S; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte, v.33, p.183-193, 2009.

MARA, L. et al. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science.* Sassari, v. 102, p. 152–157, 2007.

MARTINS, C.F. et al. The use of acridine orange test and TUNEL assay to assess DNA integrity of bovine freeze-dried spermatozoa. *Genet Mol Res*, v. 6, p. 94-104, 2007.

MARTINS, M.B. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Rev Inst Ciênc Saúde.* v. 26, p. 153-156, 2008.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. *Histochemistry*, Berlin, v.74, p.387-392, 1982.

MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.77-78, 1999.

MEMON, A.A. et al. Effect of Ascorbic Acid Concentrations, Methods of Cooling and Freezing on Boer Goat Semen Cryopreservation. *Reprod Dom Anim.* V. 48, p. 325-330, 2013.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. Editora Sulina. 6ª ed., v. 2, p. 750, Porto Alegre, 1987

MILLER, D.J; WINER, M.A; AX, R.L. Heparin Biding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 42, p. 899-915, 1990.

MOCÉ, E; PURDY, P. H; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 236-247, 2010.

MORAES, E. A; GRAHAM, J. K; TORRES, C. A. A. et al. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, v.118, p. 148-154, 2010.

MORAND-FEHR, P.; HERVIEU, J. Apprécier l'état corporel des chèvres: Intérêt et méthod. *Reussir La Chevre*, v.231, p.22-34, 1999.

MORREL, J.M. et al. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, p.2, 2008.

MOTAMEDI-MOJDEHI, R; ROOSTAEI-ALI MEHR, M; RAJABI-TOUSTANI, R. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* v.49, p. 65-70, 2014.

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.* v. 44, p 550–555, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requeriments of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, D.C: National Academy Press, p. 384, 2007.

NETTLETON, J.A. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J Am Diet Assoc*, v. 91, p. 331-337, 1991.

NICHI, M. Sistema de Proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. 2003, 101f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NIKI, E; NOGUCHI, N; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochemical Society Transactions*. v.21, p.313-317, 1993.

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

NUNES J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela, cap.5, p. 83-104. 2002.

NUNES, J. F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. Paris. Université Paris. Tese (Ciências da Vida), 1982.

NUR, Z. et al. Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of saanen goat bucks. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 49, p. 183-187, 2005.

NUTEC – Fundação Núcleo de Tecnologia industrial do Ceara. NUTEC viabiliza produção de biodiesel de gordura de peixe (2010). Disponível em: <http://www.nutec.ce.gov.br/categoria2/nutec-viabiliza-producao-de-biodiesel-degordura>. Acesso em: 30. 08. 2015.

OLIVEIRA, S.L. et al. Efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo na ração de varrões sobre a qualidade do sêmen “in natura”. *Ciência agrotécnica*. v. 30, p. 1205-1210, 2006.

OLIVEIRA, I.R.S; HERON MEDEIROS ALVES, H.M; CASTELO, T.S; BEZERRA, F.S.B , BEZERRA, A.C.D.S; SILVA, A.R. correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v.14, n.2, p. 216-221, 2013.

OVERVELD, F.W.P.C. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact*, v.127, p.151-161, 2000.

PAULA, N. R. O. et al. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v. 32, n. 1, p. 21-35, 2008.

PEIXOTO, A.L.V.A. et al. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 16 - 24, 2008.

PELLICER-RUBIO, M.T; MAGALLON, T; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1023-1031, 1997.

PENITENTE - FILHO, J.M. et al. Association of Vitamin E with Rapid Thawing on Goat Semen. *The Scientific World Journal*.v. 2014, p. 5, 2014.

PERINI, J.A.L; STEVANATO, F.B; SARGI, S.C; VISENTAINER, J.E.L; DALALIO, M.M.O; MATSHUSHITA, M; SOUZA, N.E; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.* vol.23, 2010

PIMENTEL, C. V. M. B; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. "São Paulo", *Varela*, v 95, p. 36-45, 2005.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.52, p.534-543, 2000.

POULOS A. et al. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem* v.240, p. 891-895, 1986.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. In: *Small Ruminant Research*. v. 63, p. 215-225, 2006.

PURDY, P.H; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v. 48, p. 36-45, 2004

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova, São Paulo, v. 24, 2006.

RAO, A. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulis with normal and impaired spermatogenesis. Stockholm, Royal Vet. College, p. 83, 1971.

RATES, D.M. Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, 2011.

RODENAS, C.E.O; MURGAS, L.D.S; MACIEL, M.P. et al. Seminal Characteristics of cockerels fed with supplemented ration with different oils and levels of vitamin E. Cienc. Agrotec. v. 29, p.160-167, 2005.

RODRIGUES, M.P. Perfil oxidativo e Avaliação funcional de sêmen criopreservado de Touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical .2009.144 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAIFY, Z.S. et al. A study on fatty acid composition of fish oil from two marine fish, *Eusphyra blochii* and *Carcharhinus bleekeri*. Pak J Pharm Sci. v, 13, p. 5-12, 2000.

SALVIANO, M.B; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 32, n. 3, p.159-167, 2008.

SAMPAIO, B.F.B. Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo, α -tocoferol e ácido docosahexaenoico ao diluidor de refrigeração do sêmen equino. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CAMPO GRANDE, MS 2015.

SANTOS, A. D. F. et al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 35, p. 1934-1942, 2006.

SANTOS, B. M. B. Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo. 2013. 66p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2013.

SANTOS, F.C.B. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do Nordeste brasileiro. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, p. 142-149, 2005.

SHAHIDI, F. Lípidos y proteínas funcionales del pescado In: MAZZA, G. Alimentos funcionales. Zaragoza: Editorial Acribia, v. 108, p. 381-401, 1998.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion *Lipid Sci. Technol.*, v. 112, p. 930–940, 2010.

SILVA, M.S.F. Criopreservação de sêmen caprino com inclusão de óleo de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) no diluidor. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

SILVA, R.O C. Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação de sêmen caprino. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, 2011.

SILVA, S.V; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte, v. 35, p. 370-384, 2011.

SIMPLÍCIO, A.A., MACHADO, R. Fertilidade em cabras inseminadas com sêmen congelado durante o estro natural ou sincronizado com MGA, eCG e cloprostenol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, p. 362, 1991.

SIMPLÍCIO, A.A; FREITAS, V.J.F; SANTOS, D.O. Biotécnicas da Reprodução em Caprinos. *Rev. Ciênc. Agrár.* Belém, v. 43, 2005.

SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnol. Cienc. Agrop.*, v. 3, p. 53-63, 2009.

SOHAIL, M.U. et al., Ascorbic Acid Inclusion in Semen Extender Improves the Post-Thawed Semen Quality of Sahiwal Cattle (*Bos indicus*). *Pakistan J. Zool.*, v. 47, p. 1571-1577, 2015.

SONG, G.J; NORKUS, E.P; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J androl*; v29: p. 569-75, 2006.

SOUSA, A.P. et al., Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Hum Reprod*, v. 24, p. 28-36, 2009.

SOUZA, R. S. Perfil metabólico, qualidade e congelabilidade seminal de reprodutores caprinos suplementados com semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) na dieta. 2012. 152p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012.

SPIZZIRI, B. E. et al. Cholestesrol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 255-264, 2010.

SPIZZIRI, B. E. et al. Cholestesrolloaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *An. Reprod. Sci.* v. 118, p. 255-264, 2010.

STRZEZEK, J. et al., Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology*, v. 4, p. 271–287, 2004.

SURAI, P.F, et al., Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. *J Reprod Fertil*, v. 120, p. 257–264, 2000.

SUSENO. S.H. et al., Fatty Acid Composition of Some Potential Fish Oil from Production Centers in Indonesia. *Orient. J. Chem.*v. 30(3), p.975-980, 2014.

TAKAHASHI, T. et al. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals, Berlin*, v. 47, p. 92-97, 2012.

TAKAHASHI, T. et al., Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.92-97, 2012.

TOWHIDI, A. et al., Combined n-3 fatty acids and α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 238-243, 2013

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*, v. 2, p. 1051-1056, 2012.

UAUY, R; DANGOUR, A.D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr Rev*;v. 64, p.24-33, 2006.

UPRETI, G.C. et al., studies on the measurement of phospholipase 2(PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Ani. Reprod. Sci.* v.56, p. 107-121, 1999.

UYSAL. O; BUCAK, M.N. Effect of oxidized serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Veterinaria*. v. 76, p. 383-390, 2007.

WASSALL, S.R; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1788, p.24–32, 2009.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. v.7, p. 871–891,1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.

YEHUDA, S. et al., The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology of Aging*. v. 23, p. 843–853, 2002.

YOSHIMOTO, S. et al., M. AW-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. v 105, 2469–2474. 2008.

ZANINI, S. F; TORRES, C.A.A; BRAGAGNOLO, N. et al. Source of oil and vitamin E levels on the productive performance of cockrels. Brazilian Magazine of Poultry Science, Campinas, n. 5, p. 71, 2003.

ZINI, A; GARRELS, K; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. Urology, v.55, p.922-926, 2000.