

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SUPLEMENTAÇÃO DE TOUROS COM SABÕES CÁLCICOS DE ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS E QUALIDADE SEMINAL PRÉ E PÓS-CONGELAÇÃO.

MÓNICA MARCELA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SUPLEMENTAÇÃO DE TOUROS COM SABÕES CÁLCICOS DE ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS E QUALIDADE SEMINAL PRÉ E PÓS CONGELAÇÃO.

Autor: Mónica Marcela Ramírez Hernández

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory.

Co-Orientador: Prof.Dr. Harold Ospina Patino.

PORTO ALEGRE

2010

"Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas; para os cientistas, no final de toda reflexão".

Max Planck

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por eles serem os primeiros e principais mestres na minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela concessão da bolsa que me permitiu continuar o mestrado e finalizá-lo com sucesso.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por fornecer as condições necessárias à minha formação de Mestrado.

À Central de Coleta e Processamento de sêmen PROGEN[®] e toda a sua equipe, pela extrema boa vontade e apoio na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo Macedo Gregory pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao Professor Dr. Harold Ospina Patino, o qual tem auxiliado não só meu crescimento profissional, mas também meu crescimento pessoal, sempre me proporcionando apoio, ensinamentos e acima de tudo amizade.

À Professora Dra. Mari Lourdes Bernardi pela ajuda na avaliação dos resultados.

Ao homem da minha vida, amigo, companheiro e namorado Camilo, que esteve sempre ao meu lado me incentivando em todos os momentos, tornando tudo mais fácil, além de proporcionar na minha vida mais um sonho.

Aos meus amigos e colegas do grupo de Suplementação de Ruminantes pela alegria ao fazer o trabalho e trabalhar como um verdadeiro time.

Ao Laboratório de Nutrição Animal, Reprolab, Laboratório de Inseminação Artificial e muito especialmente à Empresa Arm & Hammer Megalac-E[®].

RESUMO

O objetivo do experimento foi avaliar o efeito da suplementação de touros adultos com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) sobre as características qualitativas do sêmen pré e pós-descogelação. Foram utilizados vinte touros com idades entre 4 e 10 anos, das raças Angus, Braford, Brangus e Hereford distribuídos aleatoriamente em dois grupos com dez touros cada um. Os tratamentos avaliados foram: sabões cálcicos ou suplementação energética. Os touros foram mantidos em piquetes individuais e alimentados durante 77 dias com dietas isoenergéticas elaboradas com: forragem verde, concentrado comercial, sal mineral e sabões cálcicos ou suplemento energético. Os touros recebendo o tratamento com sabões cálcicos (SF) receberam 200 g/dia de Megalac-E[®] e os do tratamento com suplemento energético (SE) receberam 750 g/dia de raspa de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). A coleta do sêmen foi realizada a cada 15 dias utilizando vagina artificial e as amostras de sêmen avaliadas quanto ao volume, concentração, motilidade, morfologia, avaliação da integridade do acrossoma e diferenciação de espermatozóides vivos de mortos por meio de coloração tripa azul/giemsas, avaliação da integridade da membrana da cauda por meio de teste hiposmótico (HO) e longevidade dos espermatozóides por meio de teste de termorresistência (TTR). Também foram coletadas amostras de sangue para avaliação das concentrações de testosterona. O tipo de suplemento energético não afetou o volume e a concentração de espermatozóides, nem a concentração de testosterona no sangue. O sêmen de touros suplementados com sabões cálcicos de PUFA apresentou valores superiores quanto à motilidade espermática (83,3% vs. 75,3%), percentagem de espermatozóides vivos (94,8% vs. 91,8%) e número de espermatozóides com acrossoma íntegro (98,0% vs. 96,6%). Interações significativas foram encontradas entre tratamento e coleta para percentagens de espermatozóides normais ($p = 0.0344$) e percentagens de espermatozóides positivos ao HO ($p = 0.0168$). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para percentagens de motilidade dos espermatozóides pós-congelação, nem motilidade após o teste de termorresistência (TTR) aos 30 minutos e aos 60 minutos. Os resultados do HO do grupo recebendo suplemento funcional não foi diferente do grupo com suplemento

energético. Durante o período de suplementação o grupo com suplemento funcional teve percentagens maiores de espermatozóides vivos (51,5% vs. 42,2%) e com acrossoma íntegro (48,0% vs. 39,2%) quando comparado com o grupo que recebeu suplemento energético. A suplementação com sabões cálcicos de PUFA em touros pode influenciar positivamente nas características qualitativas do ejaculado conferindo maior resistência aos espermatozóides submetidos a processos de criopreservação.

Palavras Chave: Touros, sabões cálcicos, mandioca, características seminais, ácidos graxos poli-insaturados.

ABSTRACT

The aim of this experiment was evaluate of the effect of the supplementation of adult bulls with calcium soaps of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the qualitative characteristics of the semen subjected to cryopreservation and thawing. Twenty adult bulls Angus, Hereford, Brangus and Braford were randomly assigned into two groups; they were subjected to two types of treatment: (SF) calcium soap; (SE) and energy source. The bulls were kept in individual pens and, during 77 days, they were fed on isoenergetic diets prepared with green grass, commercial concentrate, mineral salt, and calcium soaps of PUFA or energy supplement. The treatment supplemented with calcium soaps of PUFA received 200 g/d of Megalac-E[®]; and the treatment supplemented with other energy source received 750 g/d from cassava meal (*Manihot esculenta*, Crantz). During the period of the experiment, five collections of semen were performed with artificial vagina; the semen samples were evaluated considering the following variables: seminal volume, sperm concentration, sperm motility, morphology, evaluation of acrosome intact and differentiation of live and dead spermatozoa by staining tripan blue/giemsas, evaluation of the integrity membrane sperm through hypoosmotic swelling test (HO) and evaluation of longevity of sperm using the heat resistance tests (TTR). Two blood samplings were performed for assessing the concentration of blood testosterone. The results regarding the volume, sperm concentration and blood testosterone concentrations did not differ significantly between treatments during the experimental period. The group supplemented with calcium soaps of PUFA presented improvements in the percentages of sperm motility (83.3% vs. 75.3%). The percentages of live sperm (94,8% vs. 91,8%) and those with intact acrosome (98,0% vs. 96,6%) were higher compared with the group that received energy supplement. Significant interaction was found between treatments and samplings with regard to the percentage of normal sperms ($p = 0.0344$) and those with positive reaction to the HO ($p = 0.0168$). No significant differences were found between treatments in the percentages of the post-freezing motility and the motility of sperm subjected to TTR after 30 minutes and after 60 minutes showed no significant differences between treatments. The results of HO were not different between the groups with functional and energy supplement. During the supplementation period, the group with functional supplement

presented higher percentages of live sperm (51,5% vs. 42,2%) and sperms with intact acrosome (48,0% vs. 39,2%) when compared with the group that received energy supplement. Supplementation with calcium soaps of PUFA can provide better features and higher resistance to sperm when submitted to the process of cryopreservation and thawing.

Keywords: Bulls, calcium soaps, cassava, seminal characteristics, polyunsaturated fatty acids.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Centígrados
µg	micrograma (s)
µL	microlitro (s)
17-OHase	17-Hidroxiprogesterona
17-β-HSD	Hidroxiesteriode Deshidrogenase
3b-HSD	3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ-5-4 isomerase
AA	Ácido Araquidônico
BW	Body Weight
CFDA	Carboxifluoresceína Diacetato
DHA	Ácido Docosaheptanóico
DPA	Ácido Docosapentanóico
E.S	Erro Standard
EE	Extrato Etéreo
EFA	Ácidos graxos essenciais
EM	Energia Metabolizável
EPA	Ácido Ecosapentanóico
FDA	Fibra Detergente Ácida
FDN	Fibra Detergente Neutra
FIV	Fecundação in vitro
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	grama
HO	Teste Hipoosmótico
IA	Inseminação Artificial
IP	Iodeto de Propílio
Kg	Quilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
LIG	Lignina
Mcal	Megacalorias
mL	mililitro (s)

mOsm	miliosmol (es)
MS	Matéria Seca
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
ng	nanograma (s)
PB	Proteína Bruta
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
PV	Peso Vivo
SAS	Sistema de Análise Estatístico (Statistical Analysis System)
sptz	Espermatozóides
SE	Suplemento Energético
SF	Suplemento Funcional
SM	Esfingomielina
TE	Transferência de embriões
TTR	Teste de Termorresistência
TTR/L	Teste de Termorresistência Lento
TTR/R	Teste de Termorresistência Rápido

LISTA DE TABELAS E GRAFICOS

ARTIGO

Tabela 1. Composição bromatológica e componentes dos ingredientes utilizados na formulação das dietas.....	30
Tabela 2. Componentes em percentagem de peso vivo (% PV).....	30
Tabela 3. Motilidade espermática, percentagens de acrossomas íntegros e de espermatozóides vivos dos touros alimentados com dietas contendo suplementos funcional e energético.....	34
Gráfico 1. Interações significativas entre tratamento e coleta foram encontradas para percentagem de espermatozóides normais dos touros durante o período de suplementação.....	35
Gráfico 2. Interação significativa entre tratamento e coleta para percentagem de espermatozóides que reagiram positivamente ao teste hipoosmótico.....	36
Tabela 4. Percentagens de motilidade pós-congelação, motilidade aos 30 minutos (TTR), motilidade aos 60 minutos (TTR) e percentagens de HO positivo. Valores em Media (erro standard).....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Qualidade Seminal	14
2.2	Testes de avaliação da qualidade seminal	14
2.3	Efeito deletério da criopreservação/aquecimento sobre a qualidade seminal	17
2.4	Ácidos graxos poli-insaturados essenciais e composição de membranas celulares	19
2.5	Ácidos graxos poli-insaturados e seu efeito sobre a reprodução	20
2.6	Utilização de sabões cálcicos e seu efeito sobre a reprodução	23
3	Artigo	25
3.1	Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelação	25
	Resumo.....	25
	Abstract.....	26
	Introdução.....	27
	Material e Métodos.....	29
	<i>Local e duração do experimento</i>	29
	<i>Tratamentos</i>	29
	<i>Area experimental</i>	31
	<i>Unidades experimentais</i>	31
	<i>Condução do experimento</i>	31
	<i>Análise estatística</i>	32
	Resultados.....	34
	Discussão.....	37
	Conclusão.....	41
4	Considerações Finais e Perspectivas	42
5	Referências Bibliográficas	43

1. INTRODUÇÃO

A fertilidade é um dos parâmetros mais importantes na determinação da eficiência bioeconômica na pecuária de corte.

Os níveis de fertilidade são o resultado de uma combinação de fatores relacionados com o potencial genético, as condições ambientais e o manejo sanitário e nutricional. Embora a fertilidade verdadeira do touro não seja determinada antes de ser usado em uma vaca, podem ser usados testes e avaliações para prever o potencial de fertilidade (KASTELIC e THUNDUNATHIL, 2008).

A alta fertilidade do touro é um dos componentes-chaves na produção bovina eficiente, cada animal pode proporcionar milhares de doses de sêmen e acasalar-se com muitas fêmeas por ano, quando utilizado em biotecnologias como inseminação artificial, transferência de embriões e fecundação *in vitro*. Por tanto a qualidade seminal tem grande importância no sucesso ou fracasso das principais biotecnologias da reprodução utilizadas atualmente (PAES et al, 2008).

Para a estimativa da fertilidade de uma amostra de sêmen após a criopreservação podem ser avaliadas *in vitro* algumas características do espermatozóide. Resultados de trabalhos, testando correlações das avaliações em laboratório com as taxas de fertilidade *in vivo* são muito variáveis, uma das causas desta variabilidade se deve ao fato de que a população de espermatozoides obtidos para análise das amostras de sêmen congelado é muito heterogênea (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006), além das múltiplas variáveis que possam estar influenciando incluindo as das fêmeas.

Pesquisas que associaram qualidade de sêmen e qualidade embrionária, encontraram que os touros diferem no número de espermatozoides que chegam até o ovócito, e igualmente diferem na qualidade dos embriões produzidos (SAACKE, 2009). Portanto, as avaliações de laboratório usadas para testar o sêmen são uma importante ferramenta na predição da qualidade das amostras de material criopreservado. Como também, especial atenção deve ser dada na melhoria da qualidade dos espermatozoides, obtendo-se, desta forma, uma população com melhores características e maior resistência aos processos de

manipulação e estresse, como é o caso da criopreservação e posterior descongelamento.

A produção e qualidade do sêmen são influenciadas por vários fatores, dos quais um dos mais importantes é a nutrição. O nível energético na dieta tem sido um dos componentes mais estudados na influência da nutrição sobre a reprodução (BARTH et al, 2008).

Alimentos que possuem propriedades nutricionais básicas e benefícios fisiológicos específicos são conhecidos como alimentos funcionais (MORAES e COLLA, 2006). As fontes de ácidos graxos poli-insaturados têm demonstrado afetar benéficamente funções alvo específicas no corpo, sendo assim considerados alimentos funcionais.

O fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados essenciais (Ômega-6 e Ômega-3) na dieta pode influenciar positivamente a reprodução, incrementando a concentração de precursores para síntese de hormônios esteróides, intervindo sobre a proporção de fosfolípidios das membranas do espermatozóide e sobre a capacidade fecundante.

O objetivo do experimento foi suplementar touros adultos com uma fonte comercial de sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados (Megalac-E[®]) e verificar o seu efeito sobre a qualidade seminal pré e pós-congelamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Qualidade Seminal

A fertilidade do touro é um dos fatores mais relevantes nos sistemas de produção. Trata-se de uma característica complexa que envolve vários aspectos capazes de afetá-la (CAMMACK et al, 2009).

A principal função do espermatozóide é a fecundação do ovócito, isto inclui a integração de uma série de processos que estão associados a múltiplos atributos celulares (GRAHAM, 2001). A célula espermática deve possuir motilidade, atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossoma intacto (GRAHAM e MOCÉ, 2005). Igualmente os padrões de movimentação flagelar, velocidade diferencial (vigor), equilíbrio osmótico e a integridade dos peptídeos da membrana, determinam que os espermatozoides estejam aptos para a fecundação (MICELI et al, 2008).

Claramente o sucesso da fecundação não é limitado às anomalias ou motilidade espermática e sim ao conjunto de processos bioquímicos, biofísicos e metabólicos necessários para que os espermatozoides realizem a fecundação (MICELI et al, 2008).

2.2. Testes de avaliação da qualidade seminal

A avaliação do sêmen é um componente importante na estimação do desempenho reprodutivo de um macho e do rebanho. A valoração de uma amostra de sêmen pode determinar o grau de qualidade antes de ser usado em monta natural ou processado, seja para Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões (TE) e Fecundação *in vitro* (FIV). Usualmente esta avaliação inclui estimações de volume, concentração, motilidade e morfologia espermática. Atualmente avaliações que detalham a função do espermatozóide têm sido incorporadas, buscando prever o potencial de fecundação, e em longo prazo revelar a fertilidade do macho a partir das amostras de sêmen coletadas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006).

Diferentes artigos reportam acerca da correlação entre fertilidade e motilidade espermática (KJAESTAD et al, 1993; STALHAMMAR, 1994; JANUSKAUSKAS et al, 2001) e entre morfologia e fertilidade (GRAHAM et al, 1980; SARDER, 2004). Igualmente análises de amostras de sêmen de touros usados para IA que utilizam avaliações computadorizadas, demonstram correlações variáveis entre padrões de motilidade e fertilidade a campo (ZHANG, 1998; JANUSKAUSKAS et al, 2001). Contudo, a estimação da fertilidade pela morfologia depende da metodologia utilizada e da qualidade da amostra de sêmen analisada (KUSTER et al, 2004), além disso, a integridade da membrana espermática está mais relacionada com a fertilidade do que a motilidade (JANUSKAUSKAS et al, 2001; PEÑA et al, 2005).

A integridade e estabilidade da membrana espermática são prerequisites para a viabilidade do espermatozóide, entretanto uma membrana intata, mas funcionalmente instável é incapaz de interagir com o meio e fecundar o ovócito (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). O teste hipoosmótico (HO) foi desenvolvido por Jeyendran et al. (1984) para avaliação da funcionalidade da membrana espermática e é utilizado com sucesso em sêmen de varias espécies (CAIZA DE LA CUEVA et al, 1997; BORETTO et al, 2000). Correlações de 0,90 entre espermatozóides que reagiram ao teste de penetração de zona pelúcida e HO (JEYENDRAN et al, 1984) e de 0,57 com o índice de prenhez foram encontradas (CORREA et al, 1997). Outros autores não encontraram correlação do teste com a taxa de clivagem de mórulas e blastocistos (ROTA et al, 2000; BRITO et al, 2003).

No teste hipoosmótico o fluido é transferido dentro da célula por meio da membrana do espermatozóide. As membranas funcionalmente intactas têm uma expansão da cauda (enrolamento) e são denominadas como HO positivas. Espermatozóides com membranas funcionalmente defeituosas, não sofrem expansão e as caudas não reagem (JEYENDRAN et al, 1984).

Além de funcional a membrana deve apresentar-se estruturalmente integra. Métodos de coloração com corantes supra-vitais aumentam as possibilidades de uma avaliação mais criteriosa da integridade estrutural das membranas do espermatozóide. A combinação de Tripán Azul e Giemsa pode ser utilizada para determinar a integridade da membrana

plasmática, assim como, da membrana do acrossoma, o Tripán Azul é um corante capaz de detectar espermatozóides vivos e mortos já o Giemsa distingue presença ou ausência do acrossoma (DIDION et al, 1989). A avaliação concomitante da integridade física e funcional da membrana espermática usando HO, e integridade da membrana plasmática e acrossomal usando dupla coloração (Tripán Azul/Giemsa), podem explicar grande proporção da variação da fecundação *in vitro*, pelo que são considerados testes recomendados para prever o potencial de fecundação em amostras de sêmen usadas para IA e FIV (TARTAGLIONE e RITA, 2004).

Muitas colorações fluorescentes e combinações de fluoróforos têm sido desenvolvidas para avaliar diferentes características dos espermatozóides em várias espécies de mamíferos (VICKERS et al, 1990). A integridade da membrana espermática pode ser avaliada em sêmen fresco e congelado-descongelado por meio de carboxifluoresceína diacetato (CFDA) e Iodeto de Propídio (PI) (ROTA e FORSBERG, 1995.). As colorações fluorescentes são baseadas na ligação específica de lecitinas fluorescentes ou anticorpos da membrana acrossomal detectando quebra ou danos da matriz, sendo de especial importância para avaliação de espermatozóides que sofreram estresse físico (congelamento-descongelamento), mas os fluoróforos não são adequados para avaliar a existência de defeitos primários do acrossoma, fazendo-se necessária a complementação com outras técnicas de coloração (PEÑA-MARTÍNEZ, 2004).

Um dos fatores responsáveis pela queda na fertilidade do sêmen após a descongelamento, decorre da diminuição do período de sobrevivência dos espermatozóides, provocado por alteração na qualidade das membranas espermáticas e mudanças das estruturas celulares, geradas pelos processos de criopreservação e posterior aquecimento quando a descongelamento (DA SILVA et al, 2006).

Testes envolvendo resistência metabólica espermática, simulando o trajeto dos espermatozóides pelo trato genital da fêmea foram desenvolvidos e testados com a fertilidade a campo. Dimitropoulos (1967) denominou teste de termorresistência (TTR) à prova que consiste na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria em tempos e temperaturas pré-determinadas, a motilidade e vigor são avaliados durante a execução do teste. De acordo com Henry e Neves (1998) uma amostra que apresente 15% de motilidade

progressiva retilínea e vigor 3 ao final do teste, pode ser considerada como uma partida de sêmen de boa qualidade.

Muitas técnicas foram sucessivamente desenvolvidas, levando em consideração a temperatura e o tempo de incubação das células espermáticas. Arruda et al (1998) avaliaram sêmen congelado de bovino com dois protocolos de temperatura e tempo (TTR/L 38°C por 5 horas e TTR/R 45°C por 1 hora), para verificação da fertilidade a campo, não obtendo diferença nas taxas de prenhez de fêmeas inseminadas com sêmen submetido a ambas provas de termorresistência.

2.3. Efeito deletério da criopreservação/aquecimento sobre a qualidade seminal

A criopreservação de células e ferramentas como a IA tem contribuído com o progresso da genética e avanço da produção animal moderna. Por conta da IA o ejaculado de um macho geneticamente superior pode ser usado para fecundar múltiplas fêmeas, maximizando a distribuição de genes de touros melhoradores (BAILEY et al, 2000). A criopreservação efetiva do sêmen precisa de um grande número de espermatozóides para conseguir taxas de fecundação similares às *in vivo* (VISHWANATH, 1995). As injúrias que sofre o sêmen pelos processos de criopreservação e posterior descongelação afeta o transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea (SALAMON e MAXWELL, 1995).

O primeiro dano induzido pela criopreservação ocorre na membrana espermática (PARKS e GRAHAM 1992; WATSON, 1995). Avaliação por criomicroscopia eletrônica e marcadores para integridade de membrana demonstraram que a exposição dos espermatozóides a baixas temperaturas seguido de aquecimento, afeta a membrana plasmática da peça principal, peça intermediária, além de danos irreparáveis na membrana acrossomal (NORTH e HOLT, 1994; PÉREZ et al, 1996). Processos de criopreservação e posterior aquecimento induzem alterações no equilíbrio osmótico da célula, provocando grande estresse mecânico às membranas celulares (HAMMERSTEDT et al, 1990; NOILES et al, 1997). Medições morfométricas em sêmen de touros indicam que as cabeças dos

espermatozoides expostos a criopreservação são menores quando comparadas com espermatozoides de sêmen fresco, refletindo uma possível modificação permanente na arquitetura da membrana (GRAVANCE et al, 1998). Danos ultra-estruturais durante a criopreservação desestabilizam a membrana espermática, predispondo a defeitos como anormalidades ou mesmo perda do acrossoma (BAYLEY et al, 1994).

Outras modificações da membrana espermática durante a congelação ou descongelação podem agravar a baixa na fertilidade do sêmen criopreservado. Geralmente ocorrem mudanças na organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica (NOLAN et al, 1995). Os fosfolípidios da membrana do espermatozoide são distribuídos assimetricamente entre a camada bilipídica, a fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) são localizados no interior da camada, enquanto a esfingomiéline (SM) e fosfatidilcolina (PC) ficam na camada externa (HAMMERSTEDT et al, 1990; GADELLA et al, 1999). Esta assimetria acontece após a perda progressiva das funções da membrana plasmática do espermatozoide (MUHAMMAD et al, 2002). Diferença da sensibilidade do sêmen à criopreservação entre espécies é atribuída às variações na composição das membranas espermáticas, a susceptibilidade da membrana plasmática submetida à transição lipídica tem sido inversamente relacionada à proporção de colesterol presente (PETER e NOBLE 2001). A membrana espermática de touros e carneiros tem baixo nível de colesterol, considerando-se, por este motivo, mais sensíveis à criopreservação (BAYLEY et al, 1994).

A capacitação das membranas espermáticas esta associada com a reorganização da membrana plasmática da cabeça devida à redistribuição dos fosfolípidios e remoção do colesterol (LANGLAIS e KENNETH, 1984; KAN e LIN, 1996). Watson (1995) sugeriu que a criopreservação induz modificações na membrana espermática similares com a capacitação. Pérez et al. (1996) demonstraram por meio de teste de fluorescência, que sêmen de carneiro criopreservado apresentou taxas de capacitação maiores quando comparado com sêmen fresco. O mesmo fenômeno ocorre com sêmen de bovino submetido a processos de congelação-descongelação diluído em diferentes meios de criopreservação (CORMIER et al, 1997). Existem muitas semelhanças entre os danos à membrana espermática ocorridos na criopreservação e a reação acrossômica. Harrison (1996)

descreveu a capacitação espermática como “uma janela de desestabilização” onde o espermatozóide adquire habilidade de fecundação, mas as membranas são susceptíveis a degeneração e espontânea reação acrossomal impossibilitando a fecundação. Em conclusão, pode se especular que a capacitação espermática e a criopreservação compartilham importantes características, sendo uma versão desorganizada uma da outra (WATSON, 2000).

Pesquisas voltadas ao melhoramento da estabilidade da membrana espermática fazem se necessárias para otimizar o potencial de fecundação do sêmen, e conseqüentemente o desempenho reprodutivo do touro.

2.4. Ácidos graxos essenciais e composição de membranas celulares

Os ácidos graxos essenciais são ácidos graxos poli-insaturados que não podem ser sintetizados pelo organismo, tendo, por este motivo, necessariamente que serem consumidos na dieta. Os ácidos graxos essenciais (EFA) ômega-6 e ômega-3 participam numa ampla gama de funções essenciais no corpo entre as quais podem ser citadas: o crescimento neonatal, desenvolvimento de atividades cerebrais e visão, alteração na produção de leucotrienos, participação do metabolismo das prostaglandinas e fazem parte dos fosfolipídios das membranas celulares (ABAYASEKARA e WHATES, 1999).

A forma mais comum de classificação dos EFA é baseada no número de carbonos entre o grupo metil terminal e primeiro duplo enlace. Segundo esta classificação os ácidos graxos essenciais agrupam-se nas famílias ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) (LAPOSATA, 1995). O ácido linoléico pertence à família n-6 e o ácido linolênico à família n-3, ambos são convertidos em metabólitos ativos no corpo como ácido araquidônico (AA), ácido ecosapentanóico (EPA) e docosahexanóico (DHA) por meio de desnaturação e alongação (HORROBIN, 1993).

Todos os fosfolipídios têm um papel importante na formação da bicamada lipídica das membranas celulares, proporcionando propriedades de intercambio de cargas à superfície e provendo um ambiente hidrofóbico apropriado para as proteínas. Dos ácidos graxos essenciais o DHA é o ácido graxo de cadeia longa comumente encontrado nas membranas biológicas.

Especial interesse existe na utilização dos EFA por estarem relacionados ao colesterol e pela sua participação em funções bioquímicas relacionadas com fluidez, densidade, estabilidade e permeabilidade da membrana celular (STILLWELL e WASSAL, 2003).

Cadeias longas de ácidos graxos poli-insaturados têm sido detectados nos espermatozoides de varias espécies mamíferas incluindo os ruminantes (POULOS et al, 1986). No caso do bovino o DHA representa ao redor de 55% do total de ácidos graxos, concentrado em forma de fosfaditiletanolamina e fosfatidilcolina (PETERS e BALL, 2004).

A composição lipídica da membrana espermática é um dos maiores determinantes da motilidade, sensibilidade a processos de congelação-descongelação e fatores associados com a viabilidade do sêmen (PETER et al, 2001). Proporções maiores de fosfolipídios e colesterol presentes nas membranas espermáticas de humanos e coelhos conferem maior resistência ao choque térmico dos espermatozoides, quando comparados aos de espécies com uma proporção menor de fosfolipídios e colesterol como os encontrados nos eqüídeos, ovinos e bovinos (PARKS e LYNCH, 1992).

Esta particularidade tem suscitado o estudo de alternativas como aumento do teor de colesterol nos diluentes. Por outro lado, sabe-se que a adição de colesterol nos diluentes pode afetar a habilidade da capacitação e reação acrossomal para o sucesso da fecundação. Deste modo, há que se buscar alternativas capazes de conferir uma maior estabilidade e resistência à própria membrana espermática.

2.5. Ácidos graxos poli-insaturados e seu efeito sobre a reprodução

A relação entre a nutrição e a capacidade reprodutiva dos machos tem recebido uma especial atenção especialmente quanto ao nível energético das dietas. Apesar de este aspecto ser de maior relevância nos animais em desenvolvimento e pré-púberes (BARTH et al, 2008). Em machos adultos as necessidades em relação a conteúdo de energia na dieta para os processos reprodutivos, estão relacionadas ao preenchimento das exigências nutricionais para manutenção do peso e produção espermática (STEVERMER et al, 1961; MOSS e DUNN., 1992.). A incorporação de ácidos graxos nas dietas dos ruminantes tem sido uma das melhores opções para

incrementar a energia, pois eles têm um potencial energético 2,25 vezes maior que os carboidratos (Mc DONALD et al, 2002). Desta forma melhora-se o balanço energético e como consequência a reprodução (STAPLES et al, 2002).

Mais recentemente, o aumento no desempenho reprodutivo tem se relacionado com as propriedades de alimento funcional que possuem os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (BRIAN et al, 1992). Alimentos funcionais são todos aqueles ingredientes que quando fornecidos regularmente apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas, favorecendo uma ou mais funções alvo no corpo (COLLA e MORAES, 2006). Segundo esta definição é possível afirmar que alimentos ricos em PUFA (especialmente os EFA) podem ser considerados alimentos funcionais.

O ácido linoléico da série n-6 e o ácido linolênico da série n-3 são os principais EFA supridos na dieta, estes são metabolizados pelo organismo mediante uma seqüência de reações enzimáticas e convertidos em metabólitos que participam em importantes funções das células do corpo, tanto funcionais como estruturais (HORROBIN, 1993). Entre as principais fontes de ômega-6 e ômega-3 estão os óleos vegetais de milho, girassol, linhaça e canola, podendo também ser encontrados em cloroplastos de vegetais verdes e pastagens. As proporções de PUFAS da dieta consumida pelas espécies monogástricas refletem diretamente na composição das membranas celulares e tecidos do organismo (WHATES et al, 2007).

O teor de PUFA da dieta tem influência na fertilidade provendo compostos específicos requeridos para o desenvolvimento dos espermatozoides e ovócitos. Também podem influenciar indiretamente, pelo impacto sobre as concentrações de hormônios e sinais metabólicos circulantes que são requeridos para o êxito de processos tais como ovulação, fecundação e sobrevivência do embrião (ROBINSON et al, 2006). Desta forma, alterações nas concentrações de PUFA na dieta têm sido relacionadas com mudanças na composição de ômega-6 e ômega-3 das membranas dos espermatozoides de cachacos (CEROLINI et al, 2001) e galos (ZANINI et al, 2003; ZANIBONI et al, 2005), e igualmente associados a eventos relacionados com a fusão espermatozóide-ovócito e sucesso da fecundação (WATHES et al, 2007).

Inclusões de PUFA na dieta de machos que apresentam espermatozoides susceptíveis aos choques térmicos, como é o caso em 30% do sêmen de garanhões que não resiste

aos processos de resfriamento e congelação, mostraram melhoria na qualidade seminal e aumento na concentração espermática (SQUIRES, 2007). Entretanto, em carneiros a suplementação com óleos virgens de oliva e girassol teve um impacto negativo sobre a motilidade espermática, viabilidade e integridade acrossomal (GRAAF et al, 2007). Estes resultados negativos, podem ser atribuídos à dificuldade da transferência dos PUFA da dieta à membranas celulares dos ruminantes, devida à ação dos microorganismos do rúmen sobre os ácidos graxos (JENKINS, 1993).

A composição de PUFA do sangue, membranas celulares, tecidos e leite nos animais não ruminantes estão associados à sua dieta. Os ruminantes apesar de possuírem em sua dieta fontes de PUFA, o conteúdo do sangue, membranas celulares, tecidos e leite é principalmente constituído por ácidos graxos saturados. Esta diferença é devida à biohidrogenação que ocorre no rúmen, onde os PUFA contidos na dieta ficam na sua maioria convertidos em ácidos graxos saturados pela atividade dos microorganismos ruminais (BRIAN et al, 1992). Por outro lado, as dietas dos ruminantes, geralmente não podem exceder teores maiores que 4 a 5% do conteúdo em lipídios, o que pode acarretar redução na eficiência dos microorganismos ruminais com efeito negativo sobre sua habilidade na digestão da fibra (WHITE et al, 1958; PALMQUIST, 1996).

Os ácidos graxos são componentes dos fosfolipídios das membranas celulares, podendo afetar as propriedades e a interação entre seus componentes que estão diretamente relacionados com o transporte de proteínas, atividade enzimática e receptores de membrana (ROCHE, 1999). Estudos em camundongos têm demonstrado relações entre mudanças na composição dos lipídios da membrana e estímulo dos receptores de LH (SEBOKOVA et al, 1990) e atividade esteroidogênica do testículo (MEIKLE et al, 1989).

Em humanos e animais a composição dos alimentos, especialmente os PUFA, afeta o metabolismo e secreção dos esteróides (GROMADZKA-OSTROWSKA, 2006). Efeito de dietas com diferentes níveis de gorduras e proteínas sobre a atividade de enzimas esteroidogênicas (3 β -HSD, 17-OHase, C-17,20-lyase, 17 β -HSD) e níveis de testosterona em plasma foram testados. As dietas com fontes protéicas não tiveram efeito sobre a atividade das diferentes enzimas esteroidogênicas. Ao contrario as dietas com fontes de gorduras tiveram efeito tanto na atividade das enzimas como nos níveis de testosterona (McVEY et al, 2007).

Trabalhos realizados para testar a influencia de diferentes tipos de fontes, níveis e períodos de suplementação com ácidos graxos, sobre o metabolismo e secreção de andrógenos em camundongos, mostraram que níveis de andrógenos no plasma e a atividade de 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) no testículo foram afetadas no grupo de camundongos submetidos à dieta com nível normal ou alto de PUFA por diferentes períodos. Os autores concluíram que as dietas ricas em PUFA estimulam a função esteriodogênica testicular dos camundongos (GROMADZKA-OSTROWSKA et al, 2002).

2.6. Utilização de Sabões Cálcicos e seu efeito sobre a reprodução.

Os sabões cálcicos (inertes ou by-pass) são produtos desenvolvidos para os ruminantes, e são caracterizados por seu efeito mínimo inibitório sobre o metabolismo dos microorganismos ruminais, sem afetar a digestibilidade intestinal, o que garante a sua estabilidade da composição até serem absorvidos pelo organismo (PALMQUIST, 1991; WU et al, 1991). Em termos gerais, os efeitos benéficos da suplementação com sabões cálcicos nas fêmeas têm sido atribuídos a efeitos calóricos e não calóricos (MATTOS et al, 2000). O efeito calórico é associado com o potencial energético das gorduras melhorando o balanço energético do animal e afetando positivamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, levando deste modo, a produções em níveis adequados de LH e FSH regulando adequadamente o ciclo estral (WEBB et al, 2004). Outros trabalhos relatam incremento no desempenho reprodutivo pela relação com a síntese e metabolismo de precursores de hormônios esteróides, como por exemplo, colesterol (PETIT e BUHR, 1998; BACH, 2003).

Em machos, estudos recentes têm focado o efeito da suplementação com PUFA sobre a melhoria na produção e qualidade seminal, como também uma possível relação com uma melhora nos resultados de criopreservação devidos à estabilidade na composição dos fosfolipídios da membrana, o que pode afetar positivamente os eventos da fecundação (KELSO et al, 1997; ARLAS et al, 2008). A suplementação com fontes de PUFAS e EFA em ruminantes tem mostrado resultados discordantes, Graaf, et al. (2007) reportam impacto negativo sobre algumas características do sêmen de carneiros suplementados com dietas ricas em ômega-3 e ômega-6, por outro lado, um trabalho recente suplementando búfalos Nili-Ravi com óleo e

sementes de Girassol, mostrou aumento na motilidade e porcentagem de espermatozóides reativos ao HO do sêmen após descongelção (ADEEL et al, 2009).

Em condições normais, quando são suplementadas quantidades de PUFA, a biohidrogenação ruminal faz com que baixas concentrações cheguem até o duodeno para serem absorvidos (NRC, 2001). Por este motivo, processos para proteção dos PUFA da ação dos microorganismos ruminais resultam em maiores quantidades alcançando o intestino. Desta maneira, são absorvidos podendo ser aproveitados pelo organismo do animal em inúmeras funções como a participação de processos que afetam a reprodução.

Os sabões cálcicos são obtidos a partir de ácidos graxos de cadeia longa que reagem com sais de cálcio formando um sal, este produto é estável nas condições do ambiente ruminal e vai ser dissociado só em ambientes de pH ácido no abomaso. Os ácidos graxos e íons de cálcio são liberados ao intestino, para logo serem absorvidos pelo organismo (PÉREZ, 2005). Após sua absorção, são metabolizados pelo organismo e transferidos eficientemente às membranas dos espermatozóides (BRIAN et al, 2003), podendo assim, melhorar as características dos espermatozóides contribuindo na eficiência reprodutiva do macho bovino.

3. ARTIGO.

3.1 SUPLEMENTAÇÃO DE TOUROS COM SABÕES CÁLCICOS DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E QUALIDADE SEMINAL PRÉ E PÓS-CONGELAÇÃO.

Mónica Marcela Ramírez Hernández, Juan Camilo Angel Cardona, Diogo del Ré, Maria Inês Mascarenhas Jobim, Rodrigo Costa Mattos, Harold Ospina Patino e Ricardo Macedo Gregory.

RESUMO

A qualidade do sêmen é determinante no desempenho reprodutivo do touro, alternativas nutricionais como a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) para melhorar a qualidade seminal têm sido estudadas nas espécies monogástricas com sucesso. O objetivo deste experimento foi avaliar a qualidade seminal de touros suplementados com sabões cálcicos de PUFA. Vinte touros das raças Angus, Brangus, Hereford e Braford foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, cada um com dez animais. Cada grupo recebeu uma dieta balanceada e suplemento isoenergético de duas fontes energéticas diferentes, (SF) foi suplementado com sabões cálcicos de PUFA e o (SE) recebeu raspa de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). A qualidade seminal foi avaliada utilizando testes rotineiros e complementares durante o período experimental. O grupo suplementado com sabões cálcicos de PUFA comercial (Megalac-E[®]) apresentou diferenças significativas para motilidade espermática (83,3% vs. 75,3%) quando comparado com o grupo suplementado com raspa de mandioca. Houve um aumento da percentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro (94,8% vs. 91,8%) e um aumento do número de espermatozoides vivos (98,0% vs. 96,6%) no grupo suplementado com sabões cálcicos de PUFA. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para volume, concentração espermática e concentração de testosterona em sangue ($p \leq 0.68$). No presente estudo foram encontradas interações significativas entre tratamento e número de coleta para

percentagem de espermatozoides normais ($p = 0.0344$) e percentagem de espermatozoides com teste hipoosmótico (HO) positivo ($p = 0.0168$). O tipo de suplemento usado não afetou a motilidade dos espermatozoides após a descongelação, os testes HO e teste de termoresistência rápido (TTR) não apresentaram diferenças entre os grupos suplementados ($p \leq 0.92$). A suplementação com sabões cálcicos de PUFA aumentou as percentagens de espermatozoides com acrossoma íntegro (48,0% vs. 39,2%) e proporcionou um incremento no número de espermatozoides vivos (51,5% v.s 42,2%).

Palavras chaves: Touros, sabões cálcicos, qualidade seminal, raspa de mandioca.

ABSTRACT

*The quality of the semen is crucial for the reproductive performance of the bull. Studies in monogastric species showed that supplementation with polyunsaturated fatty acids (PUFA) can be used as alternative to improve successfully the seminal quality. This study aimed at the assessment of the seminal quality of bulls supplemented with calcium soaps of PUFA. Twenty Angus, Brangus, Hereford and Braford bulls were distributed randomly into two groups with ten animals each. Every group received a balance diet and isoenergetic food supplemented with two different energy sources: (FS) supplemented with calcium soaps of PUFA; and (ES) fed on cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). The seminal quality was evaluation routinely and the complementary tests were assessed during the experimental period. The (FS) supplemented with calcium soaps of commercial PUFA (Megalac-E[®]) has presented significant differences for sperm motility (83,3% vs. 75,3%), increased the percentages of intact acrosome (94,8% vs. 91,8%) and live sperm (98,0% vs. 96,6%). The sperm volume, sperm concentration and testosterone concentration have not presented differences between the groups during the period ($p \leq 0.68$). Significant interactions between the treatment and the sampling were obtained for the percentage of normal spermatozoa ($p = 0.0344$) and of positive HO ($p = 0.0168$) of fresh semen from supplemented bulls. The type of supplement used did not affect sperm motility after the thawing, the HO test and TTR showed no differences between groups supplemented ($p \leq 0.92$). Supplementation with calcium soaps of PUFA increased the percentage of sperm*

with intact acrosome (48,0% vs. 39,2%) and provided an increase in the number of live sperm (51,5% vs. 42,2%).

Keys Words: Bulls, calcium soaps, semen, cassava meal.

INTRODUÇÃO

Os sistemas produtivos bovinos eficientes se caracterizam por excelentes desempenhos reprodutivos, para atingir este objetivo, faz-se necessário conhecer os fatores que envolvem a fertilidade. A qualidade do sêmen afeta diretamente o desempenho reprodutivo do touro (PETERS e BALL, 2004), pois as características seminais exercem um efeito importante desde o momento que os espermatozóides entram no trato reprodutivo da fêmea até o momento da fecundação (MICELI et al, 2008). Nishikawa (1959) estabeleceu variações na fertilidade a partir das diferentes características seminais. Posteriormente outros autores relacionaram com a concentração espermática, percentual de espermatozóides morfológicamente normais e a motilidade (MOSTARI et al, 2004; SARDER, 2004).

As biotecnologias da reprodução assistida são ferramentas atuais cada vez mais utilizadas nos sistemas de produção de bovinos na busca de eficiência reprodutiva. A inseminação artificial (IA) é a técnica mais utilizada no mundo para o melhoramento genético e é a ferramenta mais importante para a reprodução intensiva. No Brasil a comercialização de doses de sêmen nacional tem demonstrado uma evolução de 113% nos últimos 20 anos, sendo que no ano 2008 foram vendidas 8.204.783 doses de sêmen tanto das raças de carne quanto às de leite (ASBIA, 2008). Deste modo, torna-se cada vez mais importante o entendimento dos fatores que podem influenciar nos resultados dos programas de inseminação artificial, entre eles a qualidade do sêmen pós-congelação.

A nutrição influencia de forma direta e indireta a fertilidade nos ruminantes. Para o sucesso da fecundação o espermatozóide precisa de nutrientes específicos para seu desenvolvimento e posterior sobrevivência. Igualmente as concentrações de hormônios e

outros sinais metabólicos (e.x glicose e colesterol) são requeridos pelo organismo para o sucesso dos processos envolvidos na fecundação (ROBINSON et al, 2006).

O nível energético tem sido um dos componentes mais abordados nos estudos da influência da nutrição sobre a produção e qualidade seminal, sendo mais importante nos animais em desenvolvimento destinados a serem futuros reprodutores (BARTH et al, 2008.). Atualmente os estudos da influência da nutrição sobre a fertilidade bovina se têm focado nas estratégias nutricionais para aumentar a qualidade dos espermatozóides nos machos e resposta a programas de sincronização de estros, assim como, a qualidade do embrião nas fêmeas (ABAYASEKARA e WHATES, 1999).

Estudos recentes demonstram que a suplementação com ácidos graxos nos machos objetiva em especial utilizar os benefícios que eles possuem como alimento funcional (COLLA e MORAES, 2006), melhorando a qualidade seminal e incrementando os precursores de hormônios necessários para os processos reprodutivos (McVEY M.J. et al, 2007; ARLAS et al, 2008). Em touros os ácidos graxos poli-insaturados são importantes para a integridade e viabilidade da membrana espermática, além disso, Kelso et al. (1997) encontraram uma diminuição das concentrações de ácidos graxos poli-insaturados no plasma seminal com o envelhecimento dos indivíduos. Desta maneira faz-se muito importante avaliar os possíveis benefícios da suplementação com PUFA sobre a qualidade seminal em touros.

O objetivo do presente estudo foi suplementar touros com sabões cálcicos de PUFA (Megalac-E[®]) e avaliar as características do sêmen determinando o seu efeito sobre a qualidade seminal pré e pós-congelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e duração do experimento

O experimento foi realizado na central de processamento e congelamento de sêmen PROGEN[®], localizada a 3,5 km. do município de Dom Pedrito na região da campanha do Rio Grande do Sul, Brasil. O período experimental começou no dia 15 de Outubro do 2008 com a pesagem dos animais, avaliação andrológica e início da suplementação, e foi concluído no dia 30 de Dezembro do 2008. Foram realizadas cinco coletas de sêmen a cada quinze dias para avaliar qualidade do sêmen fresco. O sêmen foi congelado e posteriormente avaliado. Também foram realizadas duas coletas de sangue para medir concentração de testosterona. As avaliações pós-descongelamento foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) do Departamento de Medicina Animal da UFRGS.

Tratamentos

Os tratamentos consistiram na avaliação de dois tipos de suplementos energéticos fornecidos para animais alimentados individualmente com pastagens cortadas dependendo da época do ano (pastagem de aveia ou campo nativo), ração comercial e sal mineral. A formulação dos alimentos realizou-se para que as dietas fossem isoenergéticas, a composição da dieta é apresentada na (tabela 1.). Os tratamentos avaliados foram os seguintes:

SF: 200 g/d de sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados (Megalac-E[®]).

SE: 745 g/d de raspa de Mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz).

Tabela 1. Composição bromatológica e componentes dos ingredientes utilizados na formulação das dietas.

	Pastagem	Ração	Megalac-E [®]	Mandioca
MS %	36,5	80,9	95,6	87,3
PB %	8,0	17,6	0,4	3,3
EE %	3,1	4,3	44,2	0,5
FDA %	27,8	15,0	-	4,0
FDN %	54,0	15,1	-	11,1
LIG %	6,7	4,7	-	1,6
Ácido Linoléico %			41	
Ácido Linolênico %			2,8	
E.M (Mcal/kg)			9,27	2,63
E.M Consumo (Mcal)			1,77	1,71

Fontes: Laboratório Nutrição Animal UFRG, Empresa Arm & Harmmer Megalac-E[®].

Na tabela 2 é apresentada a composição da dieta de cada grupo durante o período de suplementação.

Tabela 2. Componentes em percentagem de peso vivo (% PV)

	Suplemento Funcional	Suplemento Energético
Megalac-E [®] (%PV)	0.02	-
Raspa de Mandioca (%PV)	-	0.07
Ração Comercial (%PV)	0.2	0.2
Pastagem (%PV)	2.5	2.5
Sal Mineral (%PV)	0.01	0.01

Área experimental

Os animais estiveram alocados em vinte piquetes individuais de um hectare cada, divididos com cerca elétrica com cochos e bebedouros individuais. As coletas de sêmen foram realizadas no centro de manejo do laboratório de processamento e congelação.

Unidades experimentais

Foram utilizados vinte touros das raças Angus, Brangus, Hereford e Braford, com um peso médio de 950 Kg. e idades entre 4 e 10 anos. Cada animal foi considerado uma unidade experimental e designado aleatoriamente a cada um dos tratamentos. Foi efetuada uma aleatorização estratificada para que existissem animais de diferentes raças e idades similares dentro dos tratamentos.

Condução do experimento

Quando do começo do período experimental foi realizada avaliação andrológica e pesagem de cada touro. Os animais foram suplementados individualmente e realizadas cinco coletas de sêmen com intervalo aproximado de 15 dias. A primeira coleta foi determinada como período de adaptação. A qualidade seminal foi acompanhada por meio das avaliações rotineiras (volume, concentração, motilidade, vigor e porcentagem de anormalidades) e testes complementares (coloração dupla Tripan azul/Giemsa e Teste Hiposmótico). Para congelação as amostras de sêmen foram diluídas em citrato-gema com 4% de glicerol, embaladas em palhetas de 0,5 ml com uma concentração de 40×10^6 espermatozóides totais por dose, identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C para posteriores avaliações pós-descongelação. Também foram tomadas e conservadas congeladas duas amostras de soro para determinação da concentração de testosterona sérica. As amostras de sangue para análise de concentração de testosterona coletaram-se por meio de Vacutainer[®] e punção da veia coccígea em tubos sem anticoagulante para separação do soro. A concentração de testosterona em ng/mL foi medida por meio de radioimunoensaio que mede o esteróide na sua forma inconjugada (CHEN e BOOKSTEIN, 1991).

Para determinação da qualidade das pastagens fornecidas, foram coletadas amostras aproximadamente cada 20 dias.

As partidas de sêmen foram descongeladas e avaliadas para determinar a sua qualidade pós-congelação. Foram avaliados os quesitos como: motilidade progressiva retilínea, integridade do acrossoma e diferenciação de espermatozóides vivos e mortos por meio de uma coloração dupla (Tripan azul e Giemsa), integridade de membrana da cauda por meio do teste hipoosmótico (HO) e longevidade dos espermatozóides pelo teste de termorresistência rápido (TTR/R).

Análise Estatística

O modelo matemático usado foi:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + tk + (\tau * t)_{ik} + \varepsilon'_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, b; k = 1, \dots, n$$

a = número de tratamentos; b = número de animais; n = número de coletas.

onde:

y_{ijk} = observação ijk

μ = média geral

τ_i = efeito do tratamento i

tk = efeito da coleta k

$(\tau * t)_{ik}$ = efeito da interação entre tratamento i e coleta k

ε'_{ijk} = efeito do erro cuja estrutura contém a variância entre os animais dentro do tratamento e, também, a variância entre as medidas repetidas, dentro dos animais.

Utilizou-se a análise de variância com medidas repetidas no tempo para dois tratamentos e quatro coletas. Em algumas variáveis utilizou-se quando significativa a primeira coleta como co-variável (concentração espermática e HO pré e pós-congelação) no

caso onde foi necessário foram transformadas as variáveis em arco seno (motilidade espermática, percentagem de acrossomas íntegros e motilidade dos espermatozóides submetidos ao TTR/R aos 30 e 60 minutos), o software utilizado foi o SAS e as medias diferenciadas pelo teste-t. a estrutura da matriz de covariância que resulta em melhor ajuste do modelo foi escolhida com base nos menores valores para o Critério de Informação de Akaike (AIC) e Critério de Informação Bayesiano Swarz (BIC).

RESULTADOS

Motilidade espermática, percentagens de acrossoma íntegro e espermatozóides vivos

O sêmen dos touros alimentados com dietas contendo suplemento funcional teve um incremento da motilidade de 11% ($p=0.0443$), de 3% na percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro e de 1.5% nos espermatozóides vivos ($p \leq 0.05$), quando comparado com o sêmen de touros recebendo suplemento energético.

Tabela 3. Motilidade espermática, percentagens de acrossomas íntegros e de espermatozóides vivos dos touros alimentados com dietas contendo suplementos funcional e energético.

Pârametros (%)	Suplemento Funcional	Suplemento Energético	<i>p</i> -value
Motilidade Espermática ²	83.37 (1.16) ^a	75.37 (2.33) ^b	$p = 0.0443$
Acrossomas Íntegros ²	94.86 (0.35) ^a	91.86 (0.56) ^b	$p = 0.0001$
Espermatozóides vivos	98.05 (0.25) ^a	96.63 (0.32) ^b	$p = 0.0013$

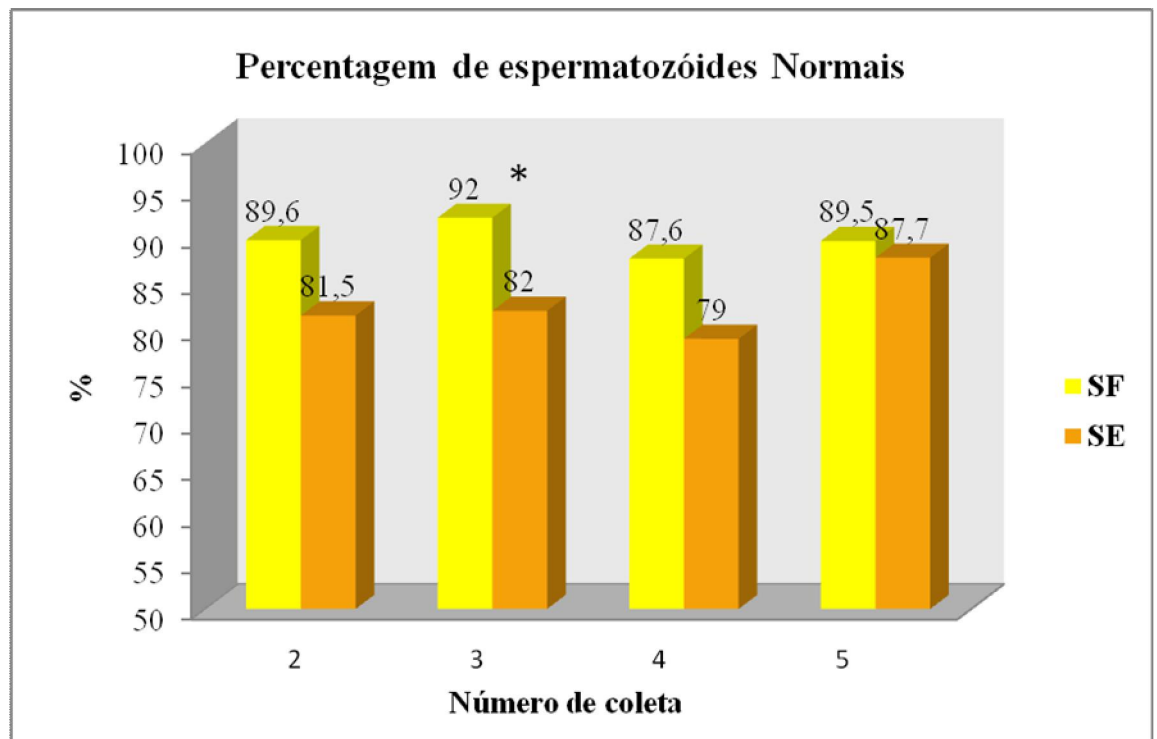
^{a,b} Diferenças significativas entre os tratamentos.

⁽²⁾ Variáveis transformadas em arco seno.

Percentagens de espermatozóides normais e percentagens de espermatozóides que reagiram positivamente ao HO (teste hipoosmótico)

Foram encontradas interações significativas entre tratamento e número de coleta para percentagens de espermatozóides normais ($p = 0.0344$) e HO positivos ($p = 0.0168$), os valores são apresentados nos gráficos 1 e 2.

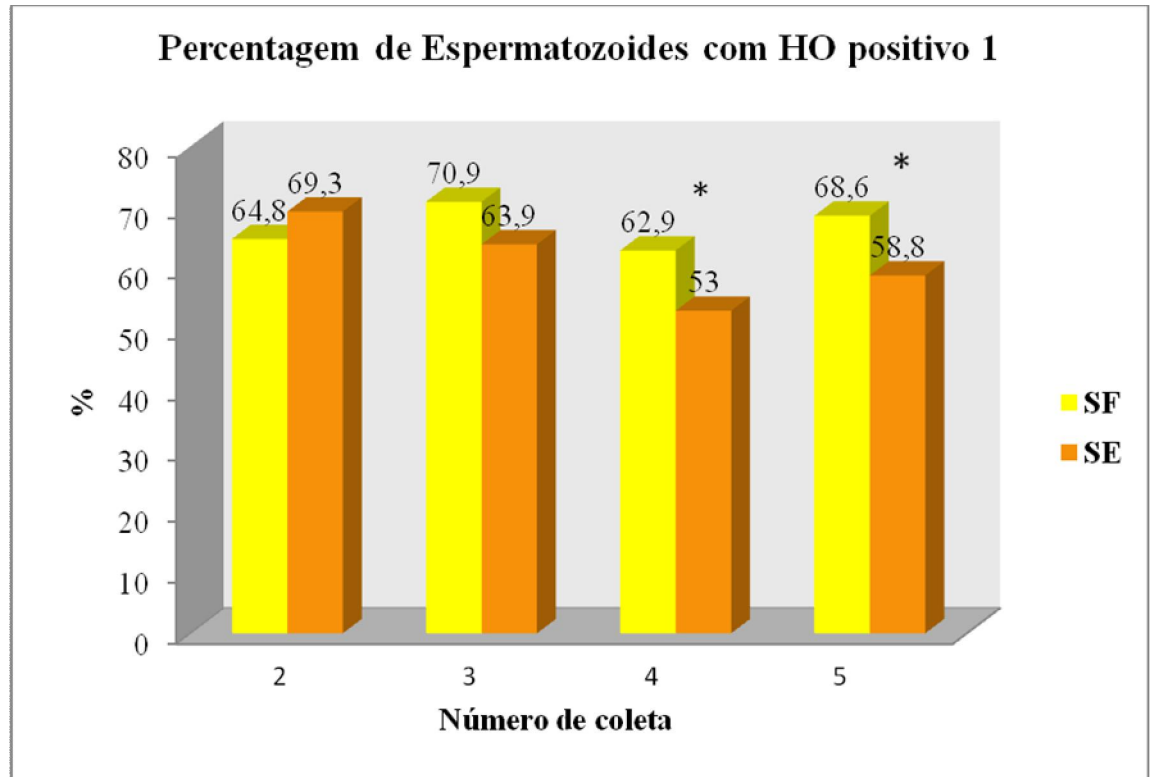
Gráfico 1. Interações entre tratamento e coleta encontradas para percentagem de espermatozóides normais dos touros durante o período de suplementação.



SF: Suplemento Funcional; **SE:** Suplemento Energético.

(*) Símbolo em cima das barras indica diferença significativa ($p \leq 0.001$) teste-t.

Gráfico 2. Interação entre tratamento e coleta para percentagem de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico.



SF: Suplemento Funcional; **SE:** Suplemento Energético.

⁽¹⁾ Uso da covariável.

^(*) Símbolo em cima das barras indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) teste-t.

Os resultados quanto ao volume seminal (6,8 mL vs 6,4mL), concentração espermática (997.5 sptz/mL vs. 1,064 sptz/mL) e concentração de testosterona no sangue (4.11 ng/mL vs. 4.73 ng/mL) não apresentaram diferença significativa entre os touros durante o período de suplementação ($p \leq 0.68$).

Na tabela 4 são apresentados os resultados de motilidade espermática pós-descongelamento e testes complementares TTR/R e HO, não foi encontrada diferença significativa para estes parâmetros entre os tratamentos durante o período de suplementação. Durante o experimento os valores de espermatozoides que apresentaram acrossoma íntegro foram superiores no grupo suplementado com sabões cálcicos, O mesmo

foi verificado para percentagem de espermatozoides vivos, quando comparado com o grupo recebendo suplemento energético.

Tabela 4. Percentagens de motilidade pós-congelação, motilidade aos 30 minutos (TTR), motilidade aos 60 minutos (TTR) e percentagens de HO positivo. Valores em media (erro standard).

Parâmetro (%)	Suplemento Funcional	Suplemento Energético	p-value
Motilidade	37,5 (1,7)	30,5 (1,8)	p = 0.1027
TTR 30min. ^{1,2}	29,7 (2,0)	25,8 (1,9)	p = 0.3255
TTR 60min. ^{1,2}	20,6 (2,0)	20,2 (2,0)	p = 0.9221
HO ¹	56,1 (1,9)	51,3 (1,8)	p = 0.1819
Acrossomas Normais	48,0 (1,8) ^a	39,2(1,8) ^b	p = 0, 0034
Espermatozoides Vivos	51,5 (2,0) ^a	42,2 (2,0) ^b	p = 0, 0056

^{a,b} Letras diferentes nas linhas apresentam diferença estatística.

⁽¹⁾ Primeira coleta como covariável.

⁽²⁾ Variável transformada em arco seno.

DISCUSSÃO

A suplementação de touros com dietas contendo suplemento funcional de sabões de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados melhoraram a motilidade em oito pontos percentuais, incrementaram o número de espermatozoides com acrossoma íntegro (94,8%

vs. 91,8%) e apresentaram maior número de espermatozóides vivos (98,0% vs. 96,6%).

A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados têm mostrado efeitos positivos sobre a capacidade reprodutiva de machos adultos. A manipulação da dieta contendo PUFA muda a composição dos componentes dos espermatozóides de varias espécies domésticas (PENNY et al, 2000; BLESBOIS et al, 2004), melhorando as características físicas e metabólicas das membranas espermáticas, plasmática e acrossomal (PETER et al, 2001). Dessa forma pode se conferir homogeneidade aos espermatozóides e incrementar a possibilidade de que maior número cheguem ao istmo útero-tubárico aumentando a probabilidade de fecundação (SAACKE, 2009).

Vários estudos demonstram uma redução na motilidade e número de espermatozóides do ejaculado de touros com deficiências de ácido docoxahesanoico (DHA) na proporção dos fosfolípidios do espermatozóide (KELSO et al, 1997). No presente estudo não houve análises do perfil de PUFA nas membranas espermáticas, contudo pode se supor uma possível transferência dos PUFA dos sabões cálcicos contidos na dieta às membranas dos espermatozóides, mudando e melhorando suas características.

Dietas altas em energia têm um efeito deletério sobre a qualidade seminal, esta resposta pode ser devida ao acúmulo excessivo de gordura no escroto prejudicando termoregulação (COULTER, 2002). Neste estudo as dietas foram isoenergéticas, indicando que o efeito na qualidade espermática é devido ao potencial funcional da suplementação com PUFA e não ao conteúdo calórico das dietas. Não entanto no período quente do ano o suplemento não teve o mesmo efeito, possivelmente pela deficiente termoregulação das raças taurinas quando submetidas a temperaturas fora da zona de conforto térmico (VALLE et al, 2005)

No presente trabalho foram encontradas interações significativas entre tratamentos e número de coleta para percentagem de espermatozóides normais ($p = 0.0034$) e percentagem de H.O positivo ($p = 0.0168$)

Para percentagem de espermatozóides normais o grupo recebendo suplemento funcional teve número maior de espermatozóides normais durante todo o período de

suplementação. A terceira coleta apresentou diferença significativa e houve uma baixa na porcentagem de espermatozóides normais na quarta coleta e na quinta coleta os valores subiram. A baixa do parâmetro na coleta quatro foi devida possivelmente ao efeito do aumento da temperatura no mês de Dezembro (GUATAMBU, 2008). Na coleta cinco houve provavelmente uma resposta compensatória ao estresse térmico aumentando o número de espermatozóides normais. Estudos com raças taurinas e zebuínas demonstraram correlações entre temperatura máxima e mínima com características de qualidade seminal, sugerindo que aumentos de temperatura têm efeito sobre a espermatogênese afetando a qualidade do sêmen (DUARTE, 2005). Tanto parâmetros fisiológicos como características seminais especialmente a concentração apresentaram um aumento como resposta compensatória perante um estresse térmico sofrido pelo organismo do animal (VALLE et al, 2005).

A porcentagem de espermatozóides que apresentaram H.O positivo apresentou diferença significativa nas coletas quatro e cinco. Talvez o tempo desde o começo do período experimental até a terceira coleta não foi suficiente para mostrar os efeitos do tratamento sobre este parâmetro, se observando uma mudança depois de percorridos trinta dias de suplementação, mostrando que tempo do efeito da suplementação sobre a estabilização dos componentes da membrana espermática foi superior. Uma pesquisa recente com búfalos suplementados com óleo ou sementes de girassol e grupo controle, não obteve diferença no número de espermatozóides com reação H.O positiva para o sêmen fresco, no entanto o H.O de sêmen pós-congelação foi superior ($p < 0,05$) para os animais suplementados com dietas contendo girassol (ADEEL et al, 2009). Estudos com fêmeas encontraram que animais suplementados com fontes de PUFA apresentam embriões com maior número de blastômeros comparados com embriões de fêmeas suplementadas com fontes de ácidos graxos saturados (THANGAVELU et al, 2007). De acordo com estes estudos e os resultados do presente, pode se presumir uma transferência efetiva dos PUFA da dieta às membranas celulares, além de conferir melhores características e resistência a processos de estresse tanto físicos quanto metabólicos.

Neste estudo o volume ($p \leq 0,59$), concentração de espermatozóides ($p \leq 0,51$) e concentrações de testosterona no soro ($p \leq 0,68$), não apresentou diferença significativa

entre os tratamentos. Adeel et al, (2008) suplementando búfalos com fontes de PUFA não encontrou diferença significativa entre os grupos para volume e concentração de espermatozóides. Em um trabalho com garanhões suplementados com óleo de arroz, Arlas et al, (2008) verificaram diferenças quanto à concentração de espermatozóides. A concentração de testosterona no soro não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

As percentagens para motilidade pós-descongelação (37.5% vs. 30.5%) e testes complementares HO positivo e TTR/R (56.1% vs. 51,3% e 25,1% vs. 23.0%) apresentadas pelos dois grupos, mantiveram-se dentro de padrões aceitáveis na avaliação da qualidade de sêmen após descongelação segundo Henry e Neves (1998).

As percentagens de motilidade espermática após o TTR/R não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0.92$), o mesmo foi verificado quanto ao número de espermatozóides com teste HO positivo ($p \leq 0.18$). Embora neste estudo não fossem observadas diferenças entre os grupos suplementados com diferentes fontes energéticas, os resultados apresentam valores dentro da normalidade, para os atributos avaliados (HENRY e NEVES, 1998).

A percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro e o número de espermatozóides vivos durante o período de suplementação foi estatisticamente superior em 22% para o grupo suplementado com sabões de cálcio de PUFA, quando comparado com o grupo recebendo suplemento energético (48% vs. 39,2% e 51,5% vs. 42,2%). Durante a criopreservação são induzidas as maiores mudanças na morfologia da membrana do espermatozóide. Pettitt e Buhr (1998) reportaram modificações dos fosfolípidios do espermatozóide durante a criopreservação e posterior aquecimento, com o maior dano sofrido pela membrana plasmática da cabeça. Posteriormente Cerolini et al. (2001) acharam um decréscimo dos fosfolípidios de espermatozóides submetidos a processos de congelação e descongelação. No presente trabalho o sêmen de touros suplementados com sabões cálcicos de PUFA apresentaram maior número de espermatozóides vivos com melhores características morfológicas do acrossoma dos espermatozóides após descongelação.

CONCLUSÃO

A suplementação de touros com sabões cálcicos de PUFA (Megalac- E[®]) melhorou a motilidade espermática do sêmen fresco, incremento as percentagens de espermatozóides com acrossoma íntegro e as percentagens de espermatozóides vivos no sêmen pré e pós-congelação. Melhorando a qualidade seminal aumentando a probabilidade da fecundação e incrementando a resistência dos espermatozóides a processos de criopreservação.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A suplementação de touros doadores de sêmen com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados aumentou a motilidade espermática do sêmen fresco e melhorou as características morfológicas dos espermatozoides, favorecendo a resistência física e metabólica das membranas espermáticas aos processos de estresse, como a criopreservação e posterior aquecimento. Estudos que permitam conhecer uma efetiva transferência dos ácidos graxos poli-insaturados da dieta às membranas espermáticas convertem-se em um ponto importante para afirmar esta hipótese.

O conhecimento dos componentes das membranas dos espermatozoides e dos acontecimentos ocorridos após coleta, pode ajudar no entendimento da variabilidade nos resultados das taxas de prenhez a campo. Igualmente, pesquisas futuras devem ser conduzidas com o objetivo de avaliar as taxas de prenhez de vacas inseminadas com sêmen de touros suplementados com sabões de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados. Com isto, viabilizar a utilização regular de este tipo de suplemento nas centrais de coleta e processamento de sêmen.

Por outro lado, torna-se necessário avaliar o efeito do suplemento durante as épocas quentes do ano, podendo haver influência maior pelo desconforto térmico dos animais que o efeito próprio dos sabões cálcicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAYASEKARA, D.R.E.; WHATES, D.C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Royal Veterinary College, London, v. 61, n. 5, p. 275-288, 1999.

ADEEL, M. et al. Improved of liquid and frozed-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*bubalus bubalis*) throuhg supplementation of fat. **Theriogenology**, Lahore, Pakistan, v.71, n. 8, p. 1220-1225, 2009.

ARLAS, T.R. et al. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, v. 107, n. 3, Abstracts, p. 306, 2008.

ARRUDA, R.P. et al. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rapida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, Brasil, v. 29, n. 1, p. 131-137, 1998.

ASBIA, ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/?mercado/index>>, Acesso em 10 de Janeiro de 2010, 2008.

BACH, A. La Reproducción del vacuno lechero: nutrición y fisiología. Em: **Curso de Especialización del FEDNA 12**. Madrid, 2003.

BAILEY, JANICE L; JEAN-FRANÇOIS BILODEAU and NATHALY CORMIER. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal Andrology**, Université Laval, Québec, Canada, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BARTH, A.D; BRITO, L.F; KASTELIC J.P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, v.70, n. 3, p. 485-494, 2008.

BAYLEY, J.L; ROBERTSON, L; BUHR, M.M. Relations among in vivo fertility, computer-analysed motility and Ca ++ influx in bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 74, n. 1, p. 53-58, 1994.

BLESBOIS, E. et al. Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. **Theriogenology**, France, v. 61, n. 2-3, p. 537-549, 2004.

- BORETTO, J.M. et al. Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bariloche, Argentina, v. 83, p. 185-188, 2000.
- BRIAN, J. WONSIL; JOSEPH, H. HERBEIN and BRUCE A. WATKINS. Dietary and Ruminally Derived trans-18:1 Fatty Acids Alter Bovine Milk Lipids. **The Journal of Nutrition**, Purdue University, West Lafayette, v. 124, n. 4, p. 556, 1992.
- BRIAN, S.K; SURAI, P.F; ROOKE, J.A. Regulation of Avian and Mammalian Sperm Production by Dietary Fatty Acids. In: Stephanie R.V. **Male Fertility and Lipid Metabolism**. United States: AOCS Press, p. 96-117, 2003.
- BRITO, LEONARDO F.C. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada, v.60, n.8, p. 1539-1551, 2003.
- CAIZA DE LA CUEVA F.I. et al. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 3, p. 765-784, 1997.
- CAMMACK, K. M. et al. Review: Reproductive Traits and Their Heritabilities in Beef Cattle. **Professional Animal Scientist**, v. 25, n. 5, p. 517-528, 2009.
- CEROLINI, S. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, Chambridge, v. 121, n. 3, p. 395-401, 2001.
- CHEN, A; BOOKSTEIN J.J. Meldrum: Diagnosis of a testosterone-secreting adrenal adenoma by selective venous catheterization. **Fertility and Esterility**, Redondo Beach, California, v. 55, n. 6, p. 1202-1203, 1991.
- COLLA, L.M.; MORAES F.P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação e benefícios à Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- CORMIER, N; SIRARD, M. A. and BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, Université Laval, Quebec, Canada, v. 18, n. 4, p. 461-468, 1997.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, Lexington, USA, v. 48, n. 5, p. 721-731, 1997.
- COULTER, H.G. **Beef herd management: binder and study guide**. Ontario: **University the Guelph**, 2002, p. 422-444.

- DA SILVA, A.F. et al. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação do sêmen caprino. Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, Brasil, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.
- DIDION, B. A. et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, University of Illinois, Urbana, v. 22, n. 1, p. 51-57, 1989.
- DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'application de la valeur fecondante du sperme congelée. **Annales de Médecine Vétérinaire**, Bruxelles, v. 4, p. 215-224, 1967.
- DUARTE, A. M. et al. Associação entre temperatura ambiente e características do sêmen de touros nerole, gyr e holandes criados a campo. **Journal the Biociencia**, Uberlândia, Brasil, v. 21, n.1, p. 175-182, 2005.
- GADELLA, B.M. et al. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: Elimination of labeling artifacts. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, n. 1, p. 108-125, 1999.
- GRAAF, DE S.P, et al. Influence of supplementing diet with Oleic and Linoleic acid on the freezing ability and sex-sorting parameters of ram semen. **Livestock Science**, The University of Sydney, Australia, v. 110, n .1, p. 166-173, 2007.
- GRAHAM E.F.; SCHMELHI M.K.L.; NELSON D.S. Problems with laboratory assays. **PROCEEDINGS OF THE 8TH TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION**, 1980, Wisconsin, **National Association of Animal Breeders**, v.1, p. 59-66.
- GRAHAM J.K; MOCÉ E. Fertility evaluation of frozed/thawed semen. **Theriogenology**, Fort Collins, USA, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, Colorado State University, Ford Collins, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.
- GRAVANCE, C.G. et al. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, University of Auckland, New Zealand, v. 19, n. 6, p. 704-709, 1998.

GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; MAGDALENA, PRZEPIÓRKA.; KATARZYNA ROMANOWICZ. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. **Reproductive Biology**, Krakow, v. 2, n. 3, p. 277-293, 2002.

GROMADZKA-OSTROWSKA, J. Effects of dietary fat on androgen secretion and metabolism. **Biology of Reproduction**, Warsaw, v. 6, n. 2, p. 13-20, 2006.

GUATAMBU ESTÂNCIA. **Dados climáticos Dom Pedrito Real-Time**. Disponível em: <<http://www.estanciaguatambu.com.br/php/tempo.php>> Acesso em 25 de Janeiro de 2009, 2008.

HAMMERSTEDT, R.H; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, University Park, Pennsylvania, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HARRISON, R. Capacitation mechanisms and role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 581-594, 1996.

HENRY M., e. NEVES. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2^o Edição, Belo Horizonte, Colegio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.

HORROBIN, D.F. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. **American Journal of Clinical Nutrition**, Nova Scotia, Canada, v. 57, n. 5, p. 732S-736S, 1993.

JANUSKAUSKAS, A.; JHOANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, Stonelham, v. 55, n. 4, p. 947-961, 2001.

JENKINS, T.C. Lipid Metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Clemson, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JEYENDRAN, R. et al. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal the Reproduction and Fertility**, Minnessota, USA, v. 70, n. 1, p. 2119-228, 1984.

KAN, YAN LIN.; FREDERICK, W.K. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. **Biology and Reproduction**, Ontario, Canada, v. 55, n. 5, p. 1133-1146, 1996.

KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Calgary, Canada, v. 43, n. 2, p. 368-373, 2008.

KELSO, K. A. et al. Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, Milano, Italy, v. 110, n. 1, p. 53-59, 1997.

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

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN, B. K. Evaluation of the spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Hamar, Norway, v. 34, n. 3, p. 299-303, 1993.

KUSTER, C.E.; SINGER, R.S.; ALTHOUSE, G.C. Determining sample size for morphological assessment of sperm. **Theriogenology**, Illinois, USA, v. 61, n. 4, p. 691-703, 2004.

LANGLAIS, JEAN Dr.; KENNETH, D. ROBERTS. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, University of Montreal, Quebec, Canada, v. 12, n. 2, p. 183-224, 1984.

LAPOSATA, M. Fatty acids. Biochemistry to clinical significance. **American Journal of Clinical Pathology**, Harvard Medical School, Boston, USA, v. 104, n. 2, p. 172-179, 1995.

MATTOS, RICARDO.; STAPLES, R. C.; THATCHER, W. W. Effects of Dietary Fatty Acids on Reproduction in Ruminants. **Reproduction the Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, University of Florida, Gainesville, v. 5, p. 38-45, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, University of Sydney, Sydney, v. 38, n. 1, p. 1-36, 1995.

Mc DONALD, P. et al. **Animal nutrition**. Pearson, Prentice Hall, 2002.

McVEY, M.J. et al. Effects of dietary fats and proteins on rat testicular steroidogenic enzymes and serum testosterone levels. **Food and Chemical Toxicology**, Canada. v. 46, n. 1, p. 259-269, 2007.

MEIKLE, A. W. et al. Nonesterified fatty acids modulate steroidogenesis in mouse Leydig cells. **Endocrinology and Metabolism**, Utha, v. 257, n. 6, p. E937-E942, 1989.

- MICELI, et al. Interacción Funcional entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra. In: Palma G.A, **Biotechnología de la reproducción 2º Edición**. Mar del Plata: Pugliese y Siena, p 93-134, 2008.
- MOSS, G.E.; DUNN T.G. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, University of Wyoming, Laramie, v. 70, n. 5, p. 1580-1593, 1992.
- MOSTARI, M.P. et al. Evaluation of Bulls Based on Semen Quality and Herd Fertility. **Pakistan Journal of Biology Sciences**, Bangladesh, v. 7, n. 12, p. 2177-2181, 2004.
- MUHAMMAD ANZAR. et al. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biology of Reproduction**, Canada, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.
- NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses**. Kyoto, Racing Association, 1959.
- NOILES, E.E.; KATHLEEN A. T.; BAYARD, T. S. Water Permeability, Lp, of the Mouse Sperm Plasma Membrane and Its Activation Energy Are Strongly Dependent on Interaction of the Plasma Membrane with the Sperm Cytoskeleton. **Cryobiology**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 79-92, 1997.
- NOLAN, JHON P. et al. Flow Cytometric Analysis of Transmembrane Phospholipid Movement in Bull Sperm. **Biochemistry**, University Park, Pennsylvania, v. 34, n. 12, p. 3907-3915, 1995.
- NORTH, R.D.; HOLT, W.V. Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Intitute the Zoology, London, v. 51, n. 3, p. 414-424, 1994.
- NRC. **Nutrient Requeriments of Dairy Cattle**. Washington D.C.: National Academy Press, 2001.
- PALMQUIST, D.L. Influence of Source and Amount of Dietary Fat on Digestibility in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, The Ohio State University, Wooster, v. 74, n. 4, p. 1354-1360, 1991.
- PALMQUIST, D.L. UTILIZACION DE LIPIDOS EN DIETAS DE RUMIANTES. **XII Curso de Especialización FEDNA**. Madrid 7 y 8 de Noviembre, p. 1-17, 1996.
- PARKS, J.E.; GRAHMA, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Cornell University Ithaca, New York USA, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, Cornell University, New York, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PEÑA, F.J. et al. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of andrology**, Spain, v. 28, n. 2, p. 107-114, 2005.

PEÑA-MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, Spain, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

PENNY, P.C. et al. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Ping News and Information**, Farnham Royal, v. 21, p. 119-126, 2000.

PÉREZ, L.J. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, Buenos Aires, Argentina, v. 46, n. 1, p. 131-140, 1996.

PÉREZ, E.P. Method of producing calcium, sodium or magnesium soaps from fatty acids or oleins from animal or vegetable fats and use thereof as nutrients in monogastric animal feed. Patente N° US20090220638A1. Madrid, España, 2005.

PETER, SURAI.; RAYMOND, C.N. Male fertility with antioxidants and/or polyunsaturated fatty acids. Patente N° 6235783. United States, 2001.

PETERS, A.R., BALL, P.J.H. **Bull Fertility**. Reproduction in Cattle. 3° Edition. Blackwell Publishing, p. 28-39, 2004.

PETTITT, M.J.; BUHR, M.M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. **Journal of Andrology**, Ontario, Canada, v. 19, n. 6, p. 736-746, 1998.

POULOS, A. et al. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. **Biochemical Journal**, University Sydney, Australia, v. 240, n. 3, p. 895-891, 1986.

ROBINSON, J.J. et al. Nutrition and Fertility in ruminant Livestock. **Animal Feed Science and Technology**, Aberdeen, UK, v. 126, n. 3, p. 259-276, 2006.

ROCHE, H.M. Unsaturated fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, Republic of Ireland, v. 58, n. 2, p. 397-401, 1999.

RODRÍGUEZ-GILA, J.E.; MONTSERRATA, A; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, University of Barcelona, Spain, v.42, n. 5, p. 815-829, 1994.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment?. Swedish University of Agricultural Sciences. **Reproduction in Domestic Animals**, Uppsala Sweden, v. 41 (Suppl.2), p. 2-10, 2006.

ROTA, A. et al. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, University of Padua, Italy, v. 53, n. 7, p. 1415-1420, 2000.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. **Theriogenology**, University of Agriculture Sciences Uppsala, Sweden, v. 44, n. 6, p. 885-900, 1995.

RUBENS PAES DE ARRUDA, et al. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. **BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS (2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA)**. p. 157-164, 2008, Pirassununga-SP, Brasil.

SAACKE, R.G. Fertility in the bovine male: current status and future prospects (an opinion). **IN: PROCEEDINGS OF THE 18TH TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION**. p. 18-28, 2000, Wisconsin.

SAACKE, R.G. Relevancia de características del semen compensables y no compensables en la fertilidad y la calidad embrionaria en los bovinos. **VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal IRAC**, 2009, Cordoba, Buenos Aires.

SARDER, M.J.U. Morphological sperm abnormalities of different breeds of AI bull and its impact on conception rate of cows in AI programme. **Blangladesh Journal of Veterinary Medicine**, Rajshahi, Blangladesh, v. 2, n. 2, p. 129-135, 2004.

SEBOKOVA, ELENA. et al. Alteration of the Lipid Composition of Rat Testicular Plasma Membranes by Dietary (n-3) Fatty Acids Changes the Responsiveness of Leydig Cells and Testosterone Synthesis. **The Journal of Nutrition**, University of Alberta, Canada, v. 120, n. 6, p. 610, 1990.

SQUIRES, E.L. The role of omega-3 and omega-6 fatty acid in regulation of reproductive function in horses. **Role of Lipids and Fatty Acids in Regulation of Reproductive Function. Journal Animal Science**, Fort Collins, v. 85, Suppl. 1, p. 400, 2007.

STALHAMMAR, E.M. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 34, n. 1, p. 37-45, 1994.

STAPLES, CHARLES. et al. Feeding Fatty Acids for Fertility?. **Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**, p 71-85, 2002, University of Florida Gainesville.

- STEVERMER, E. J. et al. Effect of Feed Intake on Semen Characteristics and Reproductive Performance of Mature Boars. **Journal of animal Science**, University of Wisconsin, Madison, v. 20, p. 858-865, 1961.
- STILLWELL, W.; STEPHEN, R. W. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, Indianapolis, USA, v. 126, n. 1, p. 1-27, 2003.
- TARTAGLIONE, C.M., RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. University of Lomas de Zamora, **Theriogenology**, Buenos Aires, Argentina, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.
- THANGAVELU, G. et al. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, Alberta, Canada, v. 68, n. 7, p. 949-957, 2007.
- VALLE A, FUENTES A. Y PUERTA M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, Maracay, Venezuela, v. 22, n. 1, p. 52-61, 2005.
- VICKERS.; HARRISON, R.A.P.; SALLY, E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity of mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 343-352, 1990.
- VISHWANATH, R.; SHANNON. P. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Animal Reproduction Science**, New Zelanda, v. 39, n. 1, p. 1-10, 1995.
- WATHES, C. D.; ROBERT E. A. D.; ONH AITKEN, R. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. **Biology of Reproduction**, University of NewCastle, Australia, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, London, U.K, v. 7, n. 4, p. 871 – 891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, London, UK, v. 60, n. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WEBB, R. et al. Control follicular growth: Local interactions and nutritional influences. University of Nottingham, **Journal of Animal Science**, Unnited Kingdom, v. 82, p. 63-74, 2004.

WHITE, T.W. et al. Effect of supplementary fat on digestion and the ruminal calcium requirement in sheep. **Journal of Animal Science**, Lexington, v. 17, p. 797-803, 1958.

WU, Z.; OHAJURUKA; PALMQUIST, L. Ruminal synthesis biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Ohio, Wooster, v. 74, p. 2035, 1991.

ZANIBONI, L.; RIZZI R.; CEROLINI S. Combined effect of DHA and alpha-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. **Theriogenology**, University of Milan, Italy, v. 65, n. 9, p. 1813-1827, 2005.

ZANINI, S.F. et al. Evaluation of the ratio of omega6: omega3 fatty acids and vitamin E levels in the diet on the reproductive performance of cockerels. **Archive for Tierernahr**, Federal University of Espirito Santo, Brazil, v. 57, n. 6, p. 429-442, 2003.

ZHANG, B.R. et al. Sperm characteristics and zone pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**, Uppsala, Sweden, v.21, n. 4, p. 201-216, 1998.