

Óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

[Fish oil associated to ascorbic acid in diluter for cryopreservation goat semen]

W.M. Machado, L.P. Barbosa*, R.S. Souza, C.S. França, E.E.G. Pinheiro, M.P. Lents, R.C.S.A. Araújo, A.L.A. Santana

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB - Cruz das Almas, BA

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. Dois machos da raça Boer foram submetidos à coleta de sêmen pelo método de vagina artificial, sendo os ejaculados avaliados quanto aos aspectos físicos e morfológicos. Após avaliação, formou-se um *pool*, seguido do fracionamento em cinco grupos: G1 – diluidor citrato-gema e G2, G3, G4 e G5 – diluidor citrato-gema acrescido de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe e 0,05% de ácido ascórbico, respectivamente. Após descongelamento, foram realizadas avaliações físicas do sêmen e os testes complementares de termorresistência lento (TTR), hiposmótico (HO), integridade acrossomal e compactação da cromatina espermática. Houve comportamento linear crescente ($P < 0,05$) para motilidade pós-descongelamento. Não houve diferença ($P > 0,05$) para vigor pós-descongelamento ($2,00 \pm 0,24$). No TTR não houve diferença ($P > 0,05$) para motilidade e vigor espermáticos entre os tempos cinco e 180min, com médias inicial e final de $62,17 \pm 12,13$ e $14,29 \pm 10,55$ para motilidade e de $2,00 \pm 0,52$ e $0,49 \pm 0,44$ para vigor. Não houve diferença ($P > 0,05$) para o HO, com porcentagem média de espermatozoides reativos de $23,5 \pm 5,96\%$. Houve comportamento linear crescente para acrossoma íntegro e decrescente para acrossoma irregular ($P < 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) na compactação da cromatina, com $97,06 \pm 1,17\%$ de cromatina íntegra. A inclusão até 4% de óleo de peixe acrescido de ácido ascórbico no diluidor 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. Two male Boers underwent semen collection through the artificial vagina method, ejaculates being then assessed for physical and morphological aspects. After evaluation, a pool was formed, followed by the split into five groups: G1 - yolk-citrate extender and G2, G3, G4 and G5 - yolk-citrate extender plus 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0% fish oil and 0.05% ascorbic acid, respectively. After thawing, physical evaluations of semen were assessed and additional testing slow heat resistance (TTR), hyposmotic (HO), acrosome integrity and compression of sperm chromatin. There was linear increase ($P < 0.05$) post-thaw motility. No difference was obtained for post-thaw vigor and there was no influence of the association of fish oil and ascorbic acid in TTR. Plasma membrane integrity, by hyposmotic test (HO), presented a mean of reactive spermatozoa of $23.5 \pm 5.96\%$ ($P > 0.05$). There was linear increase for intact acrosome and decreasing acrosome irregular ($P < 0.05$). In the analysis of the chromatin compaction, approximately 3% of damages ($P > 0.05$) were observed. The inclusion of 4% fish oil plus ascorbic acid in diluter improved motility and acrosome integrity after cryopreservation.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, membranes, viability

Recebido em 16 de novembro de 2016

Aceito em 23 de março de 2017

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: lpires73@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A demanda dos sistemas de produção por animais geneticamente melhorados vem impulsionando o aprimoramento das biotecnologias empregadas à reprodução animal e, entre as biotecnologias, a inseminação artificial é a que mais contribuiu para o avanço do melhoramento genético em curto espaço de tempo, devido ao uso de reprodutores selecionados, o que gerou um número elevado de doses inseminantes e maior número de descendentes nascidos por ano (Simplicio *et al.*, 2005).

O processo de criopreservação seminal apresenta como principal vantagem o aumento no tempo de utilização do ejaculado (Silva e Guerra, 2011). Porém, o processo criogênico leva a uma diminuição na porcentagem de células viáveis e na capacidade fecundante após o descongelamento, como lesão na membrana plasmática e na ultraestrutura celular, o que apresenta entrave para a exploração do sêmen criopreservado (Watson, 2000).

Estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar a resistência das células espermáticas ao processo de criopreservação, entre elas, a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes no diluente seminal, o que pode melhorar a fluidez da membrana e reduzir a ação dos radicais livres sobre as células (Nasiri *et al.*, 2012; Towhidi e Parks, 2012).

Algumas fontes de ácidos graxos poli-insaturados foram testadas como aditivos em meio de congelamento e seus efeitos benéficos para o processo da criopreservação seminal, como ácido linoleico (Takahashi *et al.*, 2012), alfa-linolenico (Kaka *et al.*, 2015), docosahexaenoico (DHA) (Nasiri *et al.*, 2012) e ácido araquidônico (Ejaz *et al.*, 2014). Como o óleo de peixe é rico em DHA e em ácido eicosapentaenoico, torna-se uma alternativa promissora como componente em diluentes seminais (Del Valle *et al.*, 2013).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da inclusão de óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Cruz das Almas – BA, situada a 12° 40' 12" de latitude sul e 39° 06' 07" de longitude oeste de Greenwich, com clima tropical quente e úmido, segundo a classificação de Koppen, com pluviosidade média anual de 1,224mm. A umidade relativa do ar é de aproximadamente 80% e a temperatura média anual, de 24,5°C (Instituto..., 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 3,0. Realizou-se previamente nos animais o exame andrológico, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual..., 2013).

Para manejo dos animais, foi utilizado o sistema semi-intensivo de produção, considerando-se o consumo médio de matéria seca de 3% do peso corporal, com fornecimento de concentrado formulado segundo o NRC (Nutrient..., 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*.

As coletas seminais foram realizadas pelo método de vagina artificial, duas vezes por semana, totalizando 12 coletas. Após avaliação física do sêmen, foi formado um *pool*, com retirada das amostras para patologia e determinação da concentração espermática (Manual..., 2013), e do *pool* foram retiradas alíquotas de 0,5mL para compor os grupos experimentais.

Formaram-se cinco grupos experimentais, sendo: grupo 1 (G1): diluidor citrato-gema (Mies Filho, 1987), acrescido de 0,05% de ácido ascórbico (Synth[®]) (controle); 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[®]), 1% de lauril sulfato de sódio e 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, 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 referente à curva positiva (resfriamento a 0,25°C/min até alcançar +5°C iniciando em 32°C) e a segunda referente à curva negativa, dividida em duas fases: congelamento a partir de +5°C, em uma velocidade de 10°C/min e 5°C/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 ao 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 à base de frutose (100mOsmol/kg), acrescida de 10µL de sêmen e incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C.

A quantificação do HO foi realizada de acordo com a metodologia descrita no CBRA (Manual..., 2013) e o número de espermatozoides reativos ao HO foi calculado pela fórmula: HO% = (% de alterações na região da cauda após o HO) - (% de alterações na região da cauda antes do HO).

Para determinação da integridade acrossomal espermática pós-criopreservação, foi empregada a técnica vermelho congo e violeta genciana a 0,5% (Manual..., 2013). Para a determinação da integridade de cromatina, utilizou-se o protocolo de Beletti *et al.* (2004).

O sêmen foi avaliado pelo TTR nos tempos zero, cinco, 60, 120, 180 minutos quanto aos

parâmetros de motilidade espermática progressiva (0 a 100%) e de vigor espermático (0 a 5), por meio de montagem de lâmina e lamínula, em microscopia de contraste de fase, usando-se a objetiva de 40 vezes (Manual..., 2013).

Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso (DIC). Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), o teste de regressão e a correlação de Pearson, adotando-se 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.

O projeto foi executado de acordo com os regulamentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRB (Protocolo nº 23007.006635/2014-60).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Resultado semelhante também foi encontrado por Ansari *et al.* (2012), com a adição de uma fonte de ácido graxo da série n-3 ao diluidor seminal para caprinos, obtendo-se melhores valores de motilidade espermática pós-descongelamento devido à incorporação do DHA às membranas das células espermáticas, principalmente na região da cauda, o que resultou em uma melhor fluidez e flexibilidade, com melhora na motilidade progressiva. Ceylan e Serin (2007) relataram que a peroxidação dos lipídios da membrana dos espermatozoides é uma das causas para a perda de motilidade e de capacidade fertilizante nos mamíferos.

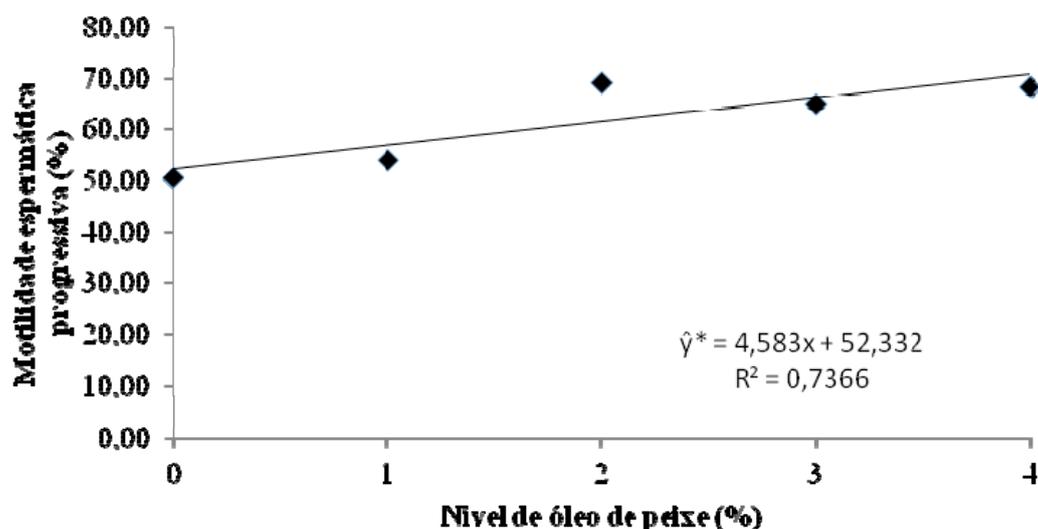


Figura 1. Motilidade espermática progressiva do sêmen de caprinos após o processo de criopreservação utilizando-se 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% de óleo de peixe no diluente.

Não houve diferença ($P>0,05$) para vigor espermático pós-descongelamento, com média geral para os tratamentos de $2,00\pm 0,24$ (Tab. 1), resultado que atendeu aos requisitos mínimos

exigidos pelo CBRA (Manual..., 2013), o qual sugere que o sêmen caprino após o descongelamento deve permanecer com o valor mínimo de dois de vigor.

Tabela 1. 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 \pm desvio-padrão, e (*) refere-se à mediana e amplitude interquartil.

Não houve diferença ($P>0,05$) no teste de termorresistência lento (TTR) para as variáveis avaliadas de motilidade espermática progressiva e vigor espermático nos tempos de avaliação (Tab. 1). É válido ressaltar que apenas as amostras dos diluentes que continham óleo de peixe permaneceram com valores de vigor espermático no tempo 60 minutos. A queda da

qualidade seminal após o processo de criopreservação está também atribuída aos danos ocasionados às membranas, como alterações na sua organização, na fluidez, na permeabilidade, na composição lipídica ou na sua ruptura total (Amann e Graham, 1992). A perda significativa dos AGPI presentes na membrana plasmática

tem correlação negativa com a motilidade espermática (Chakrabarty *et al.*, 2007).

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos para a integridade da membrana plasmática (Tab. 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±5,25	22,50±3,16	25,08±8,70	23,75±7,02	24,67±5,69
Não reativos	78,50±5,25	77,50±3,16	73,25±7,22	76,25±7,03	75,33±5,69

C= controle; HO= teste hiposmótico. Os dados foram analisados por análise de regressão a 5% de probabilidade.

Neste estudo, obteve-se correlação positiva entre células reativas no teste 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 em outros estudos apresentam resultados controversos, como demonstrado por Oliveira *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2006), que não encontraram correlação entre as características seminais de caprinos e o teste HO.

O estresse oxidativo contribui para baixa qualidade seminal pós-descongelamento. O processo de criopreservação origina modificações na membrana plasmática do

espermatozoide, que resultam em progressiva diminuição do potencial fecundante dessas células; isso é refletido na redução da motilidade e da viabilidade espermática, em danos na integridade de membrana e nas funções espermáticas (Bucak *et al.*, 2010).

Para integridade acrossomal, houve diferença entre os tratamentos ($P<0,05$) no número de acrossomas íntegro (Fig. 2) e irregular (Fig. 3) com comportamento linear crescente e linear decrescente, respectivamente (Tab. 3). Isso demonstra que o diluente testado foi eficaz em preservar a integridade acrossomal das amostras.

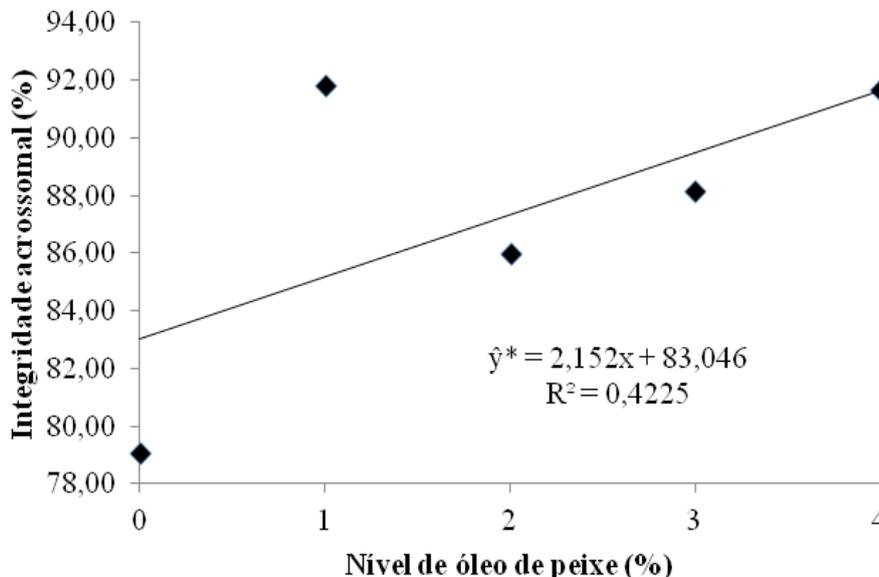


Figura 2. Porcentagem de acrossomas íntegros de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação.

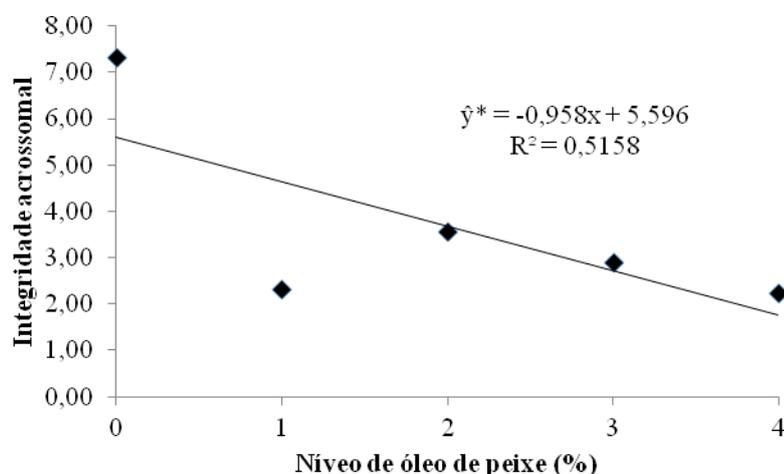


Figura 3. Acrossoma irregular de espermatozoides caprinos após o processo de criopreservação.

Os grupos que tiveram a adição de óleo de 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. O resultado indica que o DHA presente no óleo de peixe pode ter se incorporado à membrana acrossomal, conferindo maior resistência ao processo de criopreservação.

A capacidade de incorporação do DHA às membranas ocorre pela alta afinidade com proteínas estruturais delas. 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 domínio mutável de formas (Wassall e Stillwell, 2009).

Tabela 3. Teste de integridade acrossomal do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de 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, cuja característica, de acordo com Bernardi (2008) é de suma importância, pois é atributo essencial para garantir bom potencial de fertilidade dos espermatozoides, independentemente da espécie. Os trabalhos de suplementação com fontes de lipídios aos meios de diluição apresentam resultados variados, revelando sucesso em determinados estudos ou nenhuma influência quando utilizados em outros, e essa variação pode ser devido à fonte de AGPI

utilizada, variando o perfil de ácidos graxos encontrado nelas.

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 relatados por Towhidi e Parks (2012), que trabalharam com sêmen de bovinos suplementados com fontes purificadas de DHA.

Óleo de peixe associado...

Não houve diferença ($P>0,05$) para a integridade da compactação da cromatina (Tab. 4). Os resultados obtidos por meio do teste de metacromasia mostraram que a porcentagem média de células com cromatina íntegra foi de

97,06±1,17% e 2,94±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.

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 ± desvio-padrão.

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±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.

A integridade da cromatina exerce papel importante para o desenvolvimento embrionário, pois nela estão contidas as informações paternas. Alguns estudos demonstram a existência de uma correlação entre a presença de danos na cromatina e os resultados de fecundação e desenvolvimento embrionários (Morrell *et al.*, 2008).

O óleo de peixe, entre as possíveis fontes de aditivos para diluentes, apresenta grande potencial pela quantidade de AGPI que tem em sua composição. Neste estudo, o óleo de peixe pode ter sido responsável por uma incorporação do DHA nas membranas espermáticas, conferiu maior resistência em relação ao processo de criopreservação e melhorou alguns parâmetros seminais importantes, como a motilidade progressiva pós-descongelamento. Poucos são os estudos com adição de óleo de peixe diretamente ao diluidor de sêmen caprino, sendo necessária realização de outros estudos para avaliar concentrações maiores ou associação com outras substâncias.

CONCLUSÃO

A inclusão de até 4% de óleo de peixe acrescido de 0,05% de ácido ascórbico no diluidor citrato-gema não promoveu maior criotolerância da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos em relação ao processo de criopreservação, porém houve manutenção *in vitro* da motilidade pós-descongelamento e preservação da integridade acrossomal.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febinger, 1992. p.715-746.
- ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; MORADI SHAHRBABA, M.; BAHREINI, M. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Slovak J. Anim. Sci.*, v.45, p.7-13, 2012.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech. Histochem.*, 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 Sci. Vet.*, v.36, p.5-16, 2008.
- BUCAK M.N.; SARIÖZKANB, S.; TUNCER, P.B. *et al.* The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Res.*, v.89, p.24-30, 2010.

- CEYLAN, A.; SERIN, I. Influence of ascorbic acid addition to the extender on dog sperm motility, viability and acrosomal integrity during cooled storage. *Rev. Med. Vet.*, v.7, p.384-387, 2007.
- CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*, v.54, p.27-35, 2007.
- DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M. et al. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Anim. Reprod. Sci.*, v.138, p.213-219, 2013.
- DOLATPANAH; M.B.; TOWHIDI, A.; FARSHAD, A. et al. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, v.21, p.29-34, 2008.
- EJAZ, R.; ANSARI, M.S.; RAKH, B.A. et al. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. *Reprod. Domest. Anim.*, v.49, p.122-125, 2014.
- INSTITUTO Nacional de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. 2014. Acessado em: 03 ago. 2015.
- KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell[®] extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 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. *Cienc. Agrotecnol.*, v.34, p.212-219, 2010.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.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.
- 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, Supl.1, p.550-555, 2012.
- NUTRIENT requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. 5.ed. Washington: National Academy Press, 2007. 384p.
- OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; CASTELO, T.S. et al. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Cienc. Anim. Bras.*, v.14, p.216-221, 2013.
- SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. et al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, p.1934-1942, 2006.
- SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.370-384, 2011.
- SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; SANTOS, D.O. Biotécnicas da reprodução em caprinos. *Rev. Ciênc. Agrar.*, v.43, p.1-13, 2005.
- TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H. et al. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.92-97, 2012.
- 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. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.29, p.1051-1056, 2012.
- WASSALL, S.R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1788, p.24-32, 2009.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-492, 2000.