

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/03/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA CATALASE NO MEIO DE CONGELAÇÃO  
NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CRIOPRESERVADO  
DE TOUROS DA RAÇA NELORE SUPLEMENTADOS OU  
NÃO COM GORDURA PROTEGIDA**

**Natália Marins Bastos**

**Zootecnista**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA CATALASE NO MEIO DE CONGELAÇÃO  
NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CRIOPRESERVADO  
DE TOUROS DA RAÇA NELORE SUPLEMENTADOS OU  
NÃO COM GORDURA PROTEGIDA**

**Discente: Natália Marins Bastos**

**Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima**

**Co-orientadores: Dr. Fábio Morato Monteiro**

**Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti**

**Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias –  
UNESP, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de mestre em  
Genética e Melhoramento Animal.**

**2018**

Bastos, Natália Marins

B327i      Influência da catalase no meio de congelação nas características do sêmen criopreservado de touros da raça Nelore suplementados ou não com gordura protegida / Natália Marins Bastos. -- Jaboticabal, 2018

xvi, 62 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadores: Fábio Morato Monteiro, Gisele Zoccal Mingoti

Banca examinadora: Lindsay Unno Gimenes, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção

Bibliografia

1. AGPs. 2. Antioxidante. 3. Espermatozoide. 4. Estresse oxidativo. 5. Lipídeos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DA CATALASE NO MEIO DE CONGELAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS DA RAÇA NELORE SUPLEMENTADOS OU NÃO COM GORDURA PROTEGIDA

**AUTORA: NATÁLIA MARINS BASTOS**

**ORIENTADORA: VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA**

**COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO**

**COORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba

Profa. Dra. MAYRA ELENA ORTIZ DAVILA ASSUMPÇÃO

Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / São Paulo/SP

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de setembro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Natália Marins Bastos:** Filha de Wanderli Ap. Bastos e Maria Ap. Marins, nascida em 16 de agosto de 1993, natural de Piracicaba, São Paulo. Ingressou no curso de Graduação de Zootecnia, na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em agosto de 2011. Concluiu o ensino superior em Zootecnia em agosto de 2016. Durante a graduação realizou Iniciação Científica, sob orientação do Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira, junto ao departamento de Biologia e Zootecnia. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo programa BRAFAGRI, estudando no “Agrocampus Ouest” na cidade de Rennes, França, no período de julho de 2014 a junho de 2015. Em agosto de 2016 ingressou no curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, nível de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, sob orientação da Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e co-orientações de Dr. Fábio Morato Monteiro e Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti. Durante o período do mestrado foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por toda sua grandiosidade, a todas oportunidades a mim concedidas, ao caminho que começo a trilhar.

Aos meus pais pela dedicação, apoio, por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava, todo carinho e compreensão ao longo desse percurso. Aos meus irmãos, Luísa Marins Bastos e Tarso Marins Bastos. Aos meus tios Diogo Marins Netto, Silvia Polli Marins e prima Rebecca Marins, por todo o carinho, apoio e sábios conselhos durante todos esses anos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima por essa oportunidade, todos os ensinamentos, exemplos, conversas, orientações, confiança e inspiração profissional.

Aos meus co-orientadores Dr. Fabio Morato Monteiro e Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, por toda confiança para realização deste trabalho, ensinamentos, oportunidade e inspiração profissional.

Ao Dr. Guilherme Fazan Rossi, pela oportunidade, amizade, ensinamentos; pela disposição na execução do projeto e sempre ter acreditado em mim.

Aos pesquisadores do Instituto de Zootecnia (IZ), especialmente Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Dra. Roberta Carrilho Canesin, por tanto terem contribuído para este trabalho e para meu crescimento profissional. Aos funcionários e estagiários do IZ, que contribuíram para que esse trabalho fosse mais leve. Sozinha eu jamais conseguiria.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP pela jornada profissional desde a graduação que tanto me orgulho de trilhar. À Faculdade de ciências agrárias e veterinárias (FCAV – Jaboticabal) pela oportunidade concebida. Aos professores e funcionários deste campus (graduação e pós-graduação) por proporcionarem excelentes condições de aprendizado aos alunos da instituição.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal por me acolherem tão bem durante as análises laboratoriais, em especial os funcionários Roberta e Edson pela grande ajuda.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP, Botucatu), em especial à Dra. Camila de Paula Freitas Dell’Aqua pelas análises seminais pela técnica de citometria de fluxo. À Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA – UNESP, Araçatuba), em especial à Dra. Beatriz Leão por toda paciência e passagem de conhecimentos.

Aos amigos de pós-graduação, pela amizade, paciência, companheirismo, apoio enorme nos trabalhos no campo, escrita ou laboratoriais, em especial André Roberto, Naiara Nantes, Paola Rosa, MSc. Rogério Vicentini, MSc. Luana Lelis, MSc. Dayane Vrisman, MSc. Bianca Pires, Dra. Mariana Zorzetto e Dra. Amanda Nonato.

Às minhas amigas Acalian de Deus (Macega) e Mariana Gaioto (Cokreti) que mesmo longe, muito contribuíram para esse trabalho. À Gabriela Pessoa Zagato e Fernanda Soliani que sempre se fizeram presentes na minha vida. À Rep. Du Brejo e todas suas moradoras, que muito contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Aos amigos do AgroCampus Ovest (Brafagri 2014-2015) que me fizeram viajar para outro país, para eu descobrir que tenho outra família. Amo vocês.

À IX turma de Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP, por todo companheirismo e experiências profissionais que mesmo longe, ainda podemos compartilhar. Vocês fazem muita falta.

À República Éssakana que me acolheu tão bem desde que cheguei a Jaboticabal, pelos momentos de descontração, apoio, companhia e amizade; por terem feito de mim, irmã de vocês. À dona Mercês que durante esses anos cuidou de mim como uma filha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, oportunidade de executar o projeto que foi crucial para minha formação como mestre. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que mesmo não citadas aqui, de certa forma contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Ácidos graxos na nutrição de bovinos.....	4
2.2 Ácidos graxos e seu papel nas membranas celulares.....	6
2.3 Ácidos graxos poliinsaturados e espécies reativas de oxigênio.....	8
2.4 Criopreservação da célula espermática no contexto nacional.....	11
2.5 Técnicas de avaliações espermáticas para avaliação dos danos após a criopreservação.....	13
2.6 Genoma paterno no desenvolvimento embrionário.....	16
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Geral .....	20
4.2 Específicos .....	20
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
5.1 Local de experimento.....	21
5.2 Delineamento experimental .....	21
5.3 Animais e dietas experimentais .....	23
5.4 Dados meteorológicos.....	25
5.5 Colheita e avaliação do sêmen.....	26
5.6 Criopreservação do sêmen .....	27
5.7 Análises do sêmen pós-descongelação.....	28
5.7.1 Avaliação da cinética espermática pela técnica CASA .....	28
5.7.2 Teste de termorresistência rápido (TTR).....	28
5.7.3 Integridade das membranas: plasmática e acrossomal por citometria de fluxo .....	29
5.7.4 Potencial mitocondrial, desestabilização da membrana e produção da ERO ânion superóxido ( $O_2^-$ ) por citometria de fluxo.....	30
5.7.5 Produção de EROs por citometria de fluxo .....	30
5.7.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	31
5.7.6.1 Obtenção dos ovários.....	31

5.7.6.2	<i>Recuperação e seleção dos oócitos</i> .....	31
5.7.6.3	<i>Maturação in vitro (MIV)</i> .....	32
5.7.6.4	<i>Descongelamento e separação dos espermatozoides</i> .....	32
5.7.6.5	<i>Fertilização in vitro (FIV)</i> .....	33
5.7.6.6	<i>Cultivo in vitro (CIV)</i> .....	33
5.8	Quantificação lipídica intracitoplasmática no embrião.....	34
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
7.	RESULTADOS .....	37
7.1	Avaliação da cinética espermática pela técnica CASA do sêmen a fresco, pós descongelamento e TTR .....	37
7.2	Avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo .....	39
7.3	Avaliação do potencial mitocondrial, desestabilização da membrana e produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ); e produção de EROs.....	40
7.4	Produção <i>in vitro</i> de embriões e quantificação lipídica intracitoplasmática dos blastocistos .....	42
8.	DISCUSSÃO.....	43
9.	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52

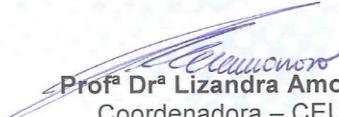
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Efeito da catalase no meio diluidor nas características do sêmen criopreservado de machos da raça nelore suplementados com fontes de ácidos graxos poliinsaturados"**, Protocolo nº 1797/17, sob a responsabilidade da Profª Drª Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2017.

Vigência do Projeto	03/02/2017 a 30/04/2018
Espécie / Linhagem	Bovino da Raça Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ).
Nº de animais	12
Peso / Idade	500 kg / 24 meses
Sexo	Machos
Origem	Fazenda

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2017.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## INFLUÊNCIA DA CATALASE NO MEIO DE CONGELAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE TOUROS DA RAÇA NELORE SUPLEMENTADOS OU NÃO COM GORDURA PROTEGIDA

**RESUMO** - Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) são integrantes da membrana celular espermática, e embora favoreçam sua fluidez, são extremamente susceptíveis ao estresse oxidativo. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a influência da catalase no meio de congelação para criopreservação do sêmen de machos da raça Nelore suplementados com gordura protegida, a fim de evitar a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Foram utilizados 12 machos da raça Nelore mantidos em pastagem de capim-marandu em lotação contínua e taxa de lotação fixa. Os animais foram divididos em dois grupos: suplementados dos 14 aos 24 meses de idade (S+), ou não suplementados (S-). A colheita de sêmen foi realizada aos 24 meses, e as amostras de sêmen a fresco foram submetidas a análise computadorizada de cinética espermática (CASA). Posteriormente, as amostras foram divididas em duas frações e foram criopreservadas após a adição de meio de congelação, de igual composição, contendo catalase (C+) ou não (C-). Após o descongelamento do sêmen foram realizadas: avaliações de CASA; teste de termorresistência rápido (TTR); integridade das membranas plasmática e acrossomal; potencial mitocondrial, desestabilização da membrana e produção da ERO ânion superóxido ( $O_2^-$ ); produção da EROs; produção *in vitro* de embriões (PIVE) e quantificação intracitoplasmática de lipídio dos embriões. O delineamento experimental utilizado foi um esquema fatorial 2X2 (suplementação x catalase), totalizando 4 tratamentos (S+, S-, C+ e C-). A análise dos dados foi realizada utilizando o procedimento PROC MIXED do SAS. Os parâmetros de cinética espermática do sêmen a fresco foram maiores para o grupo S- (motilidade total e porcentagem de células rápidas) quando comparados com o grupo S+ (MT: 91,33 x 85,83%; RAP: 89,00 x 84,33% respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Houve interação entre SUP\*CAT para a frequência de batimento de cabeça (BCF) ( $P < 0,05$ ). O grupo S+, apresentou valores maiores, quando comparado com o grupo S- para: membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL) (11,29 X 2,89% respectivamente); mediana da população total de células totais (5,66 x 4,41) ( $P < 0,05$ ); células lesadas (6,54 X 5,39 respectivamente) ( $P < 0,05$ ) e produção de  $O_2^-$  depois do TTR; (6,47 X 5,36 respectivamente) ( $P < 0,05$ ); quantificação lipídica intracitoplasmática, quando avaliado média/área de blastocistos (0,323 X 0,300 respectivamente) ( $P < 0,05$ ). O grupo S+ com catalase apresentou menores valores de MPAL após o TTR (10,11 X 17,69) ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos para os valores de TTR na cinética espermática; produção de EROs e no desenvolvimento embrionário na PIVE. Os resultados do presente estudo sugerem que a dieta influenciou negativamente na qualidade seminal e possivelmente contribuiu para a peroxidação lipídica causada pelo  $O_2^-$ . Além disso, a dieta influenciou fortemente na quantificação lipídica intracitoplasmática. Por outro lado, a catalase no meio de congelação foi benéfica evidenciando que a suplementação com gordura protegida pode ser vantajosa se utilizada em associação com antioxidantes.

**Palavras chave:** AGPs, antioxidante, espermatozoide, estresse oxidativo, lipídeos

## THE INFLUENCE OF CATALASE IN THE EXTENT ON CHARACTERISTICS OF CRIOPRESERVED SEMEN OF NELORE BREED BULLS SUPPLEMENTED OR NOT WITH PROTECTED FATTY

**ABSTRACT** - Polyunsaturated fatty acids (PUFA) comprise an important component of a sperm cell membrane. Although improving the membrane fluidity, they are extremely susceptible to oxidative stress. In this context, this study aimed to evaluate the catalase influence on extender for semen's cryopreservation of Nelore Bulls supplemented with sources of PUFA in order to avoid reactive species of oxygen (ROS) production. Therefore, we have included twelve Nelore bulls kept in Marandu grass pasture in continuous stocking and fixed stocking rate. Bulls were divided in two groups: supplemented at 14 to 24 months old (S+), or non-supplemented (S-). The sperm collections were performed at 24 months old and fresh semen samples were analyzed by computer-assisted sperm analysis (CASA). Subsequently, we have divided these samples into two equal portions, which were both cryopreserved after same composition extender medium addition, containing catalase (C+) or not (C-). After thawing semen, computer-assisted sperm analysis (CASA); rapid test of thermo resistance (TTR); plasma membrane integrity, acrosomal membrane integrity; mitochondrial membrane potential, membrane destabilization; production of ROS superoxide anion ( $O_2^-$ ); ROS ; *in vitro* embryo production (IVEP) and intracellular lipid content of embryos were performed. The experimental design used was a 2X2 factorial (supplementation x catalase), with 4 treatments (SUPL, CONTR, C+ e C-). Data analysis was performed using SAS PROC MIXED procedure. Sperm kinetic parameters of fresh semen were higher for S- (total motility and percentage of rapid sperm) than S+ (MT: 91.33 x 85.83%; RAP: 89.00 x 84.33% respectively) ( $P < 0.05$ ). We have also observed an interaction between SUP\*CAT for beat cross frequency (BCF) ( $P < 0.05$ ). The S+ group has presented higher values compared to S- for damage percentage of plasma and acrosomal membranes (DPAM) (11.29 X 2.89%, respectively); median for total population of total cells (5.66 x 4.41, respectively) ( $P < 0.05$ ); damaged cells (6.54 x 5.39, respectively) ( $P < 0.05$ ) and  $O_2^-$  production after TTR 96.47 x 5.36, respectively) ( $P < 0.05$ ); intracellular lipid content, when evaluated the mean/area of blastocysts (0.323 X 0.300 respectively) ( $P < 0.05$ ). The S+ group with catalase presented lower DPAM values after TTR (10.11 X 17.69 respectively) ( $P < 0.05$ ). No differences were observed between the groups for TTR values on spermatoc kinetics, ROS production and on embryonic development in IVEP. Our results suggest that diet has negatively influenced seminal quality and possibly contributed to lipid peroxidation caused by  $O_2^-$ . In addition, diet strongly influenced intracytoplasmic lipid quantification. On the other hand, catalase in the extender was beneficial in showing that supplementation with protected fat may be advantageous if used in combination with antioxidants.

**Keywords:** antioxidant, lipids, oxidative stress, PUFA, spermatozoa

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Percentual dos ingredientes, composição química dos suplementos, características da pastagem e perfil de ácidos graxos de acordo com as épocas do ano.....	24
<b>Tabela 2.</b> Configuração do software Hamilton Thorne Research, IVOS-14 para análise computadorizada da cinética espermática de bovinos.....	27
<b>Tabela 3.</b> Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros de cinética espermática pela técnica CASA do sêmen a fresco, pós descongelação, e teste de termorresistência rápido, sob presença e ausência de catalase no meio de congelação de sêmen de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida.....	38
<b>Tabela 4.</b> Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo do sêmen pós descongelação, sob presença e ausência de catalase no meio de congelação de sêmen de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida.....	40
<b>Tabela 5.</b> Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros de potencial mitocondrial, desestabilização da membrana e produção da ERO ânion superóxido ( $O_2^-$ ) por citometria de fluxo do sêmen pós descongelação, sob presença e ausência de catalase no meio de congelação de sêmen de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida.....	41
<b>Tabela 6.</b> Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros de produção da ERO peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por citometria de fluxo do sêmen pós	

descongelamento, sob presença e ausência de catalase no meio de congelamento de sêmen de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida.....41

**Tabela 7.** Número de oócitos totais e produção *in vitro* de embriões oriundos do sêmen sob presença e ausência de catalase no meio de congelamento, de machos da raça Nelore suplementados ou não com gordura protegida.....42

**Tabela 8.** Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros da produção *in vitro* de embriões e quantificação lipídica intracitoplasmática pelo corante Sudan Black B, oriundos do sêmen sob presença e ausência de catalase no meio de congelamento, de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida.....42

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1</b> Reação tetravalente do O<sub>2</sub> e a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. (Adaptado de FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006)</p> <p>.....</p>	09
<p><b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo do delineamento experimental inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, de acordo com os tratamentos, sendo o grupo “S+”, suplementado com gordura protegida; “S-”, o grupo controle; C-, fração do diluidor desprovida de catalase; C+, fração do diluidor provida de catalase.....</p>	22
<p><b>Figura 3.</b> Médias das temperaturas máximas e mínimas (°C) e precipitação pluviométrica (mm) mensal, durante o período experimental (dezembro de 2015 a dezembro de 2016) do Instituto de Zootecnia - Centro Avançado de Pesquisa em Bovinos de Corte de Sertãozinho – SP.....</p>	26
<p><b>Figura 4.</b> Fotomicrografia representativa de embrião bovino no estágio de blastocisto, corado com o corante lipofílico Sudan Black B para quantificação do acúmulo lipídico intracitoplasmático. Fonte: Arquivo pessoal.....</p>	34
<p><b>Figura 5.</b> Análise de pixels de blastocistos de bovino, após conversão em escala cinza, utilizando o software Image J.....</p>	35
<p><b>Figura 6.</b> Médias do parâmetro BCF (Hz) pela técnica CASA do sêmen pós descongelação, sob presença e ausência de catalase no meio de congelamento de sêmen de machos da raça Nelore suplementados, e não suplementados, com gordura protegida (P=0,031) .....</p>	39

## 1. INTRODUÇÃO

No panorama mundial, o Brasil é destaque na produção de bovinos e exportação da carne, possuindo mais de 200 milhões de cabeças, das quais quase 70% é representada por bovinos de corte (ANUALPEC, 2015). A eficiência no setor de produção de carne continua crescendo e a melhoria dos índices de produtividade, especialmente nas últimas décadas, é em grande parte decorrente da ampla utilização de biotécnicas reprodutivas, associadas ao maior cuidado com o manejo nutricional dos animais. A inseminação artificial (IA) é a ferramenta mais amplamente utilizada para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, de forma que o mercado de produção e comercialização de doses de sêmen tem grande destaque na economia do setor. Somente do ano de 2013 para 2014 foi observado um crescimento de 4,49% do mercado de sêmen, especialmente da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) (ASBIA, 2018).

Entretanto, mesmo que os índices de taxas de prenhez sejam satisfatórios quando se emprega a IA, ainda existem problemas relacionados aos touros que podem levar à perdas preocupantes na produção de doses de sêmen (MOORE; REIJO-PERA, 2000). Um dos fatores que merecem destaque é a nutrição a qual representa extrema importância para a qualidade reprodutiva em bovinos, uma vez que o consumo de energia está relacionado ao atraso à puberdade, redução da libido e baixa produção de espermatozoides (PIRES; RIBEIRO, 2006). Porém, a maior parcela de bovinos no Brasil é criada em produções extensivas, mantidos exclusivamente a pasto. Plantas forrageiras, por sua vez, possuem baixas concentrações de lipídeos, especialmente de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) (SILVA, 2012). Os animais são incapazes de produzir os AGPs linolênico (n-3) e linoleico (n-6) (ANDRIGUETTO et al., 1994), que são essenciais para manter o bom funcionamento do organismo por estarem envolvidos em vários processos biológicos, incluindo crescimento e reprodução (GURR; HARWOOD; FRAYN, 2002). Ainda, os AGPs são os principais componentes das membranas dos espermatozoides, afetando a qualidade e a resistência à criopreservação dos espermatozoides (VAN TRAN et al., 2017). Cada lipídeo constituinte da membrana plasmática exerce um papel importante para a função da membrana, de modo que a composição lipídica da membrana afeta a sua fluidez e a viabilidade do sêmen,

causando impacto direto na sensibilidade dos espermatozoides ao processo de criopreservação (AMANN; GRAHAM, 2010; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; BLESBOIS et al., 1997; PETER et al, 2001; SELVARAJU et al., 2012).

Dessa forma, pela importância desses ácidos graxos (AGs) essenciais, é importante fornecê-los via suplementação dietética aos touros em fase de coleta de sêmen. Atualmente há no mercado suplementos comerciais ricos em AGPs, que são protegidos da degradação ruminal, com o intuito de evitar o processo da biohidrogenação e possíveis alterações à composição química desses AGP. Tal fato possibilita, portanto, a passagem inerte dos AGPs pelo rúmen até sua chegada ao abomaso, onde poderão então ser absorvidos (RENNÓ et al., 2010).

Entretanto, embora os AGPs, especialmente os fosfolipídeos, sejam componentes fundamentais para a manutenção das funções da membrana plasmática, são alvo de frequentes injúrias causadas pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses radicais livres são gerados pela presença de oxigênio em contato com as células (AITKEN, 1995) e estão associadas a processos patológicos do sistema reprodutivo masculino, gerando efeito deletério amplo. Em situações de estresse oxidativo, o desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos celulares antioxidantes pode acarretar diferentes tipos de injúrias celulares, tais como peroxidação lipídica das membranas, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, além da apoptose (FEUGANG et al., 2003). Já foi anterioremtne relatado que a criopreservação leva à redução dos níveis dos antioxidantes presentes tanto nos espermatozoides quanto no plasma seminal, fortalecendo a evidência de que o estresse oxidativo pode afetar negativamente ao processo de congelação e descongelação (Maia e Bicudo, 2010). Como consequência, as EROs geradas durante os procedimentos para execução da técnica de congelação do sêmen, produzem danos aos espermatozoides que ocasiona alterações osmóticas, ultraestruturais, físicas, bioquímicas, funcionais e quebra da assimetria bilipídica da membrana plasmática (WATSON, 1995; BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Adicionalmente, aos danos osmótico e à integridade das membranas, o estresse oxidativo pode afetar a integridade do DNA espermático. Essas injúrias no material genético dos espermatozoides podem afetar o desenvolvimento embrionário e uma variedade de mecanismos epigenéticos (AITKEN et al., 2016). Tais danos estão associados a diminuição das taxas de pré-implantação embrionária, aumento

das perdas precoces de prenhez e altas taxas de mortalidade nos descententes, incluindo doenças genéticas (AITKEN; BAKER, 2006). Portanto, a adição de antioxidantes ao meio de congelação pode ser um importante fator na diminuição do estresse oxidativo, com o intuito de evitar prejuízos à qualidade espermática.

Por se fazer tão importante, estudos que relacionem a suplementação nutricional com gordura protegida para touros em coleta de sêmen e a adição de antioxidantes ao meio de congelação seminal devem ser realizados, a fim de avaliar os possíveis efeitos sobre a produção de EROs e seus possíveis danos aos espermatozoides.

## 9. CONCLUSÕES

A suplementação com gordura protegida diminuiu os valores de cinética espermática no sêmen a fresco; alterou a integridade das membranas plasmática e acrossomal logo após o descongelamento; e possibilitou o aumento da produção de O<sub>2</sub>- pela desestabilização da membrana mitocondrial. Embora a suplementação não tenha influenciado na fertilidade, avaliada neste estudo pela fecundação *in vitro*, foi observado maior acúmulo lipídico intracitoplasmático nos embriões produzidos com sêmen de touros suplementados com AGPs.

O uso da catalase no meio de congelação possibilitou menores taxas de modificações das membranas plasmática e acrossomal.

A associação entre a suplementação com gordura protegida e catalase no meio de congelação se fez vantajosa para o parâmetro BCF da cinética espermática pós congelação.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; AHMAD, N.; RIAZ, A.; ANZAR, M. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: Progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 5, p. 784–793, 2015.

AITKEN R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility And Development**, v.7, p.659-668, 1995.

AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 10, p. 1039–1052, 2017.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 66–69, 2006.

AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DREVET, J.; GHARAGOZLOO, P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 10, 2016. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12031888](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12031888)>.

AITKEN, R.; SMITH, T.; JOBLING, M.; BAKER, M.; DE IULIIS, G. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014. Disponível em: <<http://www.ajandrology.com/text.asp?2014/16/1/31/122203>>.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: **Equine reproduction**, p.1053– 1084, 2010.

AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p. 745–756, 2016.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

ANDRIGUETTO, J.M. ; PERLY, L. ; MINARDI, I. ; FLEMMING, J.S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G. A.; BONA-FILHO, A. **Nutrição Animal**, Vol. II. 3ª Ed. Nobel. São Paulo, 426 p, 1994. 59.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA PECUÁRIA DE CORTE (ANUALPEC). São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2015.

ARRUDA R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

ARRUDA, R. P. **Avaliação do sêmen congelado de bovinos. Prova lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade**. 1988. 41f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARRUDA, R. P.; D.F. SILVA, F.J. AFFONSO, K.M LEMES, J.D. JAIMES 1, E.C.C. CELEGHINI, M.A. ALONSO, H.F. CARVALHO, L.Z. OLIVEIRA, J. N. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.

ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. **Veterinary Research Forum**, v. 2, n. 4, p. 218–221, 2011.

AURICH , J.E. ; SCHÖNHERR, I.U. ; HOPPE, H. ; AURICH,C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

BARBAS, J.P. ; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, Amsterdam, v.10, p.46-62, 2009.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. de A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782014000300011&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000300011&lng=pt&tlng=pt)>.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

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

BECONI, M.T. ; FRANCA, C.R. ; MORA, N. G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine sêmen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p.841-851, 1993. 60

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.27, p.911-917, 1959.

BONGALHARDO, D.C. ; LEESON, S. ; BUHR, M.M. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of roosters sperm. **Poultry Science**, v.88, 1060–1069, 2009.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35(3), p. 303–314, 2011.

BYRNE, C.J.; FAIR, S. ; ENGLISH, A.M. ; HOLDEN, S.A. ; DICK, J.R. ; LONERGAN, P. ; KENNY, D.A. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation of young post-pubertal dairy bulls alters the fatty acid composition of seminal plasma and spermatozoa but has no effect on semen volume or sperm quality. **Theriogenology**, v. 90, p.289-300, 2017.

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; RIBEIRO DIAS, E. A.; MERCADANTE, M. E. Z.; DE PAZ, C. C. P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, C. de P. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114–121, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.008>>.

CARONE, B.R.; FAUQUIER, L.; HABIB, N.; SHEA, J.M.; HART, C.E.; LI, R.; BOCK, C.; LI, C.; GU, H.; ZAMORE, P.D.; MEISSNER, A.; WENG, Z.; HOFMANN, H.A.; FRIEDMAN, N.; RANDO, O.J. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. **Cell**, [s.l.], v. 143, n. 7, p.1084-1096, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.008>.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula**. 2ª Ed. Barueri, SP., Manole, 2007.

CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., DAL BOSCO, A., MINELLI, A., MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary Vitamin E, C and N-3 fatty acids. **Reproduction Nutrition Development** v.43, p.91–103, 2003.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, MG, 2013. 104 p.

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

CHAMPROUX, A.; COCQUET, J.; HENRY-BERGER, J.; DREVET, J. R.; KOCER, A. A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. May, p. 50, 2018. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29868581>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5962689>%0A<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00050/full>>.

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C. O.; SREENAN, J. M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A. A.; KENNY, D. A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 992–1003, 2008.

CIAGRO. **Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas**. Disponível em:<<http://ciiagro.sp.gov.br/>>. Acessado em 10/01/2018.

COSTA MELLO, R. R.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. de; PALHANO, H. B. Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 57-63, jan./mar. 2016.

DINIZ, J.V.A. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino. 2017. 70 f. Botucatu, 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Defesa E Estresse Oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES - NETO J.R.; PAPA F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.131-32, 1997.

FREITAS-DELL’AQUA C.P.; CRESPILO A.M.; PAPA F.O.; DELL’AQUA JUNIOR J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.213-222, 2009.

FREITAS-DELL’AQUA, C.P.; GUAISTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D; DELL’AQUA JR J.A.; PAPA, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, 9-941, 2012.

GADEA J.; MOLLA M.; SELLES E.; MARCO M.A.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; GARDON, J.C.Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology** v.62, p.40–46, 2011. 62

GADEA J.; MOLLA M.; SELLES E.; MARCO M.A.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; GARDON, J.C.Reduced glutathione content in human sperm is decreased after

cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology** v.62, p.40–46, 2011.

GASPAR, R.C.; ARNOLD, D.R.; CORRÊA, C.A.P.; DA ROCHA-JR, C.V.; PENTEADO, J.C.T.; DELCOLLADO, M.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M.; LOPES, F.L. Oxygen tension affects histone remodeling of *in vitro*-produced embryos in a bovine model. **Theriogenology**, v.83, n.9, p.1408-1415, 2015.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M. H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1548–1558, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.025>>.

GUARDIEIRO, Monique Mendes. **Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes**. 2013. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal e Pastagens, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2013.

GÜRLER, H. ; CALISICI, O. ; CALISICI, D. ; BOLLWEIN, H. Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p.97-104, 2015.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ B. Transporte e sobrevivência de gametas. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ B., **Reprodução Animal**, 7ª Ed. Barueri – SP: Manole, cap. 23, p. 146-166, 2004.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive - HAMMERSTEDT - 2013 - Journal of Andrology - Wiley Online Library. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, 1990.

HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: A review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 675–690, 1993.

HERNÁNDEZ, M. M. R.; PATINO, H. O.; GREGORY, R. M.; ANGEL, J. C.; RE del, D.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.49, n.6, p.471-479, 2012.

HENKEL, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.1, p.43–52, 2011. 63.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p. 675-685, 2003.

IZQUIERDO-VEGA, J. A.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; DEL RAZO, L. M. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 230, n. 3, p. 352–357, 2008.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.17, n.39, p.1-8, 2002.

JIANG, Z. ; DONG, H. ; ZHENG, X. ; MARJANI, S.L. ; DONOVAN, D.M. ; CHEN, J. ; TIAN, X. C. mRNA Levels of Imprinted Genes in Bovine *In Vivo* Oocytes, Embryos and Cross Species Comparisons with Humans, Mice and Pigs. **Scientific Reports**. v.5, p.1-10, 2015.

JOHNSON, A.D. Sample preparation and chemical analysis of vegetation. In: MANEJTE, L.T. (Ed.). **Measurement of grassland vegetation and animal production**. Aberystwyth: Commonwealth Agricultural Bureau, p.96-102, 1978.

JOHNSON, G.D. ; LALANCETTE, C. ; LINNEMANN, A.K. ; LEDUC, F. ; BOISSONNEAULT, G. ; KRAWETZ, S.A. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**. 141(1):21-36, 2011.

KARIMI, R.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S.; REZAYAZDI, K.; MOUSAVI, M.; SAFARI, H.; MARTINEZ-PASTOR, F. Effects of supplemental conjugated linoleic acids (CLA) on fresh and post-thaw sperm quality of Holstein bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 459–467, 2017.

KIM, J. G.; PARTHASARATHY, S. Oxidation and the spermatozoa. **Seminars in reproductive endocrinology**, v. 16, n. 4, p. 235–239, 1998.

LEÃO, Beatriz Caetano da Silva. **ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLÊNICO E L-CARNITINA NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA: EFEITOS SOBRE O METABOLISMO CELULAR, POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária (reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2016.

LEITE, P. A.; SCHEREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. da C. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279–286, 2011.

LICITRA, G., HERNÁNDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science Technology**. v.57, p.347-358, 1996.

LIN, H.; BOYSLON, T.D. ; CHANG, M.J. ; SHULTZ, T.D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.11, p. 2358-2365. 1995. 64

LONE, S. A.; PRASAD, J. K.; GHOSH, S. K.; DAS, G. K.; BALAMURUGAN, B.; VERMA, M. R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**, v. 50, n. 4, p. 1–8, 2018.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres , antioxidantes e função espermática em mamíferos : uma revisão. p. 183–193, 2010.

MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 365–375, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x>>.

MATOS D.L.; ARAÚJO A.A.; ROBERTO I.G.; TONIOLLI R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**. 247, C125–C142. 1984.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287–301, 2010.

MOGHBELI, M.; KOHRAM, H.; ZARE-SHAHANEH, A.; ZHANDI, M.; SHARIDEH, H.; SHARAFI, M. Effect of sperm concentration on characteristics and fertilization capacity of rooster sperm frozen in the presence of the antioxidants catalase and vitamin E. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1393–1398, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.038>>.

MOORE, F. L.; REIJO-PERA, R. A. Male Sperm Motility Dictated by Mother's mtDNA. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 3, p. 543–548, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707632418>>.

MORA, F. G.; BIOQUÍMICA, M. Avaliação das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Espermatozoides Humanos e sua Aplicação em Técnicas de Procriação Medicamente Assistida. 2016.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, p.1551– 62, 2006.

NAGY, C.; TURECKI, G. Transgenerational epigenetic inheritance: An open discussion. **Epigenomics**, v. 7, n. 5, p. 781–790, 2015. 65

NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and ??-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm

characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v. 44, n. SUPPL.1, p. 550–555, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. NOGUEIRA, B.G. **Características do sêmen equino refrigerado por 72 horas com antioxidantes não enzimáticos**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th edition, National Academies Press, Washington D. C, 2000.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v.26, n.2, p. 106-114, 2003.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, n. 99, 1999.

OLIVEIRA, P. F.; CRISÓSTOMO, L.; SOUSA, M.; MONTEIRO, M. P.; MACEDO, P.; RAPOSO, J.; ALVES, M. G. O papel do Espermatozoide na Transmissão à Descendência do Risco para Diabetes Mellitus \*. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 12, n. 4, p. 149–158, 2017.

ORTIZ-VEGA W.H.; MACIEL-JÚNIOR V.L.; QUIRINO C.R. Avaliações seminais e novas ferramentas genômicas na estimação da fertilidade em touros. **Spei Domus**. v.23 p.33-45, 2015.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Funep, 2006. 583p. PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A ; FIRST, N.L. Capacitation on bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1180, 1988.

PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. **Nutrição de bovinos: conceitos básicos e aplicados**. Piracicaba: FEALQ, 526 p.1993. 66.

PAPA F. O.; GABALDI S. H.; WOLF A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, p.39-44, 2000.

PETER, S.; RAYMOND, C. N. **Male fertility with antioxidants and/or polyunsaturated fatty acids**. Patente No 6235783. United States, 2001.

PIRES, A. V.; RIBEIRO, C. V. di M.; SUSIN, I.; MENDES, C.Q. Aspectos nutricionais na reprodução de bovinos de corte. In: PIRES, Alexandre Vaz. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: Fealq, 2010. p. 585-605. (Vol 1).

SIES, H. Oxidative stress: Oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 10a ed.: Lea e Febiger, Philadelphia, p.769-789, 1993.

PROKOPIUK, L.; WESTERN, P.S.; STRINGER, J.M. Transgenerational epigenetic inheritance: adaptation through epigenome? **Epigenomics**, v. 7, n. 5, p. 829–846, 2015. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/pdfplus/10.2217/epi.15.36>>.

RANDO, O. J. Daddy Issues:Paternal Effects on Phenotype. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 702–708, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412012354%5Cnpapers2://publication/doi/10.1016/j.cell.2012.10.020>>.

RENNÓ, F. P.; VENTURELLI, B.C; FREITAS-JUNIOR, J.E.; GANDRA, J. R. BARLETTA, R.V.; VILELA, F.G. NAVES, A.B.; VERDURICO, L.C. FONTES DE GORDURA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS: Fluxo intestinal de ácidos graxos e manipulação do perfil de ácidos graxos do leite. In: SILVA, L.F.P.; DOS SANTOS, M.V.; GOBESSO, A.A.O.; GAMEIRO, A.H. **NOVOS DESAFIOS DA PESQUISA EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL**. 2010. ed. Pirassununga: Editora 5d, 2010. Cap. 7. p. 123-146.

ROSSI, Guilherme Fazan. **PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS DA RAÇA NELORE DE BAIXA E ALTA EFICIÊNCIA ALIMENTAR SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS PROTEGIDOS EM PASTAGEM**. 2017. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária (reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2017.

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

SIES, H. Oxidative stress: Oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v.82,p.291-295, 1997.

SICHERLE, C. C.; MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; AZEVEDO, H. C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, n. 2–3, p. 67.144–149, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.10.011>>.

SILVA P.F.N.; GADELLA B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 370–384, 2011.

SOUBRY, A. Epigenetic inheritance and evolution: A paternal perspective on dietary influences. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 118, n. 1–2, p. 79–85, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.008>>.

STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 3, p. 50–58, 2009.

SUDANO, M. J.; CRESPILO, A. M.; FERNANDES, C. B.; JUNIOR, A. M.; PAPA, F. O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Use of Bayesian Inference to Correlate *In Vitro* Embryo Production and *In Vivo* Fertility in Zebu Bulls. **Veterinary Medicine International**, 2011a.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211–1220, 2011b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>>.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C.; MACHADO, R. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts 1. v. 87, n. October, p. 1–11, 2012

TAYLOR K. ; ROBERTS P. ; SANDERS K. ; BURTON P. Effect of anti-oxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, v.2, p.184–189, 2009.

THIANGTUM, K; A PINYOPUMMIN,; HORI, T.; TSUTSUI, T. Effect of Catalase and Superoxide Dismutase on Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Frozen-Thawed Cat Spermatozoa. **Reproduction In Domestic Animals**, [s.l.], v. 44, p.369-372, jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01420.x>.

TRINDADE, M. C.; MACENTE, B. I.; VICENTE, W. R. R.; APPARICIO, M. ESTRESSE OXIDATIVO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA. v. 15, n. 1, p. 37–45, 2016. 68

VAN TRAN, L.; MALLA, B. A.; KUMAR, S.; TYAGI, A. K. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 5, p. 622–637, 2017.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F. da; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-JR, A. A. Papel Dos Nutrientes Na Peroxidação Lipídica E No Sistema De Defesa Antioxidante. **Medicina (Ribeirão**

**Preto. Online)**, v. 31, n. 1, p. 31, 1998. Disponível em: <<http://revistas.usp.br/rmrp/article/view/7316>>.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p.100-109, jun. 2008

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

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WARD, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. v. 16, n. 1, p. 30–36, 2010.

WATKINS, A. J.; DIAS, I.; TSURO, H.; ALLEN, D.; EMES, R. D.; MORETON, J.; WILSON, R.; INGRAM, R. J. M.; SINCLAIR, K. D. Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 201806333, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150380>>.

WEAVER, J. R.; SUSIARJO, Æ. M.; BARTOLOMEI, M. S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. p. 532–543, 2009.

WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrossome reactions with calcium inophore (A23187). **Theriogenology**, v.44, n.3, p.413-422, 1995.