

Qualidade espermática e perfil plasmático de lipídeos em ganhões suplementados com óleo de arroz semi-refinado com alto teor de gama-orizanol

Spermatic quality and plasmatic lipids in stallions supplemented with rice bran oil semi-refined containing high level of gamma-oryzanol

Iaçanã Valente Ferreira GONZAGA¹; Waleska Tobo TAMAS¹; Mariano ETCHICHURY²; Alexandre Augusto de Oliveira GOBESSO¹

¹Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, Brasil

²Médico Veterinário, Doutor em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, Brasil

Resumo

O gama-orizanol é uma substância natural contida no óleo de arroz, que por suas características hipocolesterolêmicas e antioxidantes, têm sido objeto de estudo em humanos e, mais recentemente, em equinos. Foram utilizados seis ganhões, de várias raças, com idade de 10±5,4 anos e peso inicial de 472,67±90,48 kg. Objetivou-se verificar os efeitos da suplementação da dieta com óleo de arroz semi-refinado, contendo 1,1% de gama-orizanol, sobre os níveis de lipídeos plasmáticos (colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e triglicérides), de testosterona e da qualidade espermática. Os ganhões foram divididos em dois grupos, recebendo em cada refeição 150 mL de óleo de soja ou de arroz durante 60 dias. Realizaram-se colheitas amostrais de sangue e sêmen a cada 15 dias do período experimental. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo, e as médias comparadas pelo teste F, considerando-se o nível de 5% de significância. Os valores médios de testosterona, colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e triglicérides foram respectivamente 75,93 ng/dL; 92,73; 61,47; 26,99 e 4,28 mg/dL para o tratamento com óleo de soja; e de 62,13 ng/dL; 110,20; 66,73; 38,44 e 5,02 mg/dL para o tratamento com óleo de arroz. Em relação à qualidade espermática, não foi observada diferença ($p<0,05$) entre os tratamentos nas variáveis: volume, motilidade, concentração e defeitos. Podemos concluir que a suplementação supracitada não influencia a qualidade espermática nem as concentrações plasmáticas de testosterona, VLDL-C, HDL-C e triglicérides, porém, pode elevar as concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL-C.

Palavras-chave: Colesterol. Equinos. Nutrição. Testosterona.

Abstract

Gamma-oryzanol is a natural substance contained in rice bran oil that has been studied for years in humans due to its hypocholesterolemic and antioxidant properties, and in recent years in horses. Using six stallions from different breeds in a randomized experimental design, weighing 472.67±90.48 kg and aging 10±5.4 years, this study was aimed to evaluate the effects of supplementation with rice bran oil containing 1.1% of gamma-oryzanol in plasmatic lipids levels (total cholesterol, HDL-C, LDL-C, VLDL-C and triglycerides), testosterone and sperm quality. Stallions were divided in two groups, one receiving 150 mL of soybean oil, and the other 150 mL of rice bran oil twice a day, during 60 days. Blood and sperm samples were collected every 15 days of the trial period. Data obtained was processed, and means compared using F test, at 5% of confidence level. Mean values of total cholesterol, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglycerides and testosterone were respectively 92.73; 61.47; 26.99; 4.28 mg/dL and 75.93 ng/dL in the soybean oil supplemented group, and 110.20; 66.73; 38.44; 5.02 mg/dL and 62.13 ng/dL in the rice bran oil one. No difference among treatments ($p<0,05$) were observed in sperm quality parameters volume, motility, concentration and defects. Supplementation of stallions with rice bran oil containing 1.1% of gamma-oryzanol do not promote any change in sperm quality, testosterone, HDL-C, VLDL-C or triglycerides plasmatic levels, but an increase in total cholesterol and LDL-C.

Keywords: Cholesterol. Equines. Nutrition. Testosterone.

Correspondência para:

Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso
Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ – USP
Avenida Duque de Caxias Norte, 225. Jd. Elite
CEP 13630-000 – Pirassununga, SP

E-mail: cateto@usp.br

Recebido: 06/06/2011

Aprovado: 27/06/2012

Introdução

É crescente o desenvolvimento de novos produtos, que vão desde materiais para a prática esportiva até insumos alimentícios. São diferentes tipos de alimentos, com variados níveis de energia, proteína, aceitabilidade, concentrados específicos para animais convalescentes, aperitivos, assim como diferentes suplementos, principalmente os energéticos. Dentre esses novos suplementos, encontra-se em expansão o uso do óleo de arroz, que naturalmente contém gama-orizanol, substância extensivamente estudada na medicina humana devido às suas propriedades benéficas à saúde, tais como, redução do colesterol plasmático, inibição da agregação plaquetária, redução na biossíntese do colesterol hepático, redução da absorção do colesterol, aumento da excreção fecal de ácidos biliares, sendo utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, assim como aditivo de alimentos, devido às suas propriedades antioxidativas¹.

Nos últimos anos, clínicos e cientistas têm ampliado seus conhecimentos sobre a importância do estresse oxidativo no sêmen. Estudos recentes^{2,3,4} indicaram que o desbalanço na produção ou degradação das espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocasionar sérios efeitos adversos no sêmen. As EROs podem ser geradas durante o metabolismo oxidativo e o aumento da geração das mesmas também têm sido atribuído ao sêmen danificado e anormal. A exposição dos espermatozoides às EROs têm sido relacionadas à depleção intracelular de adenosina trifosfato (ATP), resultando em perda da motilidade⁵. O gama-orizanol, componente do óleo de arroz, apresenta capacidade antioxidante e pode prevenir a oxidação proteica e a peroxidação lipídica^{6,7}. Ieiri et al.⁸ verificaram que a administração subcutânea de gama-orizanol em ratos elevou significativamente a liberação de norepinefrina pelo núcleo hipotalâmico central, sugerindo que este componente do óleo de arroz pode afetar a síntese e/ou a liberação de pelo menos dois neurotransmisso-

res hipotalâmicos, a dopamina e a norepinefrina, resultando em alterações na síntese e/ou liberação dos hormônios da hipófise anterior.

Os dados disponíveis sobre os efeitos da utilização de gama-orizanol em equinos^{9,10} são poucos e não conclusivos. O presente estudo teve como objetivos verificar os efeitos da suplementação com óleo de arroz, semi-refinado com alto teor de gama-orizanol, na dieta de garanhões sobre os níveis de testosterona e lipídeos plasmáticos, além da qualidade espermática.

Material e Método

Todos os procedimentos experimentais realizados nos animais deste estudo foram analisados e aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Local: O experimento foi realizado nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As análises de testosterona e de lipídeos plasmáticos foram realizadas em laboratório particular situado no município de Pirassununga/SP.

Animais: Foram utilizados seis garanhões, mestiços, com idade de 10±5,4 anos e peso inicial de 472,67±90,48 kg, alojados em baias individuais de alvenaria, com área de 12 m². Para evitar os efeitos causados pelo estresse do confinamento, estes garanhões foram soltos para a realização de exercícios pelo menos três vezes por semana em piquetes individuais, medindo 15 m².

Tratamentos: As dietas foram formuladas para atender às exigências de manutenção dos animais, cujos ingredientes foram feno de Tifton 85, e concentrado à base de milho moído, farelos de soja, trigo, arroz e germen de milho, além de premix vitamínico e mineral. Foi adotado o consumo diário individual de 2% do peso vivo em matéria seca, sendo 40% concentrado e 60% volumoso, fornecidos em comedouros separados, além de sal mineralizado e água *ad libitum*, seguindo as recomendações estabelecidas no *Nutrient*

*Requeriments of Horses*¹¹ para equinos nesta categoria nutricional. Foram utilizados óleo de soja comercial e óleo de arroz (semi-refinado através de processo físico) contendo 1,1% de gama-orizanol (Gama-Horse®).

Protocolo experimental: Os animais foram divididos em dois grupos: (A) grupo controle suplementado com 300 mL de óleo de soja por dia; e (B) grupo tratamento, suplementado com 300 mL de óleo de arroz por dia. O óleo de ambos foi adicionado ao concentrado no comedouro, na quantidade de 150 mL por refeição. O concentrado foi fornecido às 07h00min e 17h00min, e o feno às 09h00min e 16h00min.

Amostragem: Para análise da qualidade espermática, foram realizadas colheitas de sêmen a cada 15 dias, durante o período experimental de 60 dias, completando cinco momentos de amostragem a partir do dia zero. Previamente à colheita, foi realizada higienização do pênis com algodão umedecido em água a uma temperatura média de 33°C. Utilizou-se vagina artificial modelo Missouri, com temperatura interna de 42°C, e de “égua-manequim” devidamente contida e em estro. Após a colheita, o sêmen foi encaminhado imediatamente para o laboratório, sendo efetuada a filtração para separação da fração gelatinosa, mensuração do volume, cálculo da concentração espermática, avaliação da motilidade total e separação de amostra em formol salino tamponado para avaliação posterior das características morfológicas.

Para análise de testosterona e lipídeos plasmáticos foram colhidas amostras sanguíneas a cada 15 dias, nas mesmas datas de colheita seminal, sempre às 07h00min, antes da refeição matutina. As colheitas foram realizadas através de punção da veia jugular, em tubo com sistema de vácuo (Vacutainer, B-D), sem anticoagulante, com capacidade para 10 mL, sendo encaminhadas ao laboratório no prazo máximo de 30 minutos.

Análises Laboratoriais: O volume espermático foi determinado pela leitura direta em proveta de 150 mL, pré-aquecida a 37°C. A motilidade total foi ava-

liada em gota de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) sob microscopia óptica em aumento de 100x e medida pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento. A concentração espermática foi determinada em milhões de espermatozoides por mililitro ($\times 10^6$ eptz/mL), com auxílio de câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum com aumento de 400x. Para a leitura, o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, em formol salino tamponado. As características morfológicas dos espermatozoides foram avaliadas pela técnica da câmara úmida. Para tanto, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido a 37°C. Uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, preparada, e a avaliação foi realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1.000x sob microscopia de contraste de interferência diferencial. As anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores.

A análise de testosterona plasmática foi realizada através da técnica de radioimunoensaio descrita por Lox, Christian, e Heine¹². Para avaliação das concentrações de colesterol total, HDL-C e triglicérides, foi utilizado o método colorimétrico-enzimático¹³. O LDL-C e VLDL-C foram calculados, respectivamente, pelas fórmulas [(colesterol-HDLcolesterol)-(triglicérides/5)] e triglicérides/5.

Delineamento experimental: Foi aplicado o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos, com três repetições por tratamento, e medidas repetidas no tempo.

Análise estatística: Os valores plasmáticos de lipídeos e testosterona, assim como os dados de volume, motilidade e concentração espermática, defeitos maiores, menores e totais, foram submetidos à análise de variância do programa estatístico *Statistical Analysis System*¹⁴ através dos procedimentos mistos, e as médias comparadas pelo teste F. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Todo o concentrado fornecido foi consumido, dentro de aproximadamente uma hora, sendo bem aceito pelos animais, não havendo sobras. Não foi observada modificação na consistência das fezes nem distúrbios gastrintestinais durante o período experimental.

Como não foi observada diferença para efeito de tratamento entre nenhum dos tempos de colheita amostral, para nenhuma das variáveis estudadas (lipídeos plasmáticos, testosterona ou parâmetros de qualidade espermática), comparamos a média geral de cada tratamento.

Os valores plasmáticos médios de lipídeos e testosterona, o desvio-padrão (DP) e a probabilidade estatística (P) estão apresentados na tabela 1.

Os valores médios dos tratamentos para volume, motilidade, concentração, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais estão apresentados na tabela 2.

Discussão

Não foi observado efeito de tratamento nem de tempo, ou interação tempo-tratamento para os valores séricos de triglicérides, que estão de acordo

Tabela 1 – Valores plasmáticos médios de testosterona (ng/mL) e lipídeos plasmáticos (mg/dL), desvio-padrão (DP) (%) e probabilidade estatística (P) para os tratamentos com óleo de soja e óleo de arroz

Variável	Tratamento		DP	P
	Óleo de Soja	Óleo de Arroz		
Colesterol Total	92,73	110,20	15,28	0,02*
HDL-C	61,47	66,73	5,74	0,06
LDL-C	26,99	38,44	10,38	0,03*
VLDL-C	4,28	5,02	1,35	0,22
Triglicérides	21,40	25,13	6,74	0,22
Testosterona	75,93	62,13	37,23	0,31

HDL-C – fração colesterol na lipoproteína de alta densidade
 LDL-C – fração colesterol na lipoproteína de baixa densidade
 VLDL-C – fração colesterol na lipoproteína de muito baixa densidade

Tabela 2 – Valores médios das características seminais, desvio-padrão (%) e probabilidade estatística (P) para os tratamentos com óleo de soja e óleo de arroz

Variável	Tratamento		DP	P
	Óleo de Soja	Óleo de Arroz		
Volume (mL)	71,87	78,67	32,12	0,56
Motilidade (%)	69,00	70,67	11,71	0,73
Concentração (x 10 ⁶ eptz/mL)	123,00	115,67	54,44	0,74
Defeitos Maiores (%)	17,73	17,96	12,35	0,97
Defeitos Menores (%)	4,60	6,03	2,54	0,21
Defeitos Totais (%)	22,33	22,63	13,59	0,96

com aqueles encontrados por Bruss¹⁵ para a espécie equina, variando de 4 a 44 mg/dL. Verificou-se aumento dos valores médios de colesterol total, HDL-C, LDL-C e VLDL-C para o tratamento com óleo de arroz em relação ao óleo de soja. Porém, somente foi observada diferença ($p < 0,05$) para os valores médios de colesterol total e de LDL-C, concordando com Frank et al.⁹ que observaram aumento do colesterol total e do LDL-C em dietas suplementadas com óleo de arroz bruto, oferecidas para éguas, após cinco semanas de adaptação. Discordam destes resultados, pesquisas realizadas com humanos¹⁶ e ratos¹⁷, em que foram verificadas redução dos níveis de colesterol total, triglicérides e de LDL-C associada ao uso do óleo de arroz e gama-orizanol.

No tratamento com óleo da soja, o valor médio de testosterona plasmática foi de $75,93 \pm 8,71$ ng/mL, enquanto no tratamento com óleo de arroz foi de $62,13 \pm 7,88$ ng/mL, não havendo diferença entre os tratamentos, nem em relação ao tempo ou interação tempo-tratamento. Foi observado elevado desvio-padrão para testosterona plasmática entre os tratamentos, o que pode ter ocorrido devido às conhecidas variações sazonais do referido hormônio¹⁸. Ainda assim, os valores obtidos concordam com aqueles encontrados por Almeida¹⁹, de 32,00 ng/mL a 78,53 ng/mL, que segundo este autor está dentro da amplitude da variação reportada pela literatura internacional. Concorda também com resultados¹⁰ em que a suplementação de garanhões com óleo de arroz também não demonstrou diferença nos níveis plasmáticos de testosterona. Em humanos, Fry et al.²⁰ não encontraram diferenças na concentração plasmática de testosterona em fisiculturistas suplementados com gama-orizanol.

Em relação aos valores médios de volume espermático e da concentração espermática, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos, nem em relação ao tempo ou interação tempo-tratamento. Foi observado elevado desvio-padrão des-

tas variáveis, coincidindo com achados de Papa²¹, o qual afirma que assim como os demais parâmetros do ejaculado equino, a concentração espermática apresenta grandes variações. Diversos fatores estão relacionados a variações no volume espermático, entre eles, raça, particularidades individuais, tempo após última cobertura, idade, tempo de repouso sexual, época do ano, alimentação, manejo, etc²². Arlas et al.¹⁰ também não encontraram diferença para o volume espermático, ao contrário do observado em relação à concentração espermática, onde obtiveram aumento significativo. Os valores médios encontrados para motilidade espermática foram semelhantes entre os tratamentos, embora Arlas et al.¹⁰ tenham obtido significativo aumento na motilidade espermática de garanhões suplementados com óleo de arroz durante 80 dias, quando comparados a garanhões sem suplementação de gordura na dieta, obtendo média de 59% de motilidade.

Os valores médios encontrados para defeitos totais concordam com Hafez e Hafez²², que relatam que o ejaculado deve possuir entre 60 – 90% de espermatozoides morfolologicamente normais. Não foi observada diferença entre os tratamentos, nem em relação ao tempo, ou interação tempo-tratamento. Durante a suplementação com óleo de arroz durante 80 dias¹⁴ foi obtida melhora significativa da percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais dos animais experimentais, embora tenha ocorrido aumento na percentagem de defeitos maiores. Papa²¹ descreve em sua revisão, que os fatores que podem influenciar a presença de patologias espermáticas podem estar ligados desde a espermatogênese até o armazenamento e posterior ejaculação do sêmen, excessiva utilização do garanhão, aumento de temperatura epididimária, perda da termoregulação testicular, além de fatores individuais ligados à idade do reprodutor.

Os resultados deste trabalho foram observados durante um único ciclo espermático (cuja duração

é de aproximadamente 60 dias), o que nos leva a acreditar que poderia ser observada alguma diferença entre os tratamentos caso o período de suplementação fosse mais prolongado.

Conclusões

A suplementação da dieta de garanhões com óleo de arroz semi-refinado, com alto teor de gama-oryzanol, não afeta a qualidade espermática ou as

concentrações plasmáticas de testosterona, VLDL-C, HDL-C e triglicérides, porém pode alterar as concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL-C.

São necessárias novas pesquisas com a utilização do gama-oryzanol em equinos, haja vista a reduzida quantidade de material científico publicado sobre o assunto, com a finalidade de se estabelecer os efeitos de sua utilização nesta espécie.

Referências

- JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 299, n. 1/2, p. 146-154, 2005.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MORIEL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BALL, B. A.; VO, A.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- BALL, B. A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2, p. 299-300, 2002.
- PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; MÁRQUEZ, J. C.; ANGELES MEGIAS, M.; COLLANTES DE TERAN, L.; ABSI, E.; BAUTISTA, J. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. *European Journal of Nutrition*, v. 42, p. 307-314, 2003.
- REVILLA, E.; MARIA, C. S.; MIRAMONTES, E.; BAUTISTA, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A.; CREMADES, O.; CERT, R.; PARRADO, J. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Research International*, v. 42, n. 3, p. 387-393, 2009.
- IEIRI, T.; KASE, N.; HASHIGAMI, Y.; KOBORI, H.; NAKAMURA, T.; SHIMODA, S. Effects of gamma-oryzanol on the hypothalamo-pituitary axis in the rat. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, v. 20, n. 58, p. 1350-1356, 1982.
- FRANK, N.; ANDREWS, F. M.; ELLIOTT, S. B.; LEW, J.; BOSTON, R. C. Effects of rice bran oil on plasma lipid concentrations, lipoprotein composition, and glucose dynamics in mares. *Journal of Animal Science*, v. 83, n. 11, p. 2509-2518, 2005.
- ARLAS, T. R.; PEDERZOLLI, C. D.; TERRACIANO, P. B.; TREIN, C. R.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; CASTRO, F. S.; MATTOS, R. C. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3-4, p. 206, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NCR. **Nutrient requirements of horses**. 6. ed. rev. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007. 341 p.
- LOX, C. D.; CHRISTIAN, C. D.; HEINE, M. W. A simple radioimmunoassay for testosterone. *American of Obstetrics and Gynecology*, v. 118, n. 1, p. 114-118, 1974.
- LOWRY, G. F. Special unit and medical school laboratory technicians in New Zealand. A follow-up review and survey of training and qualifications 1970-1975. *New Zealand Medicine Journal*, v. 12, n. 5, p.579, 1977.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: user's guide: statistics**. Version 8. Cary: SAS Institute Inc., 2000.
- BRUSS, M. L. Lipids and ketones. In: KANEKO, J. J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic Press, 1980. p. 83-95.
- MOST, M. M.; TULLEY, R.; MORALES, S.; LEFEVRE, M. Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, n. 1, p. 64-68, 2005.
- MINHAJUDDIN, M.; BEG, Z. H.; IQBAL, I. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, n. 5, p. 747-753, 2005.
- BOYD, A.; POZOR, M. A.; BAILEY, C. S.; VERSTEGEN, J. Effect of seasonality on testicular blood flow in mature stallions. *Animal Reproduction Science*, v. 94, n. 114, p. 144-145, 2006. N. Especial
- ALMEIDA, H. B. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen equino resfriado**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- FRY, A. C.; BONNER, E.; LEWIS, D. L.; JOHNSON, R. L.; STONE, M. H.; KRAEMER, W. J. The effects of gamma-oryzanol supplementation during resistance exercise training. *International Journal of Sport Nutrition*, v. 7, n. 4, p. 318-329, 1997.
- PAPA, F. O. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. 1987. 150 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1987.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.