

Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano

Oxidative and functional status of bovine semen cryopreserved in different seasons

Mariana de Paula RODRIGUES¹; Octávio Fabián Bao TARRAGÓ¹; Rubens Paes de ARRUDA¹; Leticia Zoccolaro OLIVEIRA¹; Ricardo Pimenta BERTOLLA²; Marcilio NICHI¹; Valquiria Hyppolito BARNABE¹

¹ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo – SP, Brasil

² Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Cirurgia, Divisão de Urologia, Setor de Reprodução Humana, São Paulo – SP, Brasil

Resumo

Bovinos taurinos, em clima tropical, mostram menores índices de fertilidade devido ao estresse térmico e oxidativo testicular. Essa alta incidência de alterações espermáticas é potencializada pela grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes nos espermatozoides taurinos. Embora os PUFA aumentem a sensibilidade celular à peroxidação lipídica, são essenciais para a maleabilidade de membrana e promovem maior proteção celular durante a criopreservação. Devido aos relatos de que animais e vegetais de clima frio possuem maior concentração de PUFA nas células, o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito da estação do ano sobre a qualidade espermática de taurinos e zebuínos. Foram avaliadas amostras criopreservadas de 10 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e 10 da raça Simental (*Bos taurus taurus*), coletadas durante inverno e verão. Após a descongelação, foram realizados testes espermáticos de motilidade e vigor, testes de integridade de membrana plasmática (MPI–Eosina/Nigrosina), integridade acrossomal (MAI-POPE), grau de fragmentação de DNA (DNAf-Ensaio Cometa) e atividade citoquímica mitocondrial (ACM-DAB). Adicionalmente, avaliou-se a suscetibilidade das células espermáticas à peroxidação lipídica induzida, pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e malondialdeído (MDA). No grupo Nelore, foi observada maior motilidade espermática pós-descongelação (26,50% inverno; 13,30% verão) e maior ACM (22,34% inverno; 13,30% verão) durante o inverno. No grupo Simental, não houve diferença de época do ano nas variáveis. Concluiu-se que, apesar de sofrerem maior estresse térmico, nos animais taurinos não foi observado efeito da estação do ano sobre a qualidade espermática, o que pode estar relacionado a uma maior concentração de PUFA em sua composição seminal.

Palavras-chave: Bovino. Estação do ano. Estresse térmico. Estresse oxidativo. Ácidos graxos poli-insaturados.

Abstract

In general, Taurus bulls under tropical conditions demonstrate reduced fertility due to heat and oxidative stress on testicular tissue. This high incidence of sperm damage is generally enhanced by the large amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) naturally present in bull sperm. Despite PUFA increase cellular sensitivity to lipid peroxidation, they are essential for membrane fluidity and also promote high cellular protection during cryopreservation process. Some reports related that animals and plants provided from cold weather present higher cellular concentration of PUFA, so the present study aims to compare the effect of the season on sperm quality of Taurus and Zebu bulls. Cryoprotected semen samples of 10 Nelore (*Bos taurus indicus*) and 10 Simmental (*Bos taurus taurus*) bulls were analyzed during winter and summer seasons. After freezing-thawing process, semen samples were submitted to sperm motility and vigor analysis, to tests of plasma membrane integrity (MPI–Eosin/Nigrosin), acrosomal integrity (MAI-POPE), DNA fragmentation degree (DNAf-Comet Assay) and high mitochondrial activity (ACM-DAB). Moreover, frozen-thawed semen samples were induced to lipid peroxidation for measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and malondialdehyde (MDA) concentration. Higher post-thawing sperm motility (26.50% winter; 13.30% summer) and ACM (22.34% winter; 13.30% summer) were observed during the winter in Nelore group. In Simmental group, no differences were observed for the studied variables. It was concluded that, despite the heat stress, no seasonal effect on sperm quality was observed in Taurus cattle, which may be related to higher concentration of PUFA in seminal composition.

Keywords: Bovine. Season. Thermal stress. Oxidative stress. Polyunsaturated fatty acids.

Correspondência para:

Mariana de Paula Rodrigues
 Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
 Departamento de Reprodução Animal
 Avenida Duque de Caxias Norte, 225
 CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil
 e-mail: maripr@usp.br

Recebido: 03/02/2014

Aprovado: 13/04/2015

Introdução

Os bovinos de origem europeia (taurinos), quando criados em clima tropical, passam a mostrar menores índices de fertilidade em comparação aos animais de origem indiana (zebuínos). Esse prejuízo pode ser atribuído ao estresse térmico sofrido por esses animais, não somente por possuírem reduzida capacidade de termorregulação testicular, mas também por apresentarem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) na membrana plasmática do espermatozoide, tornando-os mais susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) (IWA-SAKI; GAGNON, 1992; HANSEN, 2004).

Existem evidências de que vegetais e animais com origem em locais de clima frio possuam maior quantidade de ácido graxo poli-insaturado em seu organismo, aumentando a fluidez da membrana celular, além disso, foi demonstrado que a concentração de PUFA em amostras seminais de touros variou de acordo com a estação do ano, sendo maior durante o inverno e menor durante o verão (STUBBS; SMITH, 1984; UEMURA; STEPONKUS, 1997; ARGOV et al., 2007).

Se por um lado os PUFA tornam a amostra seminal mais suscetível ao ataque das espécies reativas de oxigênio, por outro, são importantes moléculas que servem como fonte de energia e atuam na estrutura física das células espermáticas, exercendo papéis fundamentais tanto em sua funcionalidade, como também na proteção celular durante o processo de criopreservação (CONNOR et al., 1998).

Visto que a manutenção de uma satisfatória qualidade seminal pós-descongelamento é estratégica para a disseminação de material genético, julga-se razoável

considerar que a capacidade de congelabilidade do sêmen está diretamente relacionada com a qualidade espermática e composição lipídica seminal. Portanto, sabendo que animais de clima frio apresentam maior concentração de ácido graxo poli-insaturado em seu organismo, além da variação de sua concentração nas diferentes estações do ano, o objetivo do presente experimento foi comparar, entre taurinos e zebuínos, o efeito da estação do ano sobre a qualidade de amostras seminais criopreservadas, pela avaliação funcional e perfil oxidativo das células espermáticas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em propriedade rural na região central do Brasil (Dourados, MS – Brasil, 22° latitude sul e 54° longitude oeste), em uma altitude de 458 metros em relação ao nível do mar, apresentando clima tropical quente e úmido. Durante o período de experimentação a temperatura mínima foi de 10°C e a máxima foi de 35°C, umidade relativa do ar com média de 80% e precipitação pluviométrica com menor incidência no inverno.

Foram utilizados 10 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus* – zebuínos) e 10 touros da raça Simental (*Bos taurus taurus* – taurinos), com idades entre 3 e 4 anos. Os animais do presente experimento são utilizados no sistema de monta natural da propriedade e, portanto, não são selecionados para criopreservação espermática.

As amostras foram colhidas pelo método de eletroejaculação em dois períodos do ano: meados do inverno (temperatura máxima de 26°C, temperatura mínima de 10°C e índice pluviométrico médio de 10 mm) e meados do verão (temperatura máxima de 35°C, temperatura mínima de 19°C e índice pluviométrico médio de 50 mm). Foi utilizado um ejaculado (uma partida seminal) de cada touro, sendo 10 partidas colhidas e criopreservadas durante o inverno e 10 partidas colhidas e criopreservadas durante o verão, para cada raça estudada.

Após a colheita de sêmen, as amostras espermáticas foram diluídas em diluidor TRIS-gema para ob-

ter concentração final de 40×10^6 espermatozoides/mL, sendo refrigeradas durante 2 horas em curva de resfriamento de $-0,55^\circ\text{C}/\text{minuto}$ e congeladas durante 15 minutos em uma curva de congelação de $-20^\circ\text{C}/\text{minuto}$.

Para análise das amostras criopreservadas, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C , por 30 segundos. Os testes convencionais utilizados neste experimento foram motilidade e vigor espermáticos. Para tais, uma gota de sêmen foi disposta entre lâmina e lamínula e observada em microscopia de luz transmitida, com aumento de 100 vezes (Axiostar Plus® - Carl Zeiss - Alemanha). A motilidade foi classificada em uma escala entre 0 e 100%, e o vigor em uma escala de 0 a 5.

Para avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina segundo Barth e Oko (1989), e para a avaliação da integridade de acrossomo foi utilizada a técnica da Coloração Fast Green/Rosa Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Em cada um dos testes, separadamente, uma gota de sêmen e corante (5 μL , 1:1) foram mescladas e realizados esfregaços em lâmina de microscopia. Essas foram analisadas em microscópio de luz transmitida (Axiostar Plus® - Carl Zeiss - Alemanha) em aumento de 1000x. Foram contadas 200 células, considerando a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI), aquelas que não foram coradas pela tintura e porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (MAI), ou seja, apenas as células que apresentaram acrossomo corado.

Para a realização do teste de atividade mitocondrial, uma alíquota de 30 μL de amostra foi incubada com 30 μL do corante 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 1 mg/mL de PBS), a 37°C , por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de microscopia e foram observadas em contraste de fase, em aumento de 1000x (Axiostar Plus® - Carl Zeiss - Alemanha). Foram contados 200 espermatozoides e classificados de acordo com a coloração da peça intermediária. Ao final, foram consideradas para este estudo apenas as células com

alta atividade citoquímica mitocondrial (ACM; 100% das mitocôndrias ativas) (HRUDKA, 1987).

Para avaliar a integridade do DNA espermático realizou-se a técnica de eletroforese de célula única em gel de agarose ou Ensaio Cometa Alcalino (EC), adaptado de Donnelly, McClure e Lewis (2000). Tal técnica é capaz de detectar quebras em fita simples de DNA em sítios álcali sensíveis. Para a realização desta análise, uma alíquota da amostra foi diluída em gel de agarose a fim de obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL essa mistura foi dispersa sobre lâmina de microscopia que foi recoberta com solução de lise I (proteínase K 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 2,5 M NaCl, água, pH 11,0) e incubadas, durante uma hora a 55°C . Em seguida, foram cobertas com solução de lise II (100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 2,5M NaCl, pH 11,0, 40 mM dithiothreitol, 2% Triton X-100) por 2 horas a 4°C . Foi então realizada a eletroforese por 20 minutos a 1,5 V/cm e 270 mA. Por fim, foram coradas com Brometo de Etídeo e avaliadas em microscópio de epifluorescência (G-2A, Nikon, Japão), em aumento de 400x. Ao final da análise, foram consideradas para este estudo apenas as células com alto grau de fragmentação de DNA (DNAf).

A avaliação do perfil oxidativo foi baseada na metodologia descrita por Ohkawa, Ohish e Yagi (1979). Essa técnica se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos. Para tal, foi utilizado um sistema gerador de ROS com posterior mensuração do nível de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentração de MDA.

Para a realização da análise, foi adicionado 100 μL de sulfato de ferro (4 mM) e 100 μL de ascorbato de sódio (20 mM) a uma alíquota de 400 μL de sêmen, ficando incubado a 37°C por 90 minutos. Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA; 10%) e centrifugado a $19.700 \times g$ por 10 min (4°C). Após a centrifugação, 1 mL de sobrenadante foi misturado a 1 mL ácido tiobarbitúrico. Essa mistura foi aquecida a 100°C

durante 15 min, e imediatamente resfriada (0°C). As TBARS e o MDA foram quantificados em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 532 nm.

Todos os reagentes químicos usados nesses ensaios foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Os dados foram avaliados pelo programa SAS System (2001). Os efeitos das estações do ano e raças (Nelore Verão, Nelore Inverno, Simental Verão e Simental Inverno) foram determinados usando testes paramétricos (PROC GLM) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Nível de TBARS foi transformado em log. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$ e os resultados foram expressos em média (\pm erro-padrão).

Resultados

Os resultados do presente trabalho são apresentados na tabela 1. Com relação a variável motilidade, é possível verificar que, entre os animais da raça Nelore, maior motilidade espermática foi observada durante o inverno comparado ao verão. Os animais da raça Simental não apresentaram diferença de motilidade no verão e inverno. Comparando as raças, não foi observada diferença significativa para motilidade. Com relação a variável vigor, não foi observada diferença entre nenhum dos grupos estudados.

As integridades das membranas, plasmática e acrossomal, não foram afetadas pela estação do ano em nenhuma das raças avaliadas. Além disso, pôde-se verificar que a porcentagem de células com DNA fragmentado e as concentrações de TBARS e MDA nas amostras seminais tampouco sofreram alteração de acordo com a estação do ano ou raça estudadas.

Por outro lado, a atividade citoquímica mitocondrial sofreu efeito tanto da estação do ano quanto da raça. Nas amostras seminais de touros da raça Nelore, houve maior atividade citoquímica mitocondrial durante o inverno em comparação com o verão ($p = 0,04$). Adicionalmente, nas amostras colhidas e criopreservadas durante o inverno, foi verificada maior atividade mitocondrial dentro do grupo Nelore em comparação com o grupo Simental ($p = 0,02$).

Discussão

A partir dos resultados obtidos, foi verificado que a motilidade espermática dos touros da raça Nelore sofreu influência negativa das altas temperaturas do verão, bem como sua atividade citoquímica mitocondrial. Alguns autores associam os efeitos da diminuição da motilidade e redução da qualidade espermática ao maior estresse oxidativo sofrido pelas células durante o período de exposição às altas temperaturas ambientais em estações quentes como o verão (GUN-

Tabela 1 – Características de amostras seminais criopreservadas [média \pm erro-padrão], durante inverno e verão, de touros das raças Nelore e Simental criados em clima tropical. Motilidade, vigor, membrana plasmática íntegra (MPI), membrana acrossomal íntegra (MAI), alta atividade citoquímica mitocondrial (ACM), alta fragmentação de DNA (DNAf), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentração de malondialdeído (MDA) – Dourados, MS – Brasil

Características	Nelore (verão)	Nelore (inverno)	Simental (verão)	Simental (inverno)
Motilidade (%)	13,30 \pm 3,86 ^b	26,50 \pm 4,72 ^a	18,8 \pm 4,15	18,5 \pm 4,89
Vigor (0-5)	2,40 \pm 0,30	2,80 \pm 0,20	3,10 \pm 0,18	2,60 \pm 0,16
MPI (%)	18,95 \pm 4,64	20,55 \pm 3,7	22,75 \pm 2,73	15,00 \pm 3,00
MAI (%)	69,90 \pm 4,83	68,65 \pm 3,80	67,95 \pm 5,21	65,05 \pm 5,85
ACM (%)	13,30 \pm 2,51 ^b	22,34 \pm 3,62 ^{A,a}	11,20 \pm 2,40	11,60 \pm 2,92 ^B
DNAf (%)	5,75 \pm 2,71	4,05 \pm 1,19	2,90 \pm 0,71	4,20 \pm 1,26
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	1045,70 \pm 358,84	1352,21 \pm 319,93	611,11 \pm 330,05	860,77 \pm 285,48
MDA	122,26 \pm 32,72	227,71 \pm 61,13	116,33 \pm 40,25	137,85 \pm 30,19

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre estações do ano, dentro da mesma raça ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre raças, dentro da mesma estação do ano ($p < 0,05$)

DOGAN; ELITOK, 2004; NICHI et al., 2006). No entanto, no presente experimento, ao ser verificado que tanto o nível de TBARS quanto o nível de MDA das amostras seminais se mantiveram semelhantes durante ambas as estações do ano, foi concluído que tais diminuições da motilidade espermática e da atividade citoquímica mitocondrial não ocorreram devido ao estresse oxidativo.

Apesar de os ácidos graxos poli-insaturados, presentes na membrana da célula espermática, serem os mais responsabilizados por esse estresse oxidativo sofrido, os PUFA são moléculas essenciais tanto para funções espermáticas quanto para sua proteção durante o processo de criopreservação (SURAI et al., 2000). Connor et al. (1998) observaram que 99% do ácido docosahexaenoico (DHA) presente no espermatozoide de primatas localiza-se no flagelo celular, esses autores concluíram que a presença de alta concentração de PUFA no flagelo melhora a motilidade do espermatozoide. Ainda, a maior concentração de DHA em sêmen suíno, seja naturalmente ou adicionado ao diluidor, foi relacionada à melhor qualidade seminal (AM-IN et al., 2011).

Quando ácidos graxos poli-insaturados foram adicionados ao diluidor seminal de bovinos que não apresentavam boa congelabilidade espermática, constatou-se melhora na motilidade após a criopreservação, inferindo que os PUFA melhoraram a maleabilidade da membrana plasmática e protegeram as células contra os danos causados pela criopreservação (TAKAHASHI et al., 2012). Portanto, se por um lado já foi constatada a grande sensibilidade da membrana plasmática às baixas temperaturas da criopreservação, por outro, sabe-se que a composição lipídica celular influencia suas propriedades físicas. A maior flexibilidade da membrana celular devido à alta concentração de DHA garante maior resistência contra o choque frio durante o processo de criopreservação e melhora na motilidade (KIM et al., 2001). Foi demonstrado ainda que a suplementação de ácido graxo poli-insaturado foi responsável pelo efeito benéfico na

qualidade espermática sobre o sêmen criopreservado em relação ao sêmen *in natura*, comprovando a teoria de que os PUFA exercem efeito protetor sobre o espermatozoide durante o processo de criopreservação (TAKAHASHI et al., 2012).

Por sua vez, foi demonstrado que a estação do ano influenciou a composição lipídica de amostras seminais de bovinos, segundo Argov et al. (2007) estas amostras apresentaram diminuição na concentração lipídica durante o verão. Nesse sentido, também foi verificado em sêmen ovino aumento na concentração de lipídeos totais durante o inverno, relacionando-se com a melhora na qualidade espermática através do aumento da motilidade (GUNDOGAN; ELITOK, 2004). Dessa maneira, a maior motilidade espermática e atividade citoquímica mitocondrial observada, no presente experimento, durante o inverno no grupo dos touros zebuínos, podem ser atribuídas ao aumento da concentração de ácidos graxos poli-insaturados no sêmen durante o inverno, e, conseqüentemente, maior fluidez celular, fator este que não influenciaria as demais características estudadas.

No entanto, ao serem analisadas as amostras seminais criopreservadas do grupo de touros da raça Simental, e comparar as características espermáticas encontradas durante inverno e verão, foi observada semelhança em todas as variáveis estudadas, incluindo motilidade e atividade citoquímica mitocondrial. Em concordância com o presente experimento, em um estudo realizado na Flórida (Estados Unidos), touros zebuínos e taurinos foram submetidos a coletas de sêmen no verão e inverno. Os touros de origem europeia não apresentaram diferenças na porcentagem de espermatozoides móveis entre inverno e verão, enquanto os touros zebuínos apresentaram menor porcentagem de espermatozoides móveis no verão em relação ao inverno (FIELDS; BURNS; WARNICK, 1979).

Rodrigues et al. (2008) compararam o nível de TBARS que ocorre naturalmente no sêmen *in natura* e o nível de TBARS induzido por um sistema gerador de ROS, em amostras espermáticas criopreservadas.

Tais amostras foram colhidas de animais taurinos e zebuínos durante o verão. No sêmen in natura, o nível de peroxidação lipídica foi maior nos touros taurinos, enquanto nas mesmas amostras, quando criopreservadas, o nível de TBARS foi maior nos animais zebuínos, esses autores concluíram que animais taurinos possuem maior resistência à criopreservação celular que os animais zebuínos, provavelmente devido à maior concentração de PUFA em suas amostras espermáticas. O mesmo foi demonstrado com embriões bovinos, em que foi verificado maior sobrevivência após a criopreservação e maior concentração de lipídeos intracelulares em embriões de animais taurinos do que animais zebuínos (VISINTIN et al., 2002).

Segundo alguns autores, vegetais e animais provenientes de clima temperado possuem maior concentração de ácido graxo poli-insaturado em suas células (STUBBS; SMITH, 1984; UEMURA; STEPONKUS, 1997), ainda neste sentido, Gladyshev et al. (2011) afirmaram que 84% da variabilidade de PUFA pode

ser explicada pela temperatura, enquanto outros fatores são responsáveis por apenas 16% da variabilidade de PUFA do organismo. Assim sendo, o fato de os animais *Bos taurus taurus* terem sido selecionados na Europa sob um clima temperado, pode ter determinado maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados nas células espermáticas em comparação aos *Bos taurus indicus*, o que refletiria em maior estresse oxidativo em altas temperaturas no sêmen in natura, porém em menores variações na qualidade espermática durante verão e inverno, após a criopreservação.

Em conclusão, a qualidade espermática de amostras seminais criopreservadas de touros taurinos não sofreu variações de acordo com a estação climática. Esse efeito, aparentemente, estaria relacionado à maior concentração natural de ácidos graxos poli-insaturados presente no sêmen desses animais de origem Europeia, sofrendo menor influência do inverno sobre essa concentração.

Referências

- AM-IN, N.; KIRKWOOD, R. N.; TECHAKUMPHU, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 897-903, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10005601>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.032>.
- ARGOV, N.; SKLAN, D.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 878-885, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06005851>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.018>.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989. 285 p.
- CONNOR, W.; LIN, D. S.; WOLF, D. P.; ALEXANDER, M. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of Lipid Research**, v. 39, p. 1404-1411, 1998. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/39/7/1404.full>>. Acesso em: 7 maio 2015.
- DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v. 15, n. 1, p. 61-68, 2000. Disponível em: <<http://mutage.oxfordjournals.org/content/15/1/61>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/15.1.61>.
- FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season, and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/48/6/JAN0480061299?access=0&view=pdf>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.2134/jas1979.4861299x>.
- GLADYSHEV, M.; SEMENCHENKO, V.; DUBOVSKAYA, O.; FEFILOVA, E. B.; MAKHUTOVA, O. N.; BUSEVA, Z. F.; SUSHCHIK, N. N.; RAZLUTSKIY, V. L.; LEPSKAYA, E. V.; BATURINA, M. A.; KALACHOVA, G. S.; KONONOVA, O. N. Effect of temperature on contents of essential highly unsaturated fatty acids in freshwater zooplankton. **Limnologia**, v. 41, n. 4, p. 339-347, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075951111000144>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2011.03.001>.
- GUNDOGAN, M.; ELITOK, B. Seasonal changes in reproductive parameters and seminal plasma constituents of rams in Afyon province of Turkey. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 111, n. 4, p. 158-161, 2004.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000661>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>.
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00385.x/abstract>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00385.x>.

- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 2, p. 2409-2416, 1992.
- KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/122/1/131>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1220131>.
- NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326977997383>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)9738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)9738-3).
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
- RODRIGUES, M. P.; NICHI, M.; PEREZ, E. G. A.; CARDOSO, P. B. S.; VIANA, C. H. C.; BARROS, P. M. H.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Sperm oxidative status and seminal quality in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* bulls under tropical conditions. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 16., 2008, Budapest. **Proceedings...** Berlin: Blackwell Publishing, 2008. p. 161.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). **User's guide 8.2**. Cary: SAS, 2001.
- STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 779, n. 1, p. 89-137, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304415784900054>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4).
- SURAI, P. F.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H.; SPEAKE, B. K. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 2, p. 257-264, 2000. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/120/2/257.abstract>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1200257>.
- TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 92-97, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01806.x/abstract>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01806.x>.
- UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. **Plant Physiology**, v. 114, n. 4, p. 1493-1500, 1997. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/114/4/1493.abstract>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.4.1493>.
- VISINTIN, J. A.; MARTINS, J. F. P.; BEVILACQUA, E. M.; MELLO, M. R. B.; NICÁCIO, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Cryopreservation of *bos taurus* vs *bos indicus* embryos: are they really different? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 345-359, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006756>>. Acesso em: 7 maio 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00675-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00675-6).