

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

MARCELO CARVALHO DOS SANTOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE SALMÃO
EM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE *Canis*
familiaris MACHOS**

Campos dos Goytacazes - RJ

2019

MARCELO CARVALHO DOS SANTOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE SALMÃO EM
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE *Canis familiaris*
MACHOS.

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Isabel Candia Nunes da Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Stefano Romagnoli

Campos dos Goytacazes - RJ

2019

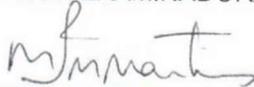
MARCELO CARVALHO DOS SANTOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE SALMÃO
EM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE *Canis*
familiaris MACHOS.

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019.

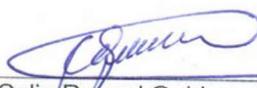
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins - UEL



Prof. Dr. Stefano Romagnoli – Universidade de Padova



Prof^a. Dr^a. Celia Raquel Quirino - UENF



Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva - UENF



Prof^a. Dr^a. Isabel Candia Nunes da Cunha - UFES
(orientadora)

AGRADECIMENTOS

A minha família pela paciência e auxílio nas horas difíceis. Em especial ao meu irmão por estar sempre pronto a me ouvir, me acalmar e me orientar e a tomar sempre a melhor decisão. E a minha mãe pelo apoio incondicional e amor que está sempre disposta a me oferecer.

A professora e orientadora Dr^a. Isabel Candia Nunes da Cunha por todo o apoio, incentivo, paciência, ensinamentos e amizade. Agradeço também ao professor e coorientador Stefano Romagnoli pelo incentivo, atenção, paciência, ensinamentos e convívio no laboratório. Um agradecimento especial para a Dr^a Chiara Milani, pela ajuda, atenção e ensinamentos.

A todos os meus colegas de laboratório, os que concluíram sua formação e seguiram seus caminhos, aos que permaneceram até hoje e aos que chegaram recentemente. Em especial agradecimento ao técnico Paolo Zucchini pela sua ajuda, paciência e perseverança. Obrigado por ter sido meu amigo.

A todos os meus colegas de trabalho.

Agradeço pela convivência e espero que possamos continuar trabalhando juntos ainda por um longo tempo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Com objetivo de avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe na reprodução canina e verificar a durabilidade dos efeitos após a suspensão da suplementação, 09 cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 23 a 38 Kg com idades variando de 2 a 8 anos e com histórico de fertilidade comprovada, foram utilizados. Os animais receberam suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D90), e foram acompanhados por 60 dias após suspensão da suplementação (D150). Os dados dos dias: D0, D90 e D150 foram avaliados. Os parâmetros seminais mensurados foram: volume, motilidade, vigor, concentração espermática, morfologia espermática, espermatozoides vivos e mortos, integridade de membrana pelo teste hiposmótico e níveis séricos de testosterona. Uma amostra de sêmen foi congelada. As avaliações ultrassonográficas compreenderam os parâmetros Doppler velocimétricos das artérias testiculares, volume testicular e epididimário e ainda a ecotextura testicular com auxílio do software ImageJ. Após descongelado, o sêmen foi subdividido em 3 alíquotas. Na primeira alíquota foram avaliados: motilidade, vigor, integridade de membrana (HOST), relação entre vivos/mortos e integridade acrossomal pela coloração rosa bengala-*fast green*. A segunda e terceira alíquotas foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) a 37°C por duas e 4 horas, respectivamente, e ao final do teste foram avaliados motilidade (%), vigor (0-5) e percentual de espermatozoides vivos/mortos pela coloração de eosina/nigrosina. Durante o tratamento (D0 *versus* D90), observou-se aumento em: motilidade $76,66\% \pm 13,7$ *versus* $92,77\% \pm 4,41$ ($p=0,001$); espermatozoides normais de $69,11\% \pm 24,90$ *versus* $90,00\% \pm 5,15$ ($p=0,05$); vivo/mortos (%) de $64,44 \pm 22,86$ para $85,33 \pm 8,41$ ($p=0,001$); espermatozoides (%) com membrana íntegra que era de $76,44 \pm 20,74$ e foi para $91,22 \pm 4,68$ ($p=0,05$). Ainda durante tratamento, observou-se redução do percentual de defeitos de cabeça ($p=0,04$). Os valores séricos de testosterona (ng/ml) aumentaram de $5,50 \pm 1,13$ para $8,84 \pm 1,13$ no D90 ($p=0,003$) e diminuíram para $5,13 \pm 1,13$ no D150. Após cessado tratamento, os parâmetros seminais permaneceram elevados por mais 60 dias (D90 a D150). Os valores dos índices: Velocidade de Pico Sistólico (VPS), Velocidade Diastólica Final (VDF) nas artérias suprategesticulares (AST) e artéria marginal (AM) sofreram aumento durante o período de tratamento e permaneceram nesse patamar até D150, não foi observada diferença dos parâmetros entre o testículo direto e

esquerdo, bem como entre epidídimo esquerdo e direito. Foi encontrada correlação negativa entre heterogeneidade e produção espermática ($r = - 0,41$; $p = 0,008$). Em conclusão, observamos que todos os parâmetros permaneceram aumentados por 60 dias após a suspensão da suplementação, exceto a testosterona que após 60 dias já havia retornado aos valores semelhantes ao início da suplementação.

Palavras-chave: ômega 3, sêmen, ultrassonografia Doppler, testosterona, espermatozoide, congelabilidade.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of supplementation with fish oil on canine reproduction and to verify the durability of the effects after the suspension of supplementation, 09 healthy male dogs of different races were using weighing between 23 and 38 kg with ages ranging from 2 to 8 years and with proven fertility history. The animals were given oral fish supplementation for 90 days (D90) and were followed for 60 days after further suspension (D150). The data of the days: D0, D90 and D150 were evaluated. The seminal parameters measured were: volume, motility, vigor, sperm concentration, sperm morphology, live and dead spermatozoa, hyposmotic test and serum testosterone levels. A semen sample was frozen. Ultrasonographic evaluations complementary to the velocimetric Doppler parameters of testicular arteries, testicular and epididymal volumetric arteries and testicular ecotexture with the help of ImageJ software. After thawing, the semen was subdivided into 3 aliquots. In the first aliquot were evaluated: motility, vigor, Membrane integrity (HOST), supra vital test and acrosomal integrity. The aliquots were submitted to the thermoresistance test (TTR) at 37°C for two and 4 hours, and at the end of the test were performed evaluation of motility (%), vigor (0-5) and percentage of live / dead spermatozoa by staining of eosin / nigrosin. During the period, there was an increase in: motility which $76.66\% \pm 13.7$ versus $92.77\% \pm 4.41$ ($p = 0.001$); normal spermatozoa $69.11\% \pm 24.90$ versus 90.00 ± 5.15 ($p = 0.05$); live / dead (%) from 64.44 ± 22.86 to 85.33 ± 8.41 ($p = 0.001$); spermatozoa (%) with intact membrane that was 76.44 ± 20.74 and went to 91.22 ± 4.68 ($p = 0.05$). Also, during treatment, a reduction in the percentage of head defects was observed ($p = 0.04$). Serum values of testosterone (ng / ml) increased from 5.50 ± 1.13 to 8.84 ± 1.13 non-D90 ($p = 0.003$) and decreased to 5.13 ± 1.13 non-D150. After cessation of treatment, the seminal parameters were maintained for more than 60 days (D90 to D150). The velocity levels: Systemic peak velocity (VPS), final diastolic velocity (VDF) in the suprastesticular arteries (AST) and marginal artery (AM) increased during the treatment period and maintained the plateau up to D150, the direct and left test, as well as between the epididymis and left and right. It was identified between heterogeneity and sperm production ($r = -0.41$, $p = 0.008$). In conclusion, we observed that all parameters are maintained for 60 days after the suspension, except the

testosterone that after 60 days had returned to values similar to the start of supplementation.

Key words: omega 3, semen, Doppler ultrasonography, testosterone, spermatozoa, freezing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Efeito da suplementação de óleo de peixe (90 dias), nos níveis séricos de testosterona em 9 cães machos ao longo de 150 dias.....36

CAPÍTULO II

Figura 1. Efeito da suplementação de óleo de peixe (90 dias), nos níveis séricos de testosterona em 8 cães machos ao longo de 150 dias.....47

Figura 2. Efeito da suplementação de óleo de salmão em 8 cães, nos índices VPS e VDF da artéria suprategicular (AST) e artéria marginal (AM) do testículo direito ao longo de 150 dias.....49

Figura 3. Efeito da suplementação de óleo de salmão em 8 cães, nos índices VPS e VDF da artéria suprategicular (AST) e artéria marginal (AM) do testículo esquerdo ao longo de 150 dias.....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen fresco de 9 cães, submetidos em diferentes períodos: a suplementação oral de óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90 e D150).....35

CAPÍTULO II

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen fresco e níveis séricos de testosterona de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).....47

Tabela 2. Média e desvio padrão de parâmetros Doppler velocimétricos das artérias suprategesticulares, artérias marginais e artérias intrategesticulares dos testículos direito e esquerdo de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).....48

Tabela 3. Média e desvio padrão de ecogenicidade, heterogeneidade, volumes testicular e da cauda do epidídimo dos testículos direito e esquerdo de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).....50

CAPÍTULO III

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen congelado de 9 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).....61

Tabela 2. Média e desvio padrão de motilidade (%) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).....61

Tabela 3. Média e desvio padrão de vigor (0-5) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).....61

Tabela 4. Média e desvio padrão de vivos/mortos (%) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).....62

Tabela 5. Mediana e intervalo interquartil de morfologia espermática em 9 cães suplementados com óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).....62

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

AFFCO: The Association of American Feed Control Officials

AGI: ácido graxo insaturado

AGS: ácido graxo saturado

AGMI: ácido graxo mono insaturado

AGPI: ácido graxo poli insaturado

AGPI-CL: ácido graxo poli insaturado de cadeia longa

AGPI-CML: ácido graxo poli insaturado de cadeia muito longa

AL: ácido linoleico

ALA: ácido alfa linolênico

AO: ácido oleico

AST: artéria suprateresticular

AM: artéria marginal

AIT: artéria intrateresticular

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPA: ácido docopentanóico

DHA: ácido docosa-hexaenóico

EFA: ácidos graxos essenciais

EPA: ácido eicosapentaenóico

EM: energia metabolizável

g: grama

IPx: intensidade de pixel

IP: índice de pulsatilidade

IR: índice de resistividade

H: altura

HOST: *hypo-osmotic swelling test*

Kg: kilograma

L: comprimento

LH: hormônio luteinizante

LA: ácido linoleico

mg: miligrama

ml: mililitro

MOT: motilidade

MS: matéria seca

ng: nanograma

NO: óxido nítrico

NRC: *National Research Council*

OH: hidroxila

O₂⁻: ânion superóxido

PUFA: *Poly Insaturated Fatty Acid*

PRF: repetição de frequência de pulso

ROS: *Reactive oxygen species*

T: testosterona

TTR: teste de termo resistência

VPS: velocidade de pico sistólico

VDF: velocidade diastólica final

ω: ômega

°C: grau Celsius

UI: unidade internacional

μg: micrograma

%: percentagem

®: marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Membrana plasmática espermática	15
2.2	Ácidos Graxos	18
2.2.1	Estrutura, síntese, função	18
2.2.2	Ácidos graxos poliinsaturados e seu efeito sobre a reprodução	22
2.2.3	Metabólitos do oxigênio e antioxidantes	23
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
4	ARTIGO I - Efeito durante e após suplementação de óleo de salmão na qualidade do sêmen e níveis séricos de testosterona em cães.	30
	RESUMO	30
	ABSTRACT	30
	INTRODUÇÃO	31
	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	RESULTADOS.....	33
	DISCUSSÃO	35
	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS.....	37
5.	ARTIGO II - Efeito da suplementação de óleo de salmão em cães: parâmetros dopplervelocimétricos, ecotextura testicular, volume testicular e epididimário e níveis séricos de testosterona.	40
	RESUMO	40
	ABSTRACT	41
	INTRODUÇÃO	41
	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
	RESULTADOS.....	45
	DISCUSSÃO	49
	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52
6.	ARTIGO III - Efeito da suplementação na dieta com óleo de salmão sobre a congelabilidade de sêmen canino: avaliação durante e após tratamento.	56
	RESUMO	56
	ABSTRACT	56
	INTRODUÇÃO	57
	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
	RESULTADOS.....	59
	DISCUSSÃO	61
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO

Lipídios, presentes tanto no espermatozoide quanto no plasma seminal, estão envolvidos não só no metabolismo energético das células espermatáticas, mas também em muitas funções e eventos que levam à fertilização (ZANIBONI; RIZZI; CEROLINI, 2006). O sêmen de todas as espécies domésticas contém altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (BRINSKO et al., 2005), mas a natureza dos lipídios depende da espécie animal. Enquanto os ácidos graxos da série n-6 predominam no sêmen das aves (KELSO et al., 1997a), na maioria dos mamíferos, a composição de ácidos graxos dos espermatozoides é caracterizada por proporções muito altas de ômega 3 (n-3), particularmente ácido docosa-hexaenóico (22: 6) (KELSO et al., 1997a; SAMADIAN et al., 2010). A relação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) para n-3 ácidos graxos (n-3), desempenham papel importante em vários aspectos da saúde animal, produção e reprodução (ABAYASEKARA; WATHES, 1999). Além disso, existem evidências consideráveis de que a composição lipídica da membrana espermática é um dos principais determinantes da motilidade, sensibilidade ao frio e viabilidade geral (HAMMERSTEDT, 1993), metabolismo lipídico e capacidade de fusão dos espermatozoides (STUBBS; SMITH, 1984). Esses ácidos graxos insaturados dão à membrana plasmática dos espermatozóides a fluidez necessária para participar das ocorrências de fusão de membrana associadas à fertilização (CONQUER et al., 2000). Os PUFAs n-3 e n-6 são ácidos graxos essenciais, porque não podem ser sintetizados de novo em mamíferos e, portanto, devem ser fornecidos pela dieta. Uma das principais fontes na dieta de PUFA ω -3 de cadeia longa é o pescado, rico nos ácidos graxos EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosa-hexaenoico). Os óleos das sementes oleaginosas, particularmente o óleo de linhaça é rico em ácido α -linolênico, precursor destes ácidos graxos (Calder, 1998).

Tem sido demonstrado que a suplementação dietética com uma ampla gama de suplementos de PUFAs pode alterar o perfil de ácidos graxos espermatozoides de carneiros (SAMADIAN et al., 2010), suínos (ROOKE; SHAO; SPEAKE, 2001), touros (GHOLAMI et al., 2010) e aves (KELSO et al., 1997a).

Acredita-se que o alto grau de insaturação encontrado no esperma contribua ativamente para a regulação do movimento celular e do metabolismo lipídico; também

confere fluidez suficiente à membrana plasmática dos espermatozoides para os eventos de fusão que caracterizam a fertilização (STUBBS; SMITH, 1984). A proporção de PUFA espermático tem sido diretamente relacionada à qualidade do sêmen em diferentes espécies (TRAN et al., 2017). Particularmente, o conteúdo de DHA tem sido relacionado à concentração de espermatozoides e motilidade em homens (NISSEN; KREYSEL, 1983; ZALATA et al., 1998), ovinos (SAMADIAN et al., 2010) e aves (SURAI et al., 2000). Uma redução na fertilidade durante o envelhecimento foi associada com proporções diminuídas de PUFA específico em fosfolípidos (DHA) da membrana espermática em espermatozoides tanto de touros como de frango (CEROLINI et al., 1997; KELSO et al., 1997b). Além disso, em homens, menores proporções de DHA foram observadas em amostras oligozoospermicas e astenozoospermicas do que em amostras normozoospermicas (ZALATA et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação de óleo de peixe na qualidade espermática, níveis séricos de testosterona, na congelabilidade do sêmen e nos índices Doppler velocimétricos dos testículos de cães durante e após a suplementação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Membrana plasmática espermática

A célula espermática canina tem um comprimento total de $61,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$. A cabeça é primariamente formada pelo DNA que compõe o núcleo, recoberta anteriormente pelo acrossoma e posteriormente pelo envoltório pós-nuclear. A cabeça mede $6,1 \pm 0,04 \mu\text{m}$ com largura de $3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$. A peça intermediária mede $10,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ e a cauda em torno de $50 \mu\text{m}$ (Woodall & Johnstone, 1988). Segundo DAHLBOM et al. (1992), existem marcadas diferenças entre indivíduos de diferentes raças, com relação à morfometria da cabeça espermática na espécie canina.

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é o componente mais externo. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozoides e com sua natureza diferindo regionalmente (FLESCHE; BAREND M. GADELLA, 2000; KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007); é uma estrutura fina, flexível, autosselante e

seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de apenas 7,5 a 10nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (GUYTON & HALL, 1997), sendo que proporções relativas desses componentes são distintas em diferentes tipos de membranas (LEHNINGER et al., 2000). A composição lipídica, característica para cada reino, espécie, tecido e organela de certo tipo celular, consiste em três zonas: a bicamada lipídica, a superfície de contato entre os fosfolipídios e a água e o glicocálice (SCOTT, 1973).

A membrana plasmática ao redor dos espermatozoides é formada basicamente por uma camada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídeos organizados em um mosaico fluido (SINGER & NICHOLSON, 1972). As proteínas integrais e periféricas são aproximadamente 50% do peso da membrana, e estão entremeadas ao longo da bicamada lipídica. Proteínas integrais são canais através da membrana e estão situadas na bicamada lipídica. Já as proteínas periféricas podem ser removidas facilmente da membrana (SINGER & NICHOLSON, 1972).

O modelo mosaico da membrana é fluido, pelo fato de as interações entre os lipídios e as proteínas não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas se movam lateralmente no plano da membrana. Os lipídios de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora a assimetria, ao contrário daquela das proteínas da membrana, não seja absoluta. Os fosfolipídios estão em um arranjo lamelar que organiza a cadeia de ácido graxo em uma barreira hidrofóbica, prevenindo a entrada de água ou outras moléculas. À temperatura corporal, a membrana plasmática está no estado fluido e o arranjo lamelar permite aos fosfolipídios se moverem livremente ao longo da bicamada (AMANN; PICKETT, 1987). Na membrana plasmática, certos lipídios são tipicamente encontrados na face externa da camada (esfingomiélnina e fosfatidilcolina) e outros na face interna, região citoplasmática (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol); (LEHNINGER et al., 2000), sendo o principal constituinte que confere à membrana a característica de fluidez, a qual depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores. O conteúdo esterol da membrana também é um determinante importante desta temperatura de transição. A estrutura plana rígida do grupo esteroide, inserida entre

as cadeias laterais dos ácidos graxos, tende a moderar os extremos de solidez e fluidez das membranas (ALBERTS et al., 1997).

Darin-Bennett e White (1977) verificaram que espécies com maior concentração de colesterol apresentam menores danos causados à membrana durante o processo de resfriamento.

A composição lipídica da membrana celular é um dos principais fatores determinantes de sua fluidez. Fosfolipídios com cadeia linear saturada interagem mais fortemente entre si apresentando maior ponto de fusão, já aqueles com cadeias insaturadas assumem a forma líquida a temperaturas mais baixas. Além disso, quanto maior o grau da insaturação da cadeia linear mais cônica é a conformação do fosfolipídio, e maior a tendência a sofrer alteração na organização estrutural durante o resfriamento. O colesterol na membrana celular posiciona-se entre as cadeias lineares dos fosfolipídios e, dessa forma, pode modificar a interação entre eles influenciando a fluidez da membrana. Durante o resfriamento, o colesterol age estabilizando os fosfolipídios e inibindo seu agrupamento de forma que, membranas com maior concentração de colesterol são mais resistentes a mudanças de temperatura (WATSON, 2000).

Embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar) (FLESCH; BAREND M. GADELLA, 2000). O espermatozoide canino apresenta em suas membranas baixa proporção de ácidos graxos poliinsaturados, o que explica em parte sua relativa resistência a alterações de temperatura (G.F. BOUCHARD, J.K. MORRIS, 1990). Essa particularidade provavelmente é responsável pelo espermatozoide canino apresentar uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura (PASCAL; BÎRȚOIU, 2012).

Os fosfolipídios parecem ser a fonte principal de substrato para respiração endógena dos espermatozoides. Segundo SCOTT (1973), os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides variam consideravelmente de uma espécie para outra, sendo que plasmalogencolina é o principal fosfoglicerídio dos espermatozoides dos ruminantes domésticos. Esses fosfoglicerídios são hidrolisados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, promovendo, desta maneira, energia celular (Aitken, 1999; Mills and Scott, 1969).

Durante sua fase de maturação no epidídimo, ocorre aumento na proporção de ácidos graxos poliinsaturados dos espermatozoides, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (MARSH, 1992). Assim, qualquer mudança que ocorra em cada fosfolípido, ou na composição de seus ácidos graxos, altera a estrutura e a função da membrana dos espermatozoides (KHOSROWBEYGI e ZARGHAMI, 2007).

O colesterol é o principal esteroide dos espermatozoides ejaculados (CROSS, 1998) e parece ser importante regulador da função espermática (LANGLAIS e ROBERTS, 1985). *In vitro*, a adição de colesterol ao meio previne os espermatozoides de se tornarem capazes de iniciar a reação acrossomal (ZARINTASH e CROSS, 1996).

Um ejaculado *in natura* possui relação elevada de colesterol/fosfolípido. Durante a capacitação espermática, o colesterol se move da membrana para “solubilizar proteínas e receptores”, enquanto os fosfolípidos se movem para dentro da membrana espermática (CROSS, 1998). A relação baixa de colesterol/fosfolípido diminui a microviscosidade da membrana, expondo os fosfolípidos e, talvez, permitindo aumentar o influxo de cálcio, resultando na reação acrossomal. Em algumas espécies, a concentração de colesterol na membrana plasmática se altera com a passagem dos espermatozoides pelos epidídimos. A relação colesterol/fosfolípido da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros e bodes aumenta durante o trânsito epididimário (PARKS e HAMMERSTEDT, 1985; RANA et al., 1991), mas não se altera em suínos (NIKOLOPOULOU e SOUCEK, 1985). Os espermatozoides emitidos no ejaculado podem obter colesterol adicional do plasma seminal. O colesterol é encontrado nas lipoproteínas e em qualquer tipo de células de um ser vivo (CROSS, 1998).

2.2. Ácidos Graxos

2.2.1 Estrutura, síntese e função

Os lipídeos desempenham uma variedade de funções celulares e é a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos. Atuam no transporte

de vitaminas lipossolúveis, atuam como precursores de hormônios e determinados grupos são considerados funcionais.

Os ácidos graxos são classificados conforme a presença de duplas ligações (insaturações) entre as cadeias de carbono. São denominados Ácidos Graxos Saturados (AGS) na ausência de duplas ligações; Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGMI) pela presença de uma insaturação; Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI ou PUFAs) pela presença de duas ou mais insaturações. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, os AGPI que possuem número de átomos de carbono \geq a 16 são denominados Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Longa (AGPI-CL). Os AGPI com número de átomos de carbono \geq a 20 são denominados Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Muito Longa (AGPI-CML) (MARTIN et al., 2006).

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, que podem ser representados pela forma RCO_2H . Na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, que pode ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula. De acordo com a presença de insaturações na cadeia carbônica, os AG são classificados em saturados e insaturados (KALISH; FALLON; PUDER, 2012). A estrutura química de um ácido graxo é dado por três números: (1) números de átomos de carbono na cadeia, (2) número de duplas ligações e (3) número ômega (ω), que indica a posição da primeira dupla ligação a partir do grupo metila, por exemplo no caso da série ω_3 a primeira ligação ocorre entre o terceiro e quarto carbono e no caso da família ω_6 a primeira dupla ligação ocorre entre o sexto e sétimo carbono. Os ácidos graxos que possuem o mesmo número ômega pertencem à mesma família.

Os ácidos graxos poliinsaturados não são sintetizados pelas células do organismo, por isso são chamados de essenciais. Portanto, devem ser adquiridos pela alimentação ou da suplementação. Existem dois tipos de ácidos graxos essenciais, são eles: ômega-3 (ácido linolênico) e ômega-6 (ácido linoléico). O ácido graxo ômega-3 é encontrado principalmente nos peixes e óleos de peixe. Enquanto que as melhores fontes alimentares de ômega-6 são os óleos vegetais (girassol, milho, soja, algodão). Os ácidos graxos essenciais (EFA) são necessários para vários processos fisiológicos, como a manutenção da estrutura das membranas celulares e a síntese de compostos biologicamente ativos, a exemplo, as prostaglandinas e os leucotrienos (CALDER, 2017).

A maioria das dietas secas para cães adultos em manutenção contém entre 5% e 13% de extrato etéreo na base seca (CASE et al., 2011). Algumas das recomendações mínimas de gordura para cães adultos em manutenção são de 5% enquanto que para animais em crescimento e reprodução devem ser de 8% na matéria seca (MS), fornecidas em dietas contendo 3500 kcal/kg (AFFCO, 2008). A exigência para cães adultos em manutenção é de no mínimo de 1% de ácido linoleico (C18:2 ω 6; LA) na MS, apesar de ainda não estar estabelecida uma exigência para ácido α -linolênico (C18:3 ω 3; ALA) para cães, uma quantidade mínima de 0,044% na MS ou 0,09% da energia metabolizável (EM), é sugerida para dietas contendo 1% de AL (NRC,2006). Os ácidos graxos insaturados (AGI) podem ser divididos, basicamente, em três classes distintas: ômega-3 (ω -3, ácido α -linolênico), ômega-6 (ω -6, ácido linoléico) e ômega-9 (ω -9, ácido oléico). Cada classe é composta por uma família de ácidos graxos, sendo que todos os membros desta família podem ser sintetizados biologicamente a partir daqueles oferecidos na dieta (Graziola et al., 2002; Kalish et al., 2012). Os ácidos α -linolênico (ALA, ω -3), linoléico (LA, ω -6) e oléico (OA, ω -9) são substratos das mesmas enzimas dessaturases, de forma que as famílias de AGI ω -3, ω -6 e ω -9 competem entre si pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia carbônica. As series ω 9 e ω 7 podem ser derivadas da síntese endógena a partir do ácido oleico (C18:1 ω 9) pode dar origem ao ácido eicosatrienoico (C20:3 ω 9). Na serie ω 6, o ácido araquidônico (C20:4 ω 6) é derivado do ácido linoleico (C18:2 ω 6; LA) é na serie ω 3, o ácido eicopentanóico (C29:5 ω 3; EPA), o ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3; DHA), e o ácido docopentanóico (C22:5 ω 3; DPA) são derivados do ácido α -linolênico (C18:3 ω 3; ALA) (MCDOWELL, 1989).

Assim, cada um destes ácidos graxos origina uma serie de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), cada vez mais insaturados, mas não entre famílias, visto que o metabolismo animal não é capaz de dessaturar (adicionar ligações duplas) em direção à extremidade do radical metila do ácido graxo (MCDOWELL, 1989). Para que haja a formação de ácidos a partir dos ômegas 6 e 3, é necessária a presença das vitaminas A e E, além dos minerais zinco e magnésio (MARTIN et al., 2006).

Os ácidos graxos insaturados, denominados ômega 3, vêm sendo cada vez mais utilizados na dieta de animais devido aos seus inúmeros efeitos benéficos ao organismo, destacam-se: prevenção da isquemia ventricular fatal induzida por arritmias em animais (BILLMAN et al., 1999); proteção renal (BROWN et al., 1998);

diminuição satisfatória no controle do prurido em cães atópicos (PARADIS et al., 1991); redução sérica de colesterol (ARAUJO et al., 2012); modulação da expressão de proteínas no tecido adiposo, podendo atuar como reguladores transcricionais de alguns genes relacionados ao metabolismo de lipídios (QUEIROZ et al., 2009); diminuição da concentração de trigliceróis (KRIS-ETHERTON et al., 2003), devido à redução da lipogênese hepática ocasionada pela inibição de duas enzimas envolvidas na síntese desse lipídio pelo fígado (HARRIS e BULCHANDANI, 2006) e redução da pressão arterial e do processo inflamatório (DIN et al., 2004).

O ácido linoléico é também conhecido como ácido graxo Ômega-6, podendo dar origem a uma família completa de ácidos graxos poliinsaturados Ômega-6, que da mesma forma que a família dos compostos Ômega-3 tem importantes funções nas células dos animais. Os ácidos graxos Ômega-3 e ácidos graxos Ômega-6 não podem interconverter-se nos animais, razão pela qual se necessita que ambos sejam proporcionados nas dietas. O ácido linoléico atua sobre as membranas celulares dos animais, nas funções enzimáticas e nos receptores das membranas celulares (BUTOLO, 2001).

Através da mudança do perfil de ácidos graxos essenciais consumidos na dieta, pode-se alterar a resposta inflamatória nos cães. De acordo com Chan (2008), potentes eicosanóides pró-inflamatórios, leucotrienos e tromboxanos da série 2 e 4 são produzidos a partir do ácido araquidônico, pelo ácido graxo ômega-6. Provisão de ômega-3 na dieta objetiva deslocar e substituir o ômega-6 nas membranas celulares, e, quando estes são metabolizados pelo ácido araquidônico, ocorre produção de eicosanóides da série 3 e 5, os quais possuem menor potencial pró-inflamatório e vasoativo respectivamente). Em contrapartida, suplementação com ômega-3 resulta na produção de mediadores inflamatórios com menor potencial quando metabolizados (eicosanóides e leucotrienos da série 3 e 5, respectivamente) (CHAN, 2008).

Ensaio in vitro mostram que os AGI n-6 e n-9 agem sobre neutrófilos aumentando a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas são importantes sinalizadores durante o processo de reparo tecidual, e estão envolvidas na sinalização para migração e diferenciação células e liberação de citocinas (HATANAKA; CURI, 2007).

Os ácidos graxos, como componentes dos fosfolipídios das membranas celulares, podem afetar as propriedades e a interação entre os componentes que

estão diretamente relacionados com o transporte de proteínas, atividade enzimática e receptores de membrana (LENIGHAN; et al., 2018).

Nair et al. (1997) consideraram que os ácidos graxos poli-insaturados poderiam influenciar a fluidez das membranas e a atividade de enzimas necessárias para produção de energia, além de muitas funções dos receptores dependentes de lipídeos-proteína, sendo que qualquer mudança na composição dos ácidos graxos pode afetar a membrana plasmática.

2.2.2 Ácidos graxos poliinsaturados e seu efeito sobre a reprodução

Mais recentemente, o aumento no desempenho reprodutivo tem se relacionado com as propriedades de alimento funcional que possuem os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (GASKINS e CHAVARRO, 2018). Alimentos funcionais são todos aqueles ingredientes que quando fornecidos regularmente apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas favorecendo uma ou mais funções alvo no corpo (MORAES e COLLA, 2006). Segundo esta definição é possível afirmar que alimentos ricos em PUFAs, especialmente os ácidos graxos essenciais podem ser considerados alimentos funcionais.

O teor de PUFAs da dieta tem influência na fertilidade provendo compostos específicos requeridos para o desenvolvimento dos espermatozoides e ovócitos. Também podem influenciar diretamente, pelo impacto sobre as concentrações de hormônios e sinais metabólicos circulantes que são requeridos para o êxito de processos tais como ovulação, fecundação e sobrevivência do embrião (ROBINSON et al., 2006). Desta forma, alterações nas concentrações de PUFAs na dieta têm sido relacionadas com mudanças na concentração de ômega-6 e ômega-3 das membranas dos espermatozoides de cachorros (MALDJIAN et al., 2005) e igualmente associados a eventos relacionados com a fusão espermatozoide-oócito e sucesso da fecundação (GASKINS e CHAVARRO, 2018).

Em garanhões, espécie extremamente sensível a crioinjúria seminal, inclusões de PUFAs na dieta de machos tem mostrado resultados positivos na congelabilidade de sêmen (RODRIGUES et al., 2017). Entretanto, em carneiros a suplementação com óleos virgens de oliva teve um efeito negativo sobre a motilidade espermática, viabilidade e integridade acrossomal (DE GRAAF et al., 2007). Estes resultados negativos podem ser atribuídos à dificuldade da transferência da dieta à membrana

celulares dos ruminantes, devido à ação dos microrganismos do rúmen sobre os ácidos graxos (BUCCIONI et al., 2012).

Os ácidos graxos são componentes dos fosfolipídios das membranas celulares, podendo afetar as propriedades e a interação entre seus componentes que estão diretamente relacionados com o transporte de proteínas, atividade enzimática e receptores de membrana (ROCHE, 1999). Estudos em camundongos têm demonstrado relações entre mudanças na composição de lipídios da membrana e estímulo de receptores de LH (SEBOKOVA et al., 1990) e atividade esteroidogênica do testículo (MEIKLE et al., 1996).

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

De acordo com Rooke et al. (2001), o ácido graxo DHA ω 3 desempenha uma função essencial promovendo ótima fertilidade, principalmente em humanos e que reduções significativas deste ácido graxo na fração lipídica dos espermatozoides têm correlação não só com reduções na concentração espermática, mas também na motilidade progressiva e morfologia normal dos espermatozoides, fato também observado em cães por Rocha et al. (2009).

2.2.3 Metabólitos do oxigênio e antioxidantes

Quimicamente, os metabólitos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, as quais são, portanto, altamente energéticas e instáveis, podendo ser formadas pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna (próprio metabolismo) de reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou enzimas. Essa energia, ao atingir o átomo, induz a que um elétron seja removido do seu orbital, formando novo átomo contendo um elétron extra, denominado ROS, o qual, para se tornar novamente estável, precisa liberar essa energia acumulada (Ozcan e Ogun, 2015).

O organismo produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio decorrente do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Concentrações reduzidas de ROS são importantes para processos bioquímicos normais como: sinalização e controle do crescimento celular, ataque de patógenos invasores, síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclo-oxigenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeo), e detoxificação de substâncias estranhas. Porém, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras (AGARWAL et al., 2004; SANOCKA e KURPISZ, 2004).

O termo espécies reativas de oxigênio (ROS) representam uma categoria de moléculas que se referem aos radicais livres (íon hidroxil, superóxido, óxido nítrico, peróxil, etc.), aos não radicais (ozônio, oxigênio singlete, peroxidases lipídicas, peróxido de hidrogênio) e aos derivados do oxigênio (AGARWAL e ALLAMANENI, 2004). Espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, íon nitroxil, peróxido de nitrito, etc.) são consideradas radicais livres de nitrogênio e são subclasse das ROS (DARLEY-USMAR et al., 1995). Todas essas moléculas podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas transmembrana e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (OCHSENDORF et al., 1999).

Os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelas ROS, provocando reação propagadora de auto-oxidação, ou seja, efeito cascata na formação de novos metabólitos oxidantes (GASCHLER e STOCKWELL, 2017; SHARMA e AGARWAL, 1996). Uma vez que a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (ZALATA et al., 1998), torna-se altamente sensível às ROS (OCHSENDORF et al., 1999).

A produção de ROS em excesso parece estar envolvida com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (CHATTERJEE e GAGNON, 2001; OCHSENDORF et al., 1999) em condições hipotérmicas de estocagem (MAXWELL e WATSON, 1996), resultando em perda da motilidade espermática e indução de apoptoses, devido à lipoperoxidação (AGARWAL et al., 2014).

Leucócitos e células espermáticas imaturas são as principais fontes de ROS (GARRIDO et al., 2004), sendo a peroxidação lipídica gerada espontaneamente dentro da membrana plasmática e liberada pela ação da fosfolipase A2 (TWIGG et al., 1998).

A maioria dos seres vivos possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas ROS formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. Diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo: a superóxido dismutase remove o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; a catalase destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; a glutathione peroxidase é a mais importante na remoção de peróxido das células. Outros antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), participam desse sistema bloqueando a ação das ROS envolvidas na oxigenização de ácidos graxos poli-insaturados e, conseqüentemente, na formação de peróxidos (ZINI e AL-HATHAL, 2011).

Segundo ARAÚJO (2001), a ROS produzida no interior hidrofóbico da membrana se combina com o oxigênio que lá se encontra dissolvido, formando o radical peroxil. O radical resultante ataca as proteínas e oxida novamente os ácidos graxos poli-insaturados adjacentes. Os hidroperóxidos formados pela oxidação, por serem mais hidrofílicos, migram para a superfície da membrana para interagir com a água, provocando sua ruptura e alterando sua fluidez. A proteção da membrana é obtida por remoção das ROS, sendo que, nas membranas, o principal removedor é o α -tocoferol. Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que estes oxidem os ácidos graxos adjacentes ou as proteínas. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido. Desta forma, as enzimas catalase e glutathione peroxidase atuam na remoção dos novos radicais formados.

Essas enzimas antioxidantes estão presentes no plasma seminal e nos espermatozoides dos animais, sendo que, na espécie bovina, foram encontradas no plasma seminal glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (em baixa concentração), e nos espermatozoides foram encontrados principalmente superóxido dismutase e baixa concentração de glutathione peroxidase. Verificou-se ausência da catalase nos espermatozoides bovinos, diferindo de outras espécies, como humana e ovina, nas quais foi detectada a atividade da catalase (Bilodeau et al., 2000), embora

a catalase presente no plasma seminal esteja relacionada, em ovinos e bovinos, ao controle do estresse oxidativo nas células (BUCAK et al., 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *v. 61, p. 275–287, 1999.*
- AGARWAL, A; ALLAMANENI, S. S. R. Oxidants and antioxidants in human fertility. **Mid. East. Fert. Soc. J.**, v. 9, n. 3, p. 187–197, 2004.
- AGARWAL, A. et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 6, p. 616–627, 2004.
- AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.
- AITKEN, R. J. The human spermatozoon - a cell in crisis? **Reproduction**, v. 115, n. 1, p. 1–7, 1999.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.
- ARAUJO, M. M. G. et al. Avaliação de colesterol e triglicerídeos séricos em cães saudáveis suplementados com ômega n-3. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1491–1496, 2012.
- BILLMAN, G. E.; KANG, J. X.; LEAF, A. Prevention of Sudden Cardiac Death by Dietary Pure omega -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Dogs. **Circulation**, v. 99, n. 18, p. 2452–2457, 1999.
- BILODEAU, J.-F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.-A. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing. *v. 288, n. May 1999, p. 282–288, 2000.*
- BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519–1527, 2005.
- BROWN, S. A. et al. Beneficial effects of chronic administration of dietary c0-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 131, n. 5, p. 447–455, 1998.
- BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060–1067, mar. 2007.
- BUCCIONI, A. et al. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 1–2, p. 1–25, 2012.
- CALDER, P. C. Omega-3: The good oil. **Nutrition Bulletin**, p. 132–140, 2017.
- CASE, L. P. . et al. **Canine and Feline Nutrition A Resource for Companion Animal Professionals**. 3rd. ed. [s.l.] Mosby Elsevier, 2011.
- CEROLINI, S. et al. Relationship between Spermatozoan Lipid Composition and Fertility during Aging of Chickens '. *v. 980, p. 976–980, 1997.*
- CHAN, D. L. The role of nutrients in modulating disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 6, p. 266–271, 2008.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa Undergoing Cooling , Freezing , and Thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. February, p. 451–458, 2001.

- CONQUER, J. A. et al. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. **Lipids**, v. 35, n. 2, p. 149–154, 2000.
- CROSS, N. L. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7–11, 1998.
- DA ROCHA, A. et al. Effect of Daily Food Supplementation with Essential Fatty Acids on Canine Semen Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 313–315, jul. 2009.
- DAHLBOM, M.; ANDERSON, M.; ALANKO, M. Poor semen quality in Irish wolfhounds: A clinical, hormonal and spermatological. n. 164, 1992.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, n. 4, p. 466–470, 1977.
- DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v. 369, n. 95, p. 131–135, 1995.
- DE GRAAF, S. P. et al. Influence of supplementing diet with Oleic and Linoleic acid on the freezing ability and sex-sorting parameters of ram semen. **Livestock Science**, v. 110, n. 1–2, p. 166–173, 2007.
- DIN, J.; NEWBY, D.; FLAPAN, A. Clinical review for a natural treatment - fishing for a natural treatment. **BMJ**, v. 328, p. 328:30, 2004.
- FLESCH, F. M.; BAREND M. GADELLA. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization Frits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 20, n. 5, p. 197–235, 2000.
- G.F. BOUCHARD, J.K. MORRIS, J. D. S. AND R. S. Y. Effect of Storage Temperature, Cooling Rates and Two. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 147–167, 1990.
- GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Biochemical and Biophysical Research Communications Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, 2017.
- GASKINS, A. J.; CHAVARRO, J. E. Diet and fertility: a review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 4, p. 379–389, 2018.
- GHOLAMI, H. et al. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **THE**, v. 74, n. 9, p. 1548–1558, 2010.
- GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; PRZEPIÓRKA, M.; KATARZYNAROMANOWIC. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. **Reproductive Biology**, v. 2, n. 3, p. 277–93, 2002.
- 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.
- HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Curr Opin Lipidol**, v. 17, p. 387–93, 2006.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos Graxos E Cicatrização: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 53–58, 2007.
- KALISH, B. T.; FALLON, E. M.; PUDER, M. A Tutorial on Fatty Acid Biology. **journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 36, n. 4, p. 380–388, 2012.
- KELSO, K. A. et al. The Effects of Dietary Supplementation with Docosahexaenoic Acid on the Phospholipid Fatty Acid Composition of Avian Spermatozoa. v. 118, n. 1, p. 65–69, 1997a.
- KELSO, K. A. et al. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma

- throughout the reproductive period of bulls. **J Reprod Fertil**, v. 109, n. 1, p. 1–6, 1997b.
- KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 117–121, 2007.
- KRIS-ETHERTON, P. M. et al. AHA Scientific Statement. **Circulation**, v. 106, p. 2747–2757, 2003.
- LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v. 12, n. 2, p. 183–224, 1985.
- LENIGHAN, Y. M.; MCNULTY, B. A.; ROCHE, H. M. Dietary fat composition: Replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on α -linolenic acid. **Proceedings of the Nutrition Society**, n. June 2018, 2018.
- MALDJIAN, A. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 411–421, 2005.
- MARSH, D. Role of lipids in membrane structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, n. 4, p. 497–502, 1992.
- MARTIN, C. A. et al. ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 55–65, abr. 1996.
- MEIKLE, A. W. et al. Oleic acid inhibits cholesteryl esterase and cholesterol utilization for testosterone synthesis in mouse leydig cells. **Metabolism**, v. 45, n. 3, p. 293–299, 1996.
- MILLS, S. C.; SCOTT, T. W. Metabolism of Fatty Acids By Testicular and Ejaculated Ram Spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 18, n. 2, p. 367–369, 1969.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 14, 2006.
- NAIR, S. S. D. et al. Prevention of Cardiac Arrhythmia by Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and Their Mechanism of Action. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 3, p. 383–393, 1997.
- NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; C, V. J. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation Mafia Nikolopoulou a ,, Donald A . Soucek a , b and James C . Vary. **Biochimica et biophysica acta**, v. 815, p. 486–498, 1985.
- NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**, v. 15, n. 3, p. 264–9, 1983.
- OCHSENDORF, F. R. et al. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 399–420, 1999.
- PARADIS, M. et al. The Efficacy of Clemastine (Tavist), a Fatty Acid-containing Product (Derm Caps), and the Combination of Both Products in the Management of Canine Pruritus. **Veterinary Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 17–20, 1991.
- PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane 1. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653–668, 1985.
- PASCAL, M. S.; BÎRȚOIU, A. I. Freezing of dog's sperm: A review. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, n. 5, p. 7709–7716, 2012.

- QUEIROZ, J. C. F. DE et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 1, p. 582–594, 2009.
- RANA, P. S. A. et al. Lipid changes goat sperm plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, n. Biomedical I, p. 185–196, 1991.
- ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3–4, p. 259–276, 2006.
- ROCHE, H. M. **Unsaturated fatty acids**. Proceedings of the Nutrition Society. **Anais...**1999
- RODRIGUES, A. C. et al. Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 5, p. 3069–3076, 2017.
- ROOKE, J. A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 315–322, 2001.
- SAMADIAN, F. et al. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. n. 2010, p. 2017–2022, 2010.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, n. 1, p. 12, 2004.
- SEBOKOVA, E. et al. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. **The Journal of nutrition**, v. 120, n. 6, p. 610–618, 1990.
- SHARMA, R.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835–50, 1996.
- STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. V. Summary and perspectives Fatty acyl groups form the hydrophobic interior of all biological membranes, and provide the impermeability to hydrophilic substances that is required at the boundaries of cells and cell organelles. Considerable metabolic. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 779, n. 1, p. 89–137, 1984.
- SURAI, P. F. et al. 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.
- TRAN, L. VAN et al. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction — A Review. **Asian-Australas J Anim Sc**, v. 30, n. 5, p. 622–637, 2017.
- TWIGG, J. et al. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 6, p. 1429–36, 1998.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- ZALATA, A. A. et al. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 2, p. 111–118, 1998.
- ZANIBONI, L.; RIZZI, R.; CEROLINI, S. Combined effect of DHA and ??-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1813–1827, 2006.
- ZARINTASH, R. J.; CROSS, N. L. Unesterified Cholesterol Content of Human Sperm Regulates the Response of the Acrosome to the Agonist, Progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 19–24, 1996.
- ZINI, A.; AL-HATHAL, N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 374–381, 2011.

4. ARTIGO I - Efeito durante e após suplementação de óleo de salmão na qualidade do sêmen e níveis séricos de testosterona em cães.

Effect during and after supplementation of salmon oil on semen quality and serum levels of testosterone in dogs.

M.C. Santos¹, C. Milani², P. Zucchini², S. Romagnoli², C.R. Quirino¹, I.C.N. Cunha¹

1 – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

2 – Universidade De Padova, Legnaro, PD, Itália.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do uso do óleo de salmão nos parâmetros seminais e níveis séricos de testosterona em cães, sendo a avaliação durante e após tratamento. Foram utilizados nove cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 10 a 36 Kg com idades variando de 2 a 11 anos e com histórico de fertilidade comprovada. As avaliações ocorreram no início (D0), aos 90 dias (D90) e no final do experimento (D150). Os animais foram suplementados até 90 dias com óleo de salmão na dosagem recomendada pelo fabricante (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA), porém as avaliações continuaram por mais 60 dias. Os parâmetros mensurados foram: volume, motilidade, vigor, concentração espermática, espermatozoides normais, defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeito de cauda, cabeça destacada, vivos/mortos, teste hiposmótico e níveis séricos de testosterona. Os resultados (media \pm desvio padrão) obtidos nos momentos D0, D90 e D150 foram motilidade 76.66% \pm 13.7, 92.77 \pm 4.41 e 93.0 \pm 7.90 (p=0.001); espermatozoides normais 69.11% \pm 24.90, 90.00% \pm 5.15 e 80.66 \pm 16.04 (p=0.05); vivo/mortos (%) de 64.44 \pm 22.86 para 85.33 \pm 8.41 (p=0.001); espermatozoides (%) com membrana íntegra ao teste hiposmótico que era de 76.44 \pm 20.74 e foi para 91.22 \pm 4.68 (p=0.05). Os valores séricos de testosterona (ng/mL) aumentaram de 5.50 \pm 1.13 passando para 8.84 \pm 1.13 em D90 (p=0.003) e após 2 meses (D150) diminuíram para 5.13 \pm 1.13. Em conclusão, a suplementação de óleo de salmão por 90 dias influenciou positivamente a qualidade do sêmen e níveis séricos de testosterona. A suplementação de ômega 3 e 6, na proporção 10:1 por 90 dias, proporcionou aumento de concentração, motilidade espermática de cães e esse efeito se manteve por 60 dias, com exceção da testosterona.

Palavras-chave: ômega 3, ácidos graxos poliinsaturados, espermatozoide, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effects of the use of fish oil on seminal parameters and serum levels of testosterone in dogs, being the evaluation during and after treatment. Nine healthy male dogs of different breeds were weighed between 10 and 36 kg with ages varying from 2 to 11 years and with proven fertility. Evaluations occurred at baseline (D0), at 90 days (D90) and at the end of the experiment (D150). The animals were supplemented up to 90 days with fish oil at the manufacturer's recommended dosage (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA), but the evaluations continued for a further 60 days. The parameters measured were: volume, motility, vigor, sperm concentration, normal spermatozoa, head defects, intermediate defects, tail defect, detached head, live / dead, hypoosmotic test and serum testosterone levels. The results (mean \pm standard deviation) obtained at moments D0, D90 and D150 were 76.66% \pm 13.7, 92.77 \pm 4.41 and 93.0 \pm 7.90 motility ($p = 0.001$); normal spermatozoa 69.11% \pm 24.90, 90.00% \pm 5.15 and 80.66 \pm 16.04 ($p = 0.05$); live / dead (%) from 64.44 \pm 22.86 to 85.33 \pm 8.41 ($p = 0.001$); spermatozoa (%) with integrity membrane to the hypoosmotic test which was 76.44 \pm 20.74 and was to 91.22 \pm 4.68 ($p = 0.05$). Serum levels of testosterone (ng / mL) increased from 5.50 \pm 1.13 to 8.84 \pm 1.13 in D90 ($p = 0.003$) and after 2 months (D150) decreased to 5.13 \pm 1.13. In conclusion, 90-day supplementation of fish oil had a positive influence on semen quality and serum testosterone levels. The supplementation of 3 e 6 omega at the ratio of 10: 1 for 90 days provided increased concentration, sperm motility of dogs and this effect was maintained for 60 days, with the exception of testosterone.

Key words: omega 3, polyunsaturated fatty acids, spermatozoa, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos ômega-3 são assim denominados por possuírem sua primeira dupla ligação no carbono 3 a partir do radical metil e que apresentam mais de uma dupla ligação entre carbonos são denominados ácidos poliinsaturados (PUFAs). Os ácidos graxos poliinsaturados não podem ser sintetizados endogenamente, devem ser providos via dieta. São encontrados em grande quantidade nos óleos de peixes marinhos, como sardinha, salmão, atum, arenque, anchova, entre outros (peixes que vivem em águas profundas e frias), e também em algas marinhas e nos óleos e sementes de alguns vegetais, como a linhaça, por exemplo. Os mais pesquisados e que possuem maiores benefícios à saúde são o EPA - ácido eicosapentaenoico e o DHA - ácido docosaenoico, presentes principalmente nos óleos de peixes (CHOLEWSKI et al., 2018). Em se tratando especificamente do óleo de salmão, este possui níveis elevados de EPA (0,5g/100g de salmão) e DHA (1,3g/100g de salmão) (CALDER, 2017) dentre as diversas espécies de peixes consumidas.

A composição de ácidos graxos da membrana dos espermatozoides é altamente importante para uma adequada função espermática. A membrana da célula espermática desempenha um papel crítico nos principais eventos de fertilização, como capacitação, reação acrossômica e fusão espermatozoide-

oócito (Flesch and Gadella, 2000). A quantidade de PUFAs, particularmente o ácido docosaenoico, na membrana da célula espermática diminui à medida que o espermatozoide amadurece (OLLERO et al., 2000). DHA representa 20% do conteúdo de ácidos graxos em espermatozoides maduros, comparado com apenas 4% em células germinais imaturas (LENZI et al., 2000). DHA possui seis ligações duplas que contribuem para um dobramento peculiar de sua molécula, que confere uma fluidez e flexibilidade muito características às membranas celulares dos espermatozoides. A ingestão desses ácidos graxos e de suas fontes alimentares tem sido relacionada à melhora da qualidade do sêmen (AFEICHE et al., 2014; GONZÁLEZ-RAVINA et al., 2018) em homens.

Dietas suplementadas com óleo de peixe, que é rico em EPA e DHA, aumentaram as concentrações de DHA testicular em roedores (SEBOKOVA et al., 1990) e de DHA na membrana espermática em humanos (SAFARINEJAD, 2010). Outros pesquisadores demonstraram um aumento dos níveis de ômega 3 (principalmente EPA) no líquido seminal de cães, após suplementação de óleo de peixe (RISSO et al., 2015).

A composição dos ácidos graxos da membrana da célula espermática é oriunda de um metabolismo local altamente especializado. As células de Sertoli expressam a D⁶-dessaturase e a D⁵-dessaturase que são responsáveis pelos processos de alongação e dessaturação de PUFAs e seus produtos são utilizados na espermatogênese (SAETHER et al., 2003).

A quantidade de DHA na membrana espermática foi associada com maior motilidade, morfologia e concentração (GONZÁLEZ-RAVINA et al., 2018; GULAYA e MARGITICH, 2001; SAFARINEJAD et al., 2010; TAVILANI et al., 2007). Em outras espécies animais foi relatado melhora na integridade do acrossoma e da membrana espermática (FREITAS et al., 2016) em cavalos; elevação da motilidade, viabilidade e integridade de membrana (SAFARI et al., 2018) em galos; um aumento significativo no volume de sêmen e número total de espermatozoides (MURPHY et al., 2017) em suínos; melhora da qualidade espermática em búfalos (TRAN et al., 2016) e em carneiros (ESMAEILI et al., 2012). No entanto, o uso de PUFAs como suplemento alimentar para aumentar a qualidade do sêmen ou para tratar a degeneração testicular ainda não foi totalmente elucidado em cães. Todos os trabalhos que avaliaram os efeitos de PUFAs na qualidade espermática se detiveram somente na observação imediata dos resultados, não sendo mensurado a durabilidade do(s) efeito(s).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a ingestão do óleo de salmão influenciou a qualidade de sêmen canino e níveis séricos de testosterona, 60 dias após cessado tratamento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e desenho experimental

Os dados foram coletados entre setembro de 2017 até março de 2018. Este estudo foi aprovado no comitê de ética da UENF (CEUA-UENF) sob o protocolo de número 393. Foram utilizados nove cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 10 a 36 Kg com idades variando de 2 a 11 anos e com histórico de fertilidade comprovada. Os cães permaneceram com seus

proprietários durante todo o estudo. Os animais foram avaliados em três períodos: no início do experimento (D0), aos 90 dias (D90) e aos 150 dias (D150) final do estudo. Os animais receberam suplementação de óleo de peixe na dosagem recomendada pelo fabricante durante 90 dias (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA), onde a cada 3,5 mL do produto continha: ômega 3 – 935 mg; ômega 6 – 95 mg; DHA – 355 mg; EPA – 320 mg, as avaliações permaneceram até aos 150 dias (D150).

2.2. Coleta de sêmen e avaliação espermática

O sêmen foi coletado por estimulação manual. Após a coleta, o volume da fração espermática (mL) foi determinado usando um tubo graduado. A concentração espermática (sptz $\times 10^6$ / mL) foi determinada em uma câmara de Bürker (n° de sptz contados $\times 100 \times 1000 \times$ a diluição utilizada)(WHO, 2010), seguida de um cálculo contagem total de espermatozoides (sptz $\times 10^6$ mL \times volume espermático = sptz total). O vigor, subjetivo, definido como a linearidade e a qualidade do movimento espermático, foi avaliado com escore de 0 a 5, conforme descrito anteriormente (CBRA, 2013). A motilidade (MOT), expressa em porcentagem, foi obtida imediatamente após a coleta, retirando-se 10 μ L de sêmen, depositado entre lâmina e lamínula e visualizada por microscopia de luz com aumento de 400x em 10 campos, em placa aquecida a 37°C. Foram avaliados 200 espermatozoides em câmara úmida com a coloração Rosa Bengala(WHO, 2010), determinando-se o percentual de espermatozoides normais (SPTZ normais) e defeituosos. Os espermatozoides defeituosos foram agrupados em defeito de cabeça, de peça intermediária e de cauda, todos os valores em porcentagem. Também foi avaliado o número de cabeças destacadas encontradas (%). A relação de vivos/mortos (%) foi determinada pelo teste supravital (coloração eosina/nigrosina)(WHO, 2010). Para o método de coloração de eosina-nigrosina, os esfregaços de sêmen foram preparados misturando-se suavemente cerca de 10 μ L de eosina-nigrosina com volume semelhante de sêmen em uma lâmina microscópica mantida a 37 ° C. A mistura foi espalhada suavemente usando uma lâmina de vidro limpa, e os esfregaços foram secos ao ar (WHO, 2010). A integridade da membrana citoplasmática (%) dosespermatozoides foi realizada pelo teste hiposmótico (HOST) (DREVIUS e ERIKSSON, 1966), onde tais espermatozoides são denotados como edemaciados ou HOS reativos (HOS +), significando membranas funcionalmente intactas.

2.3. Avaliação da testosterona

Para adosagem da testosterona (T), os animais foram submetidos ao teste de estímulo (ROMAGNOLI et al., 2012) com aplicação intramuscular de 50 μ g de gonaderilina GnRH (Fertagyl®), evitando assim a flutuação sérica do hormônio ao longo do dia. A amostra sanguínea foi obtida por venopunção da veia cefálica nos dias D0, D90 e D150. O sangue foi centrifugado a 1400x g por 5 minutos e o soro foi colhido e estocado em freezer a -20°C. A testosterona foi determinada

por quimioluminescência (Immulite® 1000, Medical System, Genova, Italy) e todas as amostras foram avaliadas juntas.

2.4. Análise estatística

Foi realizada a consistência dos dados, o teste de normalidade e estatística descritiva das variáveis em estudo (PROC UNIVARIATE e PROC MEANS, SAS 2016). A análise de variância incluiu o efeito fixo do período e considerado o efeito repetido de cada animal (PROC MIXED, SAS, 2016). Foi realizado teste pdiff para a comparação das médias, o nível de significância foi $P < 0.05$.

3. Resultados

Os resultados das análises espermáticas e níveis séricos de testosterona são demonstrados na Tabela 1. Observa-se aumento da motilidade em D90, período em que os animais ficaram sob o tratamento e queda aos D150. A porcentagem de espermatozoides vivos aumentou ao longo dos meses (D90) e permaneceu nesse patamar até D150 ($p=0.05$). Observamos também que este parâmetro apresentou uma menor dispersão dos dados (evidenciada pelo desvio padrão) em D90 quando comparado aos outros períodos (D0 e D150), indicando uma homogeneidade do grupo neste momento (D90). Observou-se aumento do percentual de espermatozoides vivos ($p=0.001$) em D90 e mantendo-se até D150. Também foi verificada elevação dos valores percentuais de espermatozoides com membrana íntegra ao teste hiposmótico no D90 e seus valores mantidos até D150. Com relação aos valores de testosterona, notou-se uma elevação dos níveis séricos, tendo o pico máximo ao D90 ($p=0.003$) e com diminuição nos meses subsequentes (figura 1). As demais variáveis não foram afetadas com o tratamento de óleo de salmão.

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen fresco de 9 cães, submetidos em diferentes períodos: a suplementação oral de óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90 e D150).

PARÂMETRO	D0	D90	D150	p valor
Volume (1,0-6,0)	1,90±0,85	3,27±1,60	2,55±1,71	0,15
Motilidade (50,0-98,0)	76,66±13,7 ^b	92,77±4,41 ^a	93±7,90 ^a	0,001
Vigor (2,5-5,0)	3,27±0,44	3,67±0,61	3,89±0,82	0,15
sptz/mL(x10⁶) (80,0-1614,0)	283,44±125,88	357,44±291,90	455,33±483,17	0,56
sptz/mL(x10⁶) x volume (80,0-2421,0)	585,11±442,34	1000,38±616,40	1020,16±819,56	0,29
sptz Normais (%) (43,0-97,0)	69,11±24,90 ^b	90,00±5,15 ^a	80,66±16,04 ^{ab}	0,05
Defeito de cabeça (%) (0,0-3,0)	0,33±0,70 ^b	0,89±0,93 ^{aab}	1,33±0,70 ^a	0,04
Defeito de peça intermediária (%) (1,0-62,0)	19,22±21,15	2,78±2,73	10,33±14,95	0,08
Defeito de cauda (%) (0,0-29,0)	7,44±8,55	5,11±3,82	6,78±5,02	0,71
Cabeça destacada (%) (0,0-5,0)	0,56±0,88	1,22±1,92	1,11±1,54	0,61
Vivos/mortos (%) (20,0-99,0)	64,44±22,86 ^b	85,33±8,41 ^a	92,89±5,35 ^a	0,001
HOST (%) (31,0-98,0)	76,44±20,74 ^b	91,22±4,68 ^a	87,67±5,85 ^a	0,05
Testosterona (ng/mL) (1,58-13,37)	5,50±1,13 ^b	8,84±1,13 ^a	5,13±1,13 ^b	0,003

Letras minúsculas diferente nas linhas indicam diferenças significativas entre os períodos (D0, D90 e D150) ($p \leq 0,05$).

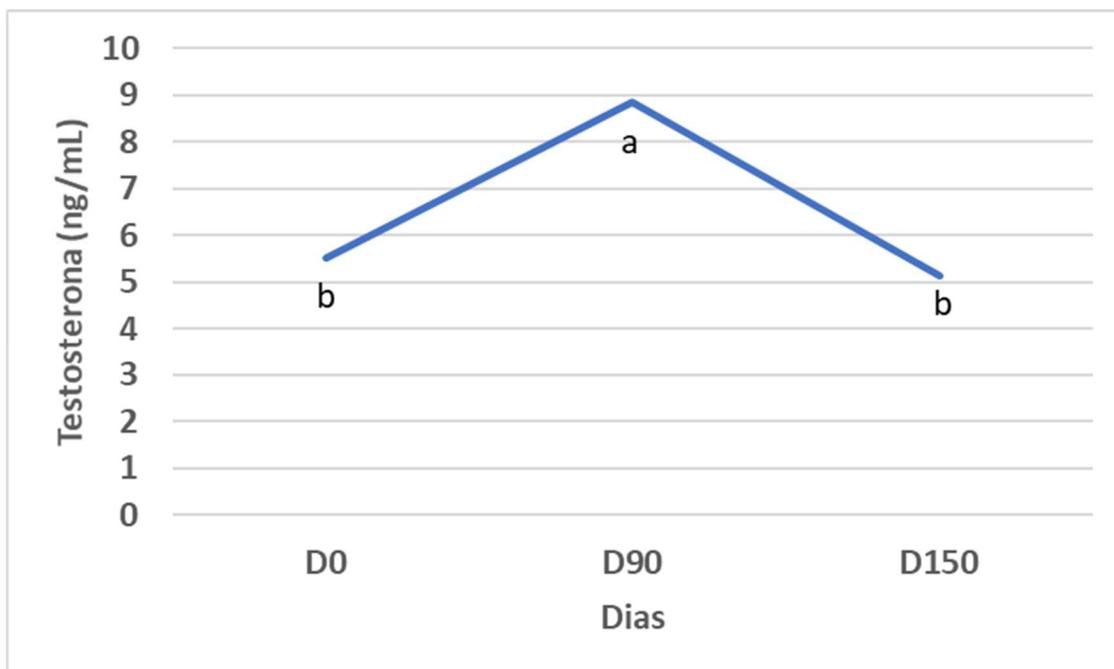


Figura 1. Efeito da suplementação de óleo de salmão (90 dias), nos níveis séricos de testosterona em 9 cães machos ao longo de 150 dias.

4. Discussão

Vários estudos utilizaram em suas metodologias diferentes períodos de suplementação de PUFAs, variando entre 60 dias, 16 semanas, 30 semanas até 174 dias (FREITAS et al., 2016; LIN et al., 2016; LIU et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017). Até o momento somente um estudo abordou o efeito residual após cessada a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (RODRIGUES et al., 2017). Acreditamos que o nosso experimento seja o primeiro a avaliar possíveis alterações 60 dias depois de interrompido o tratamento. Observamos que a motilidade, percentual de espermatozoides normais, percentual de vivos/mortos e teste hiposmótico, mantiveram seus efeitos por mais 2 meses após suspensão do fornecimento de óleo de salmão.

A testosterona se comportou diferentemente, onde seus valores caíram depois da interrupção do tratamento.

Em estudo conduzido por Risso et al. (2015), relataram que não houve aumento dos níveis séricos de testosterona em cães suplementados com óleo de peixe por 120 dias. Diferentemente em nosso estudo, os valores da testosterona aumentaram e seu pico alcançado em D90. Tal diversidade de resultados talvez possa ser esclarecida pelo percentual de ômega 3 presente no óleo de peixe fornecido por Risso et al. (2015) aos animais que foi de 25,6% contra 29% do produto usado em nosso experimento. Além disso, a concentração por nós utilizada foi de 93,5 mg/Kg de peso vivo, contra 54 mg/Kg de peso vivo no estudo de Risso et al. (2015). Acreditamos, portanto, que a dosagem elevada utilizada em nosso experimento, tenha influenciado o aumento dos níveis séricos de testosterona.

Nossa hipótese de que o uso do óleo de peixe influenciaria os parâmetros seminais foi confirmada pela melhora da motilidade, aumento do percentual de espermatozoides vivos e elevação da testosterona. Tais resultados estão alinhados com os descritos por outros autores (ROCHA et al., 2009; GONZÁLEZ-RAVINA et al., 2018; NASSAN et al., 2018; RISSO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

O melhoramento espermático pode ser devido a mudanças no perfil fosfolipídico dos espermatozoides, pela ingestão de uma fonte rica de EPA e DHA (óleo de peixe) (GONZÁLEZ-RAVINA et al., 2018). Embora haja um grande número de etapas complexas na transformação das espermatogônias em espermatozoides maduros, o foco em algumas mudanças importantes pode facilitar a discussão de como o insumo nutricional afeta esse processo complexo. Em primeiro lugar, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma antes de deixar o testículo, e a condensação da cromatina dos espermatozoides ocorre após progredirem da cabeça do epidídimo para a cauda (JOHNSON, 1995). Esses processos incluem reações repetidas de oxidação (FLESCH e GADELLA, 2000). O estresse oxidativo é uma condição que reflete um desequilíbrio entre a manifestação sistêmica de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar prontamente (defesas antioxidantes) (AGARWAL et al., 2014a). Uma mínima quantidade de estresse oxidativo “fisiológico” é necessária para que o espermatozoide realize suas funções primárias, como por exemplo a capacitação (AGARWAL et al., 2014a). Contudo, um excessivo aumento de radicais livres espermático pode ser deletério e causar subfertilidade (AGARWAL et al., 2014b). A presença de DHA é mais elevada em espermatozoides imaturos que em espermatozoides maduros, evidenciando o papel antioxidativo do ácido docosaenoico e, portanto, minimizando o dano peroxidativo (OLLERO et al., 2000). Portanto, é possível que o DHA também possa desempenhar um papel na regulação da espermatogênese. Se for esse o caso, intervenções direcionadas para alterar o conteúdo de DHA em espermatozoides de células germinativas imaturas poderiam afetar a maturação espermática. A elevação da produção de ROS pode afetar a função mitocondrial do espermatozoide e, conseqüentemente a sua motilidade (OLLERO et al., 2000). Tal fato foi observado em nosso estudo, que após a ingestão de óleo de peixe, notou-se um aumento da motilidade espermática aos 90 dias pós tratamento e permanecendo neste patamar até 150 dias. Estes resultados estão similares com Rocha et al. (2009), que relatou positivo efeito de no aumento da motilidade, vigor e redução de espermatozoides defeituosos, utilizando uma dieta suplementada com ômega 3, 6 e 9, enriquecida com vitamina E.

Pesquisadores concluíram que uma maior saturação dos fosfolipídios da membrana da célula espermática acarreta uma baixa qualidade seminal. Por outro lado, a proporção de ácidos graxos altamente insaturados (PUFAs) foi correlacionada positivamente com a proporção de espermatozoides com membranas intactas (Garcia et al. 2011). Tal fato foi evidenciado em nosso estudo com o aumento do percentual de espermatozoides com membranas intactas (vivo/mortos) aos 90 dias. A elevação do percentual de espermatozoides

vivos, após suplementação, também pode ser embasada pela redução de danos ao DNA, já que espermatozoides disfuncionais possuem uma debilidade na compactação da cromatina, tornando-os mais vulneráveis aos ataques de ROS que provoca a fragmentação do DNA espermático, acarretando em morte celular (AGARWAL et al., 2014a). Uma outra possibilidade para elucidar a melhora dos índices espermáticos é que tenha ocorrido um aumento da concentração de DHA no líquido epididimário, principalmente na cauda do epidídimo (LENZI et al., 2000) sendo incorporados na membrana espermática. Em cães esse processo de incorporação ocorre nos estágios finais da maturação (RAMOS ANGRIMANI et al., 2017).

A testosterona produzida pelas células de Leydig nos testículos é essencial para o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e outras características masculinas. Suplementos de ácidos graxos também podem ter efeitos energéticos na reprodução através do aumento da função hipofisária ou gonadal, ou ambos (WATHES et al., 2007). Foi relatado que os ácidos graxos insaturados melhoram a esteroidogênese in vivo através da expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) (HUGHES et al., 2011; JEFCOATE, 2006; WADE et al., 1994; WANG et al., 2000) e alteram a função dos fatores de transcrição (WATHES et al., 2007). Sebokova et al. (1990) postularam que a ingestão de PUFAs altera a responsividade das células de Leydig alterando a atividade da adenil ciclase e a síntese de testosterona, sugerindo que a modificação da composição lipídica da membrana plasmática testicular pelo tratamento dietético afeta a acessibilidade dos receptores LH/hCG e que a ligação do LH estava associada ao maior número de receptores. Em nosso estudo, os níveis séricos de testosterona aumentaram após suplementação (D90). Este achado evidencia que a ingestão de óleo de salmão possivelmente afetou a composição fosfolipídica da membrana plasmática das células testiculares, alterando a expressão e afinidade dos receptores gonadotrópicos e influenciou a taxa de síntese de testosterona.

Podemos inferir, pelos resultados deste estudo, que a linhagem de células germinativas e as células de Sertoli possuem um metabolismo lipídico ativo que produz um rearranjo da constituição dos ácidos graxos, causando um alongamento e dessaturação dos mesmos, essenciais durante a espermatogênese e possivelmente também durante o processo de maturação dos espermatozoides. Tal metabolismo seria responsável pela alteração do perfil fosfolipídico da membrana espermática reduzindo o estresse oxidativo e favorecendo a melhora dos parâmetros seminais.

5. Conclusão

A suplementação de óleo de salmão por 90 dias, influenciou a qualidade do sêmen e níveis séricos de testosterona. A manifestação dos efeitos perdurou por aproximadamente 2 meses após cessado tratamento, com exceção da testosterona que mostrou queda de seus valores quando interrompido o fornecimento do óleo de salmão.

6. Agradecimentos

Agradecimento a empresa Grizzly pet products® pelo fornecimento do óleo de salmão. A Universidade de Padova, a CAPES e ao Programa Doutorado Sanduiche no Exterior.

Referências:

AFEICHE, M. C. et al. Processed Meat Intake Is Unfavorably and Fish Intake Favorably Associated with Semen Quality Indicators among Men Attending. **The Journal of Nutrition**, n. 17, 2014.

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014a.

AGARWAL, A. et al. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 4, p. 206–216, 9 ago. 2014b.

CALDER, P. C. Omega-3: The good oil. **Nutrition Bulletin**, p. 132–140, 2017.

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. **A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids**. [s.l: s.n.]. v. 10

DA ROCHA, A. et al. Effect of Daily Food Supplementation with Essential Fatty Acids on Canine Semen Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 313–315, jul. 2009.

DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, n. 1, p. 136–156, 1966.

ESMAEILI, V. et al. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia**, v. 46, n. 1, p. 42–49, 2012.

FLESCH, F. M.; BAREND M. GADELLA. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization Frits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 20, n. 5, p. 197–235, 2000.

FREITAS, M. L. et al. Quality of Fresh, Cooled, and Frozen Semen From Stallions Supplemented with Antioxidants and Fatty Acids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 46, p. 1–6, 2016.

GONZÁLEZ-RAVINA, C. et al. Effect of dietary supplementation with a highly pure and concentrated docosahexaenoic acid (DHA) supplement on human sperm function. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 3, p. 282–288, 2018.

HUGHES, J. et al. Effects of omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids on ovine follicular cell steroidogenesis, embryo development and molecular markers of fatty acid metabolism. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 105–118, 2011.

JEFCOATE, C. R. Liver X receptor opens a new gateway to StAR and to steroid hormones. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1832–1835, 2006.

LENZI, A. et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells.

Molecular Human Reproduction, v. 6, n. 3, p. 226–231, 2000.

LIN, Y. et al. Effects of different dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on boar reproduction. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 31, 2016.

LIU, Q. et al. Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen antioxidant status and semen quality parameters. **Andrologia**, n. October 2016, p. 1–8, 2017.

MURPHY, E. M. et al. The effect of dietary supplementation of algae rich in docosahexaenoic acid on boar fertility. **Theriogenology**, v. 90, p. 78–87, 2017.

N. M. GULAYA, V. M. MARGITICH, N. M. PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF HUMAN SPERM AND SEMINAL PLASMA IN RELATION TO SPERM FERTILITY. **Archives of Andrology**, v. 46, n. 3, p. 169–175, 9 jan. 2001.

NASSAN, F. L.; CHAVARRO, J. E.; TANRIKUT, C. Diet and men's fertility: does diet affect sperm quality? **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 4, p. 570–577, 2018.

OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 326–334, 2000.

RAMOS ANGRIMANI, D. S. et al. Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2017.

RISSO, A. et al. Effect of long-term fish oil supplementation on semen quality and serum testosterone concentrations in male dogs. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 10, n. 2, p. 223–231, 2015.

RODRIGUES, A. C. et al. Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 5, p. 3069–3076, 2017.

ROMAGNOLI, S. et al. Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7-mg deslorelin implant in adult male dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 389–392, 2012.

SAETHER, T. et al. Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. **Biol Reprod**, v. 69, n. 1, p. 117–124, 2003.

SAFARI ASL, R. et al. Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. **Cryobiology**, v. 84, n. April, p. 15–19, 2018.

SAFARINEJAD, M. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic antioxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: A double blind, placebocontrolled, randomized study. **Urology**, v. 74 (4 SUPP, p. S96, 2010.

SAFARINEJAD, M. R. et al. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 1, p.

100–105, 2010.

SANTOS, M. C. et al. **The effects of omega 3 (fish oil) supplementation on canine semen quality and in serum testosterone levels.** EVSSAR. **Anais...**2016

SEBOKOVA, E. et al. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 610–618, 1990.

TAVILANI, H. et al. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 1, p. 45–50, 2007.

TRAN, L. V. et al. Effect of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on plasma IGF-1 and testosterone concentration, puberty and semen quality in male buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 63–72, 2016.

WADE, M. G. et al. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 1, p. 131–9, 1994.

WANG, X. et al. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20204–20209, 2000.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190–201, 2007.

WHO. Examination and processing of human semen. **WHO Press**, v. 5th Editio, p. 286, 2010.

5. ARTIGO II - Efeito da suplementação de óleo de salmão em cães: parâmetros dopplervelocimétricos, ecotextura testicular, volume testicular e epididimário e níveis séricos de testosterona.

Effect of salmon oil supplementation in dogs: dopplervelocimetric parameters, testicular echotexture, testicular and epididymal volume and serum testosterone levels.

M.C. Santos¹, C. Milani², P.Zucchini², S. Romagnoli², C.R. Quirino¹, I.C.N. Cunha¹

1 – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

2 – Universidade De Padova, Legnaro, PD, Itália.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do uso do óleo de salmão nos parâmetros seminais e níveis séricos de testosterona em cães, sendo a avaliação durante e após tratamento. Foram utilizados oito cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 23 a 38 Kg com idades variando de 2 a 8 anos e com histórico de fertilidade comprovada. As avaliações ocorreram no início (D0), aos 90 dias (D90) e no final do experimento (D150). Os animais foram suplementados até 90 dias com óleo de salmão na dosagem recomendada pelo fabricante (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA). Após este período o tratamento foi suspenso, porém as avaliações continuaram por mais 60 dias. Os parâmetros mensurados foram: volume, motilidade, vigor, concentração espermática e níveis séricos de testosterona. As avaliações ultrassonográficas compreenderam os parâmetros Doppler velocimétricos das artérias testiculares, volume testicular e epididimário e ainda a ecotextura testicular com auxílio do software ImageJ. A suplementação aumentou a motilidade espermática. Demais parâmetros seminais não foram influenciados. Os valores dos índices: Velocidade de Pico Sistólico (VPS), Velocidade Diastólica Final (VDF) nas artérias suprategesticulares (AST) e artéria marginal (AM) sofreram aumento durante o período de tratamento e permaneceram nesse patamar até D150. Não houve diferenças entre o período suplementado e não suplementado dos valores das características: ecogenicidade, heterogeneidade, volume testicular e volume epididimário. Não foi observado diferença dos parâmetros entre o testículo direito e esquerdo, bem como entre epidídimo esquerdo e direito. Foi encontrada correlação negativa entre heterogeneidade e produção espermática ($r=-0,41$; $p=0,008$). Os valores séricos de testosterona (ng/mL) aumentaram de $5,50\pm 1,13$ passando para $8,84\pm 1,13$ em D90 ($p=0,003$) e diminuíram para $5,13\pm 1,13$ (D150). Em conclusão, a suplementação de óleo de peixe por 90 dias influenciou a qualidade do sêmen e níveis séricos de testosterona. Os índices Doppler velocimétricos foram afetados pela suplementação de óleo de salmão, acarretando em aumento

do fluxo sanguíneo testicular. A diminuição da heterogeneidade foi associada com aumento da produção espermática. O volume do testículo e epidídimo não foram afetados pela suplementação do óleo de peixe.

Palavras-chave: Canino, ômega 3, ácidos graxos poliinsaturados, ecografia, ecogenicidade, pixel.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effects of the use of fish oil on seminal parameters and serum levels of testosterone in dogs, being the evaluation during and after treatment. Eight healthy male dogs of different breeds that weighed between 23 and 38 kg with ages ranging from 2 to 8 years and with a proven fertility record. Evaluations was performed at baseline (D0), at 90 days (D90) and at the end of the experiment (D150). The animals were supplemented until 90 days with fish oil at the dosage recommended by the manufacturer (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA). After this period the treatment was suspended, but the evaluations continued for another 60 days. The parameters measured were: volume, motility, vigor, sperm concentration and serum levels of testosterone. Ultrasonographic evaluations included the velocimetric Doppler parameters of the testicular arteries, testicular and epididymal volume, and testicular echotexture with the aid of ImageJ software. Supplementation increased sperm motility. Other seminal parameters were not influenced. The values of the indexes: Systolic peak velocity (VPS), final diastolic velocity (VDF) in the suprastesticular arteries (AST) and marginal artery (AM) increased during the treatment period and remained at this level up to D150. There were no differences between the supplemented and unsupplemented period of the characteristics values: echogenicity, heterogeneity, testicular volume and epididymal volume. No differences were observed in the parameters between the right and left testicles, as well as between the left and right epididymis. A negative correlation was found between heterogeneity and sperm production ($r = -0.41$, $p = 0.008$). Serum values of testosterone (ng / ml) increased from 5.50 ± 1.13 to 8.84 ± 1.13 in D90 ($p = 0.003$) and decreased to 5.13 ± 1.13 (D150). In conclusion, fish oil supplementation for 90 days influenced semen quality and serum testosterone levels. Velocimetric Doppler indices were affected by fish oil supplementation, leading to an increase in testicular blood flow. The decrease in heterogeneity was associated with increased sperm production. The volume of the testis and epididymis were not affected by fish oil supplementation.

Key words: Canine, omega 3, polyunsaturated fatty acids, echography, echogenicity, pixel.

1. INTRODUÇÃO

A ultrassonografia tornou-se um dos grandes avanços na reprodução animal desde o desenvolvimento da escala cinza e das imagens dinâmicas em tempo real no início da década de 80 (GINTHER, 2014), apresentando-se como método de diagnóstico complementar para diferentes afecções e avaliação das funções

reprodutivas de fêmeas e machos. Os avanços tecnológicos na computação e a sua aplicação direta na ultrassonografia permitiram melhor processamento das imagens. O advento do ultrassom modo B, também conhecido como “modo de brilho” ou “bidimensional”, proporcionou nitidez em tempo real, com habilidade de diagnosticar movimentos, a obtenção de imagens precisas e bidimensionais de pontos (pixels) de um corte transversal de tecido, relatado pela primeira vez na década de 80 (PALMER; DRIANCOURT, 1980), o que possibilitou maior exatidão e eficiência dos exames ultrassonográficos (BUCKRELL, 1988; GINTHER, 2014; GRIFFIN e GINTHER, 1991). O uso da ultrassonografia modo B como método confiável e não invasivo para avaliação testicular de animais domésticos tem sido descrito (BUCKRELL, 1988; CARTEE et al., 1989; ENGLAND, 1991) e vem se tornando importante teste complementar, especialmente em se tratando de desordens subclínicas (SIHAG et al., 2018). No entanto, a ultrassonografia é uma técnica que depende principalmente da correta interpretação das imagens, com a diferenciação entre artefatos e ecos representativos, do operador e de um bom equipamento (GINTHER, 2014).

Nos últimos anos, a ultrassonografia com Doppler permitiu uma avaliação adicional dos órgãos reprodutivos, com informações úteis sobre o fluxo sanguíneo e a velocidade nos vasos dos órgãos reprodutivos (BARBOSA et al., 2013; DE FREITAS et al., 2015; SILVA et al., 2015). Diferenças dos índices dopplervelocimétricos foram encontradas entre cães pré e pós-púberes (DE SOUZA et al., 2015a) e em cães com infertilidade estabelecida (DE SOUZA et al., 2015b). Moxon et al. (2015), avaliaram a ecotextura testicular e prostática e relacionaram a ecogenicidade e heterogeneidade com a qualidade espermática. A ecotextura, ou a aparência ultrassonográfica de um tecido, pode ser avaliada pela determinação da intensidade e uniformidade do pixel. Cada pixel representa a capacidade de uma discreta unidade de tecido de transmitir ou refratar feixes de ultrassom de alta frequência que são traduzidas em uma escala de tons de cinza, variando de 0 – preto absoluto ao 255 – branco absoluto. Essa variação é em virtude das propriedades físicas das interfaces teciduais acústicas, ou seja, composição celular, água e conteúdo macromolecular (GINTHER e PIERSON, 1984).

O uso de ácidos graxos poli insaturados (PUFA) da família ômega 3 como o ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) foram correlacionados com mudanças na qualidade espermática, testosterona e fertilidade em humanos e cães (ESMAEILI et al., 2015; FERRAMOSCA et al. al., 2017; RISSO et al., 2015). Foi observado que os parâmetros reprodutivos seminiais em animais domésticos podem ser influenciados pela administração de óleos de peixe. Em particular, Risso et al. (2015) observou que no cão, a administração de óleo de peixe (*fish oil* -FO) através da dieta melhorou o espermograma aumentando a porcentagem de espermatozoides móveis, o número total de espermatozoides e a vitalidade total, bem como a morfologia normal total.

A pressão capilar e a tensão de oxigênio nos testículos são notavelmente baixas e a espermatogênese é consequentemente adaptada a um ambiente

semi-hipóxico (REYES et al., 2012), evitando os danos dos radicais livres de oxigênio ao sêmen, sobretudo ao DNA espermático (AITKEN, 1989; MAX, 1992; SETCHELL e BREED, 2006). O uso de PUFAs tem sido preconizado para a diminuição dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) ao processo espermatogênico, acarretando na melhora da qualidade seminal (DA ROCHA et al., 2009; SANTOS et al., 2016).

No entanto, a espermatogênese é um processo que requer não só uma funcionalidade completa do testículo, mas também uma perfusão correta, uma vez que é muito sensível com a redução do fluxo sanguíneo; estas reduções, ainda que pequenas, podem ter um grande impacto sobre a produção seminal (BERGH et al., 2001). Tem sido relatado que os estágios iniciais da espermatogênese são sensíveis a uma redução moderada no fluxo sanguíneo (BERGH et al., 2001) e o tratamento em cães com drogas redutoras de pressão arterial podem induzir danos nos túbulos seminíferos (NOLTE et al., 1995).

Em humanos, sabe-se que EPA e DHA desempenham diferentes efeitos protetores e benéficos no campo cardiovascular geral (FILIPOVIC et al., 2018). Alguns deles incluem uma redução na pressão sanguínea, redução da frequência cardíaca e a melhora da função vascular (reatividade vascular), o que parece ser a razão para a diminuição na pressão sanguínea (MORI, 2014). Quanto ao fato de PUFAs poderem suscitar alterações no sistema cardiovascular a nível de artérias testiculares, em medicina veterinária, não foram conduzidos qualquer tipo de estudo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi saber se a suplementação de óleo de salmão pode influenciar os níveis séricos de testosterona, a ecotextura testicular e a função vascular ao nível do sistema reprodutor masculino (testículos), analisando os parâmetros dopplervelocimétricos das artérias testiculares.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e desenho experimental

O estudo foi conduzido em Padova ao norte da Itália (coordenadas, 45° 24' 23" N 11° 52' 40" E), onde as quatro estações são bem definidas. O nosso experimento teve início em outubro de 2017 já no outono e com término em fevereiro de 2018, final do inverno. Este estudo foi aprovado no comitê de ética da UENF (CEUA-UENF) sob o protocolo de número 393. Foram utilizados oito cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 23 a 38 Kg com idades variando de 2 a 8 anos e com histórico de fertilidade comprovada. Os cães permaneceram com seus proprietários durante todo o estudo. Os animais foram avaliados no início do experimento (D0), aos D90 e ao final (D150), no período da manhã. Os primeiros 90 dias os animais receberam suplementação de óleo de peixe na dosagem recomendada pelo fabricante (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA), onde a cada 3,5 ml do produto continha: ômega 3 – 935 mg; ômega 6 – 95 mg; DHA – 355 mg; EPA – 320 mg. Passados os 90 dias iniciais (D90), a suplementação foi suspensa, contudo as avaliações permaneceram até aos 150 dias (D150). Ao chegarem ao

hospital veterinário, os cães permaneciam pelo menos 30 minutos de aclimação, para depois serem avaliados.

2.2. Coleta de sêmen e avaliação espermática

A coleta de sêmen foi realizada por estimulação manual. A fração rica em espermatozoides foi mantida a 37°C. O volume espermático (mL) foi determinado com auxílio de um tubo graduado. A concentração espermática (sptz x10⁶/ mL) foi determinada em uma câmara de Bürker (nº de sptz contados x 100 x 1000 x a diluição utilizada) (WHO, 2010), seguida de um cálculo da contagem total de espermatozoides (sptz x 10⁶mL x volume espermático = sptz totais no ejaculado). A motilidade (MOT) expressa em porcentagem, foi obtida imediatamente após a coleta, retirando-se 10µL de sêmen, depositado entre lâmina e lamínula e visualizada por microscopia de luz com aumento de 400x em 10 campos, em placa aquecida a 37°C. A porcentagem de espermatozoides vivos foi avaliada através de coloração vital eosina/nigrosina (LARSEN, 1977), e observados ao microscópio óptico (1000X). Os espermatozoides que se apresentaram corados pela nigrosina foram considerados mortos.

2.3. Avaliação da testosterona

Para a dosagem da testosterona (T), os animais foram submetidos ao teste de estímulo (ROMAGNOLI et al., 2012) com aplicação intramuscular de 50 mcg de gonaderilina GnRH (Fertagyl®), evitando assim a flutuação dos valores ao longo do dia (LARSEN, 1977). A amostra sanguínea foi obtida por venopunção da veia cefálica nos dias D0, D90 e D150. O sangue foi centrifugado a 1400x g por 5 minutos e o soro foi colhido e estocado em freezer a -20°C. A testosterona foi determinada por quimioluminescência (Immulite® 1000, Medical System, Genova, Italy).

2.4. Ultrassonografia

A avaliação ultrassonográfica foi realizada usando um Philips Affiniti 50 (Philips S.p A. Milano, Italy) com auxílio de um transdutor linear multi-frequencial de 5-18 MHz. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e o transdutor foi colocado sobre os testículos com aplicação prévia de gel ultrassonográfico sobre a pele.

Inicialmente os animais foram submetidos a ultrassonografia em modo B para as avaliações posteriores de ecogenicidade, homogeneidade, heterogeneidade e volume testicular. Para este propósito, foram realizadas duas seções, uma no plano longitudinal (utilizando o mediastino como ponto de referência para determinação do comprimento e altura testiculares) e outra no plano transversal para determinação da largura. A fórmula utilizada para calcular o volume

testicular foi a fórmula elipsoide: comprimento (L) × largura (W) × altura (H) × 0,5236 (PALTIEL et al., 2002).

Na avaliação Doppler velocimétrica das artérias testiculares foi utilizado modo Duplex para visualizar a artéria testicular de ambos testículos, dividida em três ramos: artéria supratesticular (AST) a artéria marginal (AM) e artérias intratesticulares (AIT). Vasos sanguíneos e fluxo foram identificados pelas cores vermelha (sangue fluindo em direção ao transdutor) e azul (sangue fluindo do transdutor) nos testículos direito e esquerdo. A avaliação do Doppler pulsado foi realizada após a localização da artéria testicular. O *gate* Doppler (tamanho da amostra) foi colocado na luz do vaso e o fluxo sanguíneo arterial foi representado graficamente como uma onda. Três ondas foram escolhidas e medidas, e os seguintes parâmetros dopplervelocimétricos foram avaliados: velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), índice de resistência (IR) e índice de pulsatilidade (IP). O IR e o IP foram registrados e calculados automaticamente pela máquina de ultrassom: $IR = (VPS - VDF / VPS)$; $IP = (VPS - VDF / M)$, onde M é a média entre VPS e VDF (MIDDLETON et al., 1989). O tamanho da amostra (*gate*) foi 2/3 do tamanho do vaso. O ângulo de insonação usado (abaixo de 60°) e o mesmo operador realizou cada exame. A repetição de frequência de pulso (PRF) foi ajustada para a visualização dos vasos menos calibrosos.

2.5. Mensuração da ecogenicidade e homogeneidade

Imagens digitalizadas dos testículos em cortes transversais e longitudinais foram utilizadas para as medições com auxílio de um software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), onde os valores foram expressos em intensidade de pixels (IPx). Para medir a ecogenicidade dentro dos testículos, dois pontos de referência (um dorsal e outro ventral) foram selecionados na cápsula (túnica albugínea) hiperecogênica dos testículos. Cada ponto selecionado possuía dimensões de 2,0 x 0,5 mm² sempre tendo como referência o mediastino testicular. Outras dez regiões foram escolhidas aleatoriamente no parênquima testicular (cada quadrado com 2,0 mm²) evitando o mediastino central. Para o cálculo da ecogenicidade da região de interesse, foi utilizada a seguinte fórmula: Porcentagem de ecogenicidade = (média do IPx da cápsula/média do IPx do parênquima testicular) x 100 (MOXON et al., 2015). A heterogeneidade testicular foi calculada como o desvio padrão da média da ecogenicidade. Usando este método, valores baixos (baixa variação entre regiões de interesse) representaram tecidos mais homogêneos, enquanto valores altos para heterogeneidade (alta variação entre as regiões de interesse) representaram tecidos menos homogêneos. Para esta etapa, a elaboração dos dados, foi realizado por dois operadores independentes.

2.6. Análise estatística

Foi realizada a consistência dos dados, teste de normalidade e estatística descritiva. A análise de variância foi conduzida (SAS 9.4 version, 2019 - SAS

Institute Inc., Cary, NC) utilizando modelo o procedimento GLM onde o período foi efeito fixo e cada animal foi considerado um efeito repetido. Foi realizado teste SNK para a comparação das médias, o nível de significância foi $P < 0.05$. Os parâmetros seminais, ecogenidade e heterogenicidade foram submetidos análise de correlação linear de Person.

3. Resultados

Os resultados dos parâmetros seminais e níveis séricos de testosterona são mostrados na tabela 1. Observou-se aumento da motilidade nos períodos em que os animais ficaram sob o tratamento (D0-D90) e seu efeito, após cessado tratamento (D90), perdurou até o D150 ($p=0,0031$). As demais características seminais não variaram estatisticamente ao longo dos 150 dias. Foram encontradas diferenças significativas entre os valores séricos de testosterona com aumento aos D90 ($p=0.003$) e queda aos D150 (figura 1).

A ultrassonografia Doppler mostrou que o formato espectral da onda das três artérias mensuradas foi do tipo monofásico, com picos sistólicos, fluxo diastólico contínuo e baixa resistência vascular. Na Tabela 2, encontram-se os índices VPS, VDF, IR e IP dos 8 animais, ao longo de todo o período do estudo. Os dados expostos apresentaram uma diferença significativa em D90 do parâmetro VPS da artéria supratesticular em ambos testículos (figura 2 e 3), permanecendo nesse patamar até D150. Já o VPS da artéria marginal, comportou-se com elevação até o D90 em ambos testículos; a partir deste ponto o VPS dos dois testículos caiu (D150) e seus os valores ficaram estatisticamente próximos ao D0. Ainda na artéria marginal, notou-se uma elevação dos valores de VDF até o D90 para o testículo direito e esquerdo. A partir deste momento, o VDF do testículo direito permaneceu elevado até D150, porém o do testículo esquerdo declinou no final do experimento (figuras 2 e 3). Não foram encontradas diferenças significativas dos índices IR e IP das artérias AST, AM e AIT. Não foram observadas diferenças significativas dos parâmetros dopplervelocimétricos entre os testículos direito e esquerdo durante o experimento. Não foram detectados fluxo sanguíneo com o uso do Doppler na cauda do epidídimo.

Na tabela 3, encontram-se os valores da ecogenidade e da heterogeneidade testicular, bem como o volume testicular (direito e esquerdo) e da cauda do epidídimo (direita e esquerda) de 8 cães ao longo de 150 dias. Nenhum dos valores encontrados foi estatisticamente significativo. Ainda na mesma tabela, não foram encontradas diferenças entre os volumes testiculares e da cauda do epidídimo entre os testículos direito e esquerdo.

Foi evidenciado correlação negativa entre heterogeneidade e concentração espermática ($r = -0.41$; $p = 0.008$).

No presente experimento, não houve correlação significativa das concentrações séricas de T com o tamanho testicular, a ecogenidade ou os índices de fluxo sanguíneo testicular.

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen fresco e níveis séricos de testosterona de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de peixe por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).

PARÂMETRO	D0	D90	D150
Volume (1.0-6.0)	2.01±0.83	3.50±1.59	2.75±1.71
Motilidade (50.0-98.0)	80±10.0 ^b	93.75±3.53 ^a	92.75±8.41 ^a
Vigor (2.0-5.0)	3.31±0.46	3.68±0.65	3.88±0.88
sptz/mL(x10⁶) (80.0-2000.0)	308.87±107.0 5	380.25±303.36	498.75±497.42
sptz/mL(x10⁶) x volume (80.0-6888.0)	648.25±427.3 3	1092.62±588.82	1134.19±796.20
Testosterona (ng/mL) (1.58-15.32)	5.50±3.37 ^b	8.84±3.57 ^a	5.13±2.46 ^b

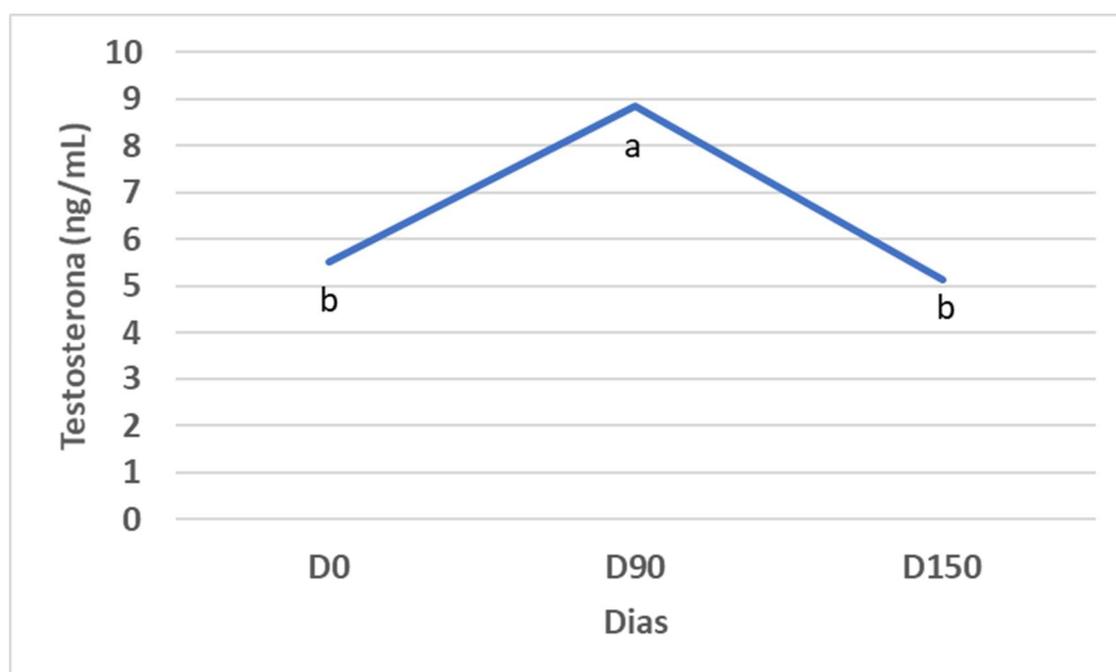


Figura 1. Efeito da suplementação de óleo de salmão (90 dias), nos níveis séricos de testosterona em 8 cães machos ao longo de 150 dias.

Tabela 2. Média e desvio padrão de parâmetros Doppler velocimétricos das artérias suprategesticulares, artérias marginais e artérias intrategesticulares dos testículos direito e esquerdo de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).

	PARÂMETRO	D0	D90	D150	P valor	
Testículo direito	Artéria supra testicular	VPS (cm/s)	9.34±2.37 ^b	15.21±5.45 ^a	16.24±3.32 ^a	0.01
		VDF (cm/s)	4.88±1.44	5.84±1.45	6.01±1.07	0.23
		IR	0.46±0.12	0.59±0.14	0.63±0.07	0.08
		IP	0.75±0.31	1.06±0.53	1.10±0.28	0.14
	Artéria marginal	VPS (cm/s)	8.81±3.50 ^b	12.70±3.40 ^a	11.27±3.79 ^a	0.04
		VDF (cm/s)	4.91±2.16 ^b	7.56±2.14 ^a	7.25±3.18 ^a	0.05
		IR	0.45±0.07	0.39±0.18	0.37±0.10	0.39
		IP	0.62±0.14	0.59±0.31	0.55±0.18	0.80
	Artéria intrategesticular	VPS (cm/s)	6.70±3.77	5.64±0.91	6.17±2.02	0.41
		VDF (cm/s)	3.35±2.04	3.67±0.83	3.71±0.92	0.97
		IR	0.49±0.14	0.42±0.10	0.38±0.12	0.17
		IP	0.88±0.41	0.63±0.27	0.54±0.23	0.11
Testículo esquerdo	Artéria supra testicular	VPS (cm/s)	10.03±4.05 ^b	15.76±5.43 ^a	14.84±3.12 ^a	0.01
		VDF (cm/s)	6.00±3.36	5.90±2.40	6.70±1.61	0.87
		IR	0.46±0.23	0.62±0.10	0.53±0.15	0.75
		IP	0.82±0.41	1.16±0.36	0.85±0.41	0.29
	Artéria marginal	VPS (cm/s)	7.41±2.72 ^b	14.53±7.95 ^a	8.84±2.66 ^b	0.01

Artéria intratesticular	VDF (cm/s)	4.50±1.86 _b	7.20±2.20 ^a	5.12±2.64 _b	0.02
	IR	0.40±0.17	0.46±0.13	0.44±0.13	0.38
	IP	0.67±0.16	0.71±0.35	0.87±0.61	0.86
	VPS (cm/s)	5.87±3.66	5.54±2.31	5.85±1.93	0.81
	VDF (cm/s)	3.36±1.39	3.01±1.26	3.62±0.83	0.57
	IR	0.38±0.18	0.46±0.07	0.36±0.09	0.21
	IP	0.67±0.26	0.76±0.23	0.63±0.26	0.50

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas entre os períodos (D0, D30, D60, D90, D120, D150 e D 180) ($p \leq 0,05$).

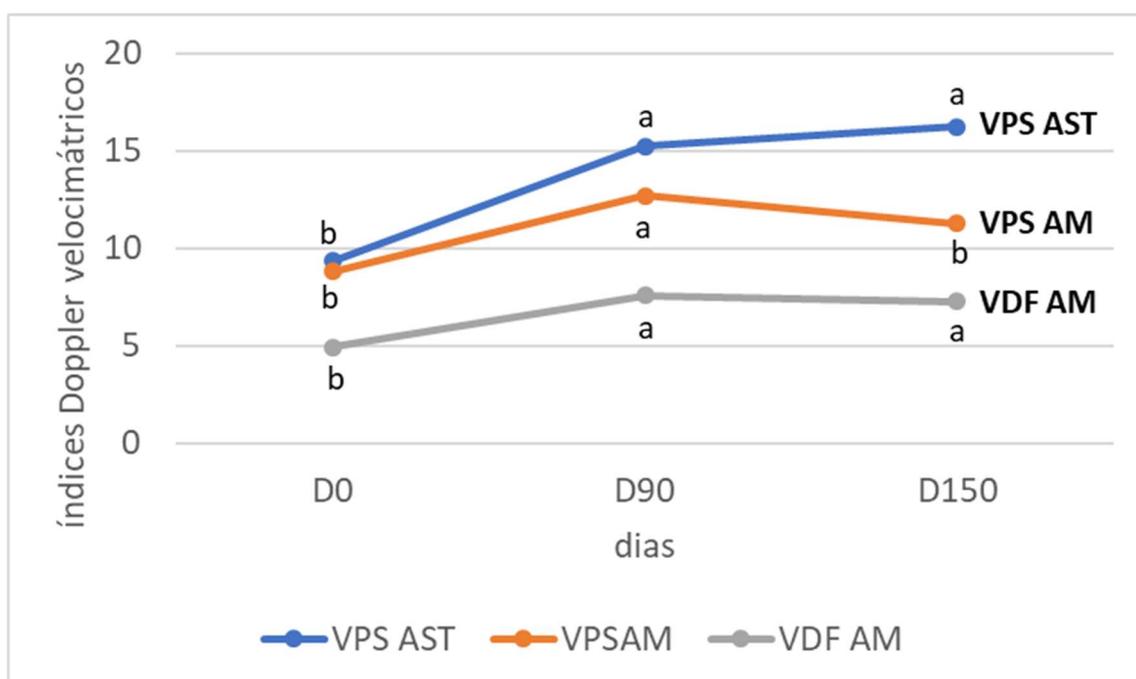


Figura 2. Efeito da suplementação de óleo de salmão em 8 cães, nos índices VPS e VDF da artéria suprategesticular (AST) e artéria marginal (AM) do testículo direito ao longo de 150 dias.

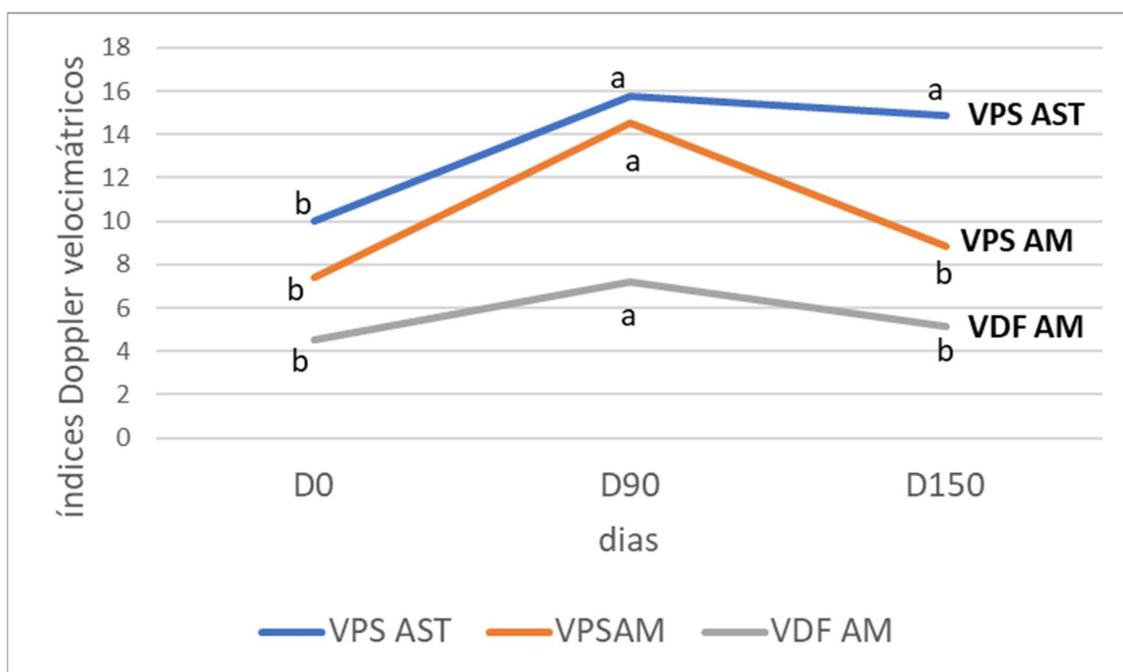


Figura 3. Efeito da suplementação de óleo de salmão em 8 cães, nos índices VPS e VDF da artéria suprategesticular (AST) e artéria marginal (AM) do testículo esquerdo ao longo de 150 dias.

Tabela 3. Média e desvio padrão de ecogenicidade, heterogeneidade, volumes testicular e da cauda do epidídimo dos testículos direito e esquerdo de 8 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D150).

Características	D0	D90	D150	P valor
Ecogenicidade testículo direito (%)	226.75±36.01	224.15±34.57	194.87±13.40	0.86
Ecogenicidade testículo esquerdo (%)	233.15±35.20	237.18±45.62	214.12±26.16	0.82
Heterogeneidade testículo direito (%)	12.92±2.21	12.47±1.25	11.44±1.45	0.57
Heterogeneidade testículo esquerdo (%)	12.52±0.64	12.67±1.34	11.83±1.37	0.32
Volume testículo direito (cm ³)	10.08±3.29	11.19±3.83	9.96±4.99	0.57
Volume testículo esquerdo (cm ³)	11.03±4.39	12.68±5.57	9.96±4.60	0.48
Volume cauda do epidídimo direito (cm ³)	0.58±0.23	0.97±0.46	1.04±0.53	0.69
Volume cauda do epidídimo esquerdo (cm ³)	0.49±0.34	0.68±0.32	0.79±0.40	0.22

4. Discussão

Este estudo avaliou a ecogenicidade do parênquima testicular pela medida da intensidade de pixel em várias regiões (excluindo o mediastino testicular), comparada a um ponto de referência ecogênico anatomicamente consistente como proposto por MOXON et al. (2015), já que a ecogenicidade da túnica albugínea não se altera ao longo do tempo. Este método possui vantagens sobre a simples medição da intensidade de pixel realizada em experimentos de outros autores (DIAS et al., 2017; OLIVEIRA PINHO et al., 2013; TOMLINSON et al., 2017). A utilização de 10 áreas (quadrados) amostrais foi suficiente e representativo para a mensuração dos dados, pois segundo Pozor et al. (2017), não há diferença entre áreas amostrais e a seleção de todo o órgão.

É importante ressaltar que a heterogeneidade foi medida como a variação da intensidade do pixel dentro de pequenas áreas de amostragem de modo que os testículos que tinham um parênquima menos ecogênicos, foram registrados como de alta heterogeneidade. Presumivelmente, as regiões focais de maior homogeneidade refletem uma densidade aumentada, que para nós, se referem a um maior número de células da espermatogênese (GIFFIN et al., 2014) e conseqüentemente maior produção espermática. Camela et al. (2018), documentaram uma diferença de ecotextura testicular em carneiros, onde os animais pré-púberes apresentaram uma maior heterogeneidade em relação aos pós-púberes, devido as diversas mudanças histomorfológicas testiculares, sobretudo na fase pós-mitótica proliferativa das células formadoras dos túbulos seminíferos.

England et al. (2017) encontraram relação entre a ecogenicidade e a motilidade progressiva de espermatozoides. Contudo, outros autores não encontraram correlação entre a intensidade de pixel e produção de gametas ou na qualidade seminal (DIAS et al., 2017; PINHO et al., 2012; TOMLINSON et al., 2017). A ecogenicidade testicular aumentada durante o desenvolvimento sexual se dá em função do crescimento dos túbulos seminíferos (BRITO et al., 2012; CAMELA et al., 2018; HAMM e FOBBE, 1995; POZOR et al., 2017). Como todos nossos animais eram adultos, tal argumento reforça a nossa constatação de que a diminuição da heterogeneidade foi em função do maior número de células espermatógênicas produzidas.

Uma importante constatação para o uso clínico da medida quantitativa da intensidade de pixel e o cálculo desta intensidade é que elas são feitas a nível do parênquima testicular, tornando-se uma avaliação muito precisa, onde a homogeneidade do parênquima é desejada. De fato, os testículos que têm uma aparência geral heterogênea, caracterizada por estruturas ecogênicas irregulares e difusas dentro do parênquima, são frequentemente associados a baixo débito de espermatozoides (VENCATO et al., 2014).

A análise dos dados coletados sobre volume testicular não diferiu entre os testículos esquerdo e direito como descrito por outros autores (DE SOUZA et al., 2015b; ENGLAND, 1991; MOXON et al., 2015; PUGH et al., 1990), mas em contraste com o estudo de Souza et al. (2014). Com relação ao volume da cauda

do epidídimo, não foi constatada diferença ao longo do período do experimento, corroborando com Moxon et al. (2015).

Na imagem com Doppler colorido, as artérias testiculares investigadas neste estudo, exibiram um padrão anatômico semelhante ao descrito em cães (DE SOUZA et al., 2014; GUMBSCH et al., 2002; GÜNZEL-APEL et al., 2001), no qual a artéria do cordão espermático exibe um perfil tortuoso e a artéria marginal exibe um curso mais linear, seguindo a curvatura do polo testicular cranial para o caudal. Resultados parecidos também foram relatados em garanhões (POZOR e MCDONNELL, 2004). Em imagens de Doppler espectral, as artérias testiculares exibiram padrão semelhante ao descrito em humanos (MIDDLETON et al., 1989) e em cães (CARRILLO et al., 2012; DE SOUZA et al., 2014; GUMBSCH et al., 2002), em que as ondas medidas no cordão espermático, de localização marginal ao testículo e as intratesticulares, exibem um padrão de onda monofásica não-resistente. Resultados diferentes foram relatados em garanhões, com um padrão de onda resistente no cordão espermático (POZOR e MCDONNELL, 2004).

Não foi detectada diferença significativa dos índices dopplervelocimétricos entre os testículos direito e esquerdo corroborando com os achados de ENGLAND et al. (2017), mas discordando de DE SOUZA et al. (2014).

Os valores encontrados dos índices Doppler velocimétricos das artérias AST, AM e AIT foram similares aos que reportaram TRAUTWEIN et al. (2019), ENGLAND et al. (2017) e CARRILLO et al. (2012).

Güzel-Apel et al. (2001) reportaram que os vasos intratesticulares não eram adequados para a medida do fluxo sanguíneo por ultrassonografia com Doppler pulsátil. Em nosso estudo, as artérias intratesticulares puderam ser detectadas em todos os exames ultrassonográficos. Entretanto, Gumbsch et al. (2002) relataram que os vasos intratesticulares não foram encontrados em 41,5% dos casos.

A de se notar que a maioria dos valores dopplervelocimétricos das artérias supratesticular e marginal, destacados nos gráficos, se comportaram de modo ascendente, ou seja, que inicialmente (D0) eram baixos e depois aumentaram (D90) e permanecendo até D150. A justificativa para essa constatação poderia ser pela oscilação da pressão arterial ao longo do dia, contudo, estudo de Miyazaki et al. (2002) observaram que o ciclo circadiano em cães varia pouco em 24 horas devido aos ciclos de vigília-sono serem curtos, e os parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca são maiores próximo ao período da alimentação. Além do mais, todos os animais do nosso estudo foram avaliados no mesmo horário (manhã), excluindo efeito da ritmicidade cardíaca (PICCIONE et al., 2005).

Sabe-se que o uso de PUFA's, sobretudo o DHA na dieta, acarreta alterações dos padrões do fluxo sanguíneo (CASANOVA et al., 2017; FISCHER e GLEI, 2015; SINGH et al., 2016), reduzindo a adesão de moléculas ao endotélio vascular (HUANG et al., 2015) e pela diminuição de substâncias

inflamatórias como a IL-1 (interleucina tipo 1) (ALFAIDI et al., 2018) e acarretando diminuição da pressão arterial em pessoas hipertensas. Vários estudos demonstraram que a suplementação de PUFA's com omega-3 pode melhorar a dilatação mediada pelo fluxo (FMD), uma medida da função endotelial sistêmica (WANG et al., 2012; XIN et al., 2012), já que um endotélio saudável é vital para a manutenção da circulação sanguínea; modula a fluidez, o tônus vascular e a integridade dos vasos sanguíneos produzindo e secretando numerosos compostos vasoativos como óxido nítrico (NO) (SINN e HOWE, 2008). Vários autores reportaram efeito vasodilatador e melhoras na perfusão sanguínea cerebral correlacionados com o uso de ômega 3 em humanos (KUSZEWSKI et al., 2017; SCHWARZ et al., 2018). Entretanto, nenhum estudo foi encontrado sobre a atuação de ômega 3 na perfusão sanguínea testicular. Acreditamos que em nosso experimento, o uso do óleo de peixe atuou na dilatação mediada pelo fluxo evidenciado pelo aumento dos parâmetros Doppler velocimétricos e, portanto, acarretou na melhora da função endotelial testicular e seu efeito perdurou por 2 meses após cessada suplementação.

Nossos resultados sugerem que a ingestão de ômega 3 altera a expressão e afinidade de ligação dos receptores de LH à membrana das células de Leydig, resultando numa maior produção da testosterona (SEBOKOVA et al., 1990). No D150, os níveis da concentração sérica de testosterona (figura 1) eram semelhantes ao início do tratamento (D0), evidenciando que este hormônio foi afetado pela ingestão de óleo de salmão.

5. Conclusão

A suplementação de óleo de salmão por 90 dias, influenciou a motilidade espermática e níveis séricos de testosterona de forma positiva. Os parâmetros VPS e VDF das artérias suprategiculares e marginal foram afetados pela suplementação, sendo observado alteração de seus fluxos sanguíneos. A diminuição da heterogeneidade foi associada com aumento da produção espermática. O volume do testículo e epidídimo não foram afetados pela suplementação do óleo de salmão.

Agradecimentos

Agradecimento a empresa Grizzly pet products® pelo fornecimento do óleo de salmão. A Universidade de Padova, a CAPES e o Programa Doutorado Sanduiche no Exterior.

Referências:

AITKEN, R. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 183–197, 1989.

ALFAIDI, M. A. et al. Dietary docosahexaenoic acid reduces oscillatory wall shear stress, atherosclerosis, and hypertension, most likely mediated via an IL-1-mediated mechanism. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 13, 2018.

BARBOSA, C. DA C. et al. Assessment of uterine involution in bitches using B-

mode and Doppler ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1–4, p. 121–126, 2013.

BERGH, A; COLLIN, O.; LISSBRANT, E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. **Biology of reproduction**, v. 64, n. April, p. 13–20, 2001.

BRITO, L. F. C. et al. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality , sperm production , and quantitative testicular histology in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 69–76, 2012.

BUCKRELL, B. C. Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 71–84, 1988.

CAMELA, E. S. C. et al. Changes in testicular size, echotexture, and arterial blood flow associated with the attainment of puberty in Dorper rams raised in a subtropical climate. **Reproduction in Domestic Animals**, n. April, p. 1–7, 2018.

CARRILLO, J. D. et al. Colour and Pulsed Doppler Ultrasonographic Study of the Canine Testis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 655–659, 2012.

CARTEE, R. E. et al. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. **Theriogenology**, v. 31, n. 6, p. 1149–1157, 1989.

CASANOVA, M. A. et al. Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and arterial stiffness in hypertensive patients with hypertriglyceridemia and high cardiovascular risk. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 11, n. 1, p. 10–19, 2017.

DA ROCHA, A. et al. Effect of Daily Food Supplementation with Essential Fatty Acids on Canine Semen Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 313–315, jul. 2009.

DE FREITAS, L. A. et al. Two-dimensional and Doppler sonographic prostatic appearance of sexually intact French Bulldogs. **Theriogenology**, v. 83, n. 7, p. 1140–1146, 2015.

DE SOUZA, M. B. et al. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 3, p. 533–536, 2014.

DE SOUZA, M. B. et al. Regional differences of testicular artery blood flow in post pubertal and pre-pubertal dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 47, 2015a.

DE SOUZA, M. B. et al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 805–810, 2015b.

DIAS, W. et al. Testicular echotexture is not a viable method to indirectly evaluate the spermatogenic parameters in Nelore bulls. **Austral J Vet Sci**, v. 51, p. 45–51, 2017.

ENGLAND, G. C. W. Relationship between ultrasonographic appearance,

testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 306–311, 1991.

ENGLAND, G. C. W. et al. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2005, p. 202–207, 2017.

FILIPOVIC, M. G. et al. Whole blood omega-3 fatty acid concentrations are inversely associated with blood pressure in young, healthy adults. **Journal of Hypertension**, v. 36, n. 7, p. 1548–1554, 2018.

FISCHER, S.; GLEI, M. Health aspects of regular consumption of fish and omega-3-fatty acids. 2015.

GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M.; HAHNEL, A. C. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 12, p. 1606–1618, 2014.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112–125, 2014.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 471–483, 1984.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, J. Research Applications of Ultrasonic Imaging. **Computer**, n. August, 1991.

GUMBSCH, P.; GABLER, C.; HOLZMANN, A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. **Veterinary Record**, v. 151, n. 5, p. 140–4, 3 ago. 2002.

GÜNZEL-APEL, A. R.; MÖHRKE, C.; POULSEN NAUTRUP, C. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 36, n. 5, p. 236–40, out. 2001.

HAMM, B.; FOBBE, F. Maturation of the testis: Ultrasound evaluation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 21, n. 2, p. 143–147, 1995.

HUANG, C. Y.; SHEU, W. H. H.; CHIANG, A. N. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid suppress adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells via differential mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 4, p. 751–762, 2015.

KUSZEWSKI, J. C.; WONG, R. H. X.; HOWE, P. R. C. Effects of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Endothelial Vasodilator Function and Cognition — Are They Interrelated? **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 487, 2017.

LARSEN, R. E. Evaluation of fertility problems in the male dog. **The Veterinary clinics of North America**, v. 7, n. 4, p. 735–745, 1977.

MAX, B. This and That: hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. C, p. 272–276, 1992.

MIDDLETON, W. D.; THORNE, D. A.; MELSON, G. L. Color Doppler ultrasound of the normal testis. **American Journal of Roentgenology**, v. 152, n. 2, p. 293–

297, 1989.

MORI, T. A. Dietary n-3 PUFA and CVD: A review of the evidence. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 1, p. 57–64, 2014.

MOXON, R. et al. Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p. 112–119, 2015.

NOLTE, T.; HARLEMAN, J. H.; JAHN, W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 47, n. 4, p. 267–286, 1995.

OLIVEIRA PINHO, R. et al. Correlation of Sexual Maturity Stage with Testicular Echotexture in Young Nellore Bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 41, p. 1161–1161, 2013.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, n. 3, p. 203–216, 1980.

PALTIEL, H. J. et al. Testicular Volume : Comparison of Orchidometer and US Measurements in Dogs. **Radiology**, v. 22, n. 11, p. 114–119, 2002.

PICCIONE, G.; CAOLA, G.; REFINETTI, R. Daily rhythms of blood pressure, heart rate, and body temperature in fed and fasted male dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 52, n. 8, p. 377–381, 2005.

PINHO, R. O. et al. Testicular echotexture and seminal quality of young Montana Tropical Compound bulls classified as sound and unsound for breeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 8, p. 1961–1965, 2012.

POZOR, M. et al. Theriogenology Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes. **Theriogenology**, v. 99, p. 134–145, 2017.

POZOR, M. A.; MCDONNELL, S. M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 799–810, 2004.

PUGH, C. R.; KONDE, L. J.; PARK, R. D. Testicular Ultrasound in the Normal Dog. **Veterinary Radiology**, v. 31, n. 4, p. 195–199, 1990.

REYES, J. G. et al. The hypoxic testicle: Physiology and pathophysiology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

ROMAGNOLI, S. et al. Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7-mg deslorelin implant in adult male dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 389–392, 2012.

SANTOS, M. C. et al. **The effects of omega 3 (fish oil) supplementation on canine semen quality and in serum testosterone levels.** EVSSAR. **Anais...**2016

SCHWARZ, C. et al. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Resting Cerebral Perfusion in Patients with Mild Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 5, n. 1, p. 26–30, 2018.

SEBOKOVA, E. et al. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 610–618, 1990.

SETCHELL, B.; BREED, W. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 771–825.

SIHAG, P. et al. Sonography in male infertility: a look beyond the obvious. **Journal of Ultrasound**, 2018.

SILVA, E. G. et al. Análise quantitativa da ecogenicidade testicular pela técnica do histograma de ovinos da baixada ocidental maranhense. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 297–303, 2015.

SINGH, S. et al. Eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid as options for vascular risk prevention: A fish story. **American Journal of Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. e905–e910, 2016.

SINN, N.; HOWE, P. R. C. Mental health benefits of omega-3 fatty acids may be mediated by improvements in cerebral vascular function. **Bioscience Hypotheses**, v. 1, p. 103–108, 2008.

SOUZA, M. B. et al. Triplex doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 1135–1140, 2014.

TOMLINSON, M. et al. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. **Theriogenology**, v. 89, p. 169–177, 2017.

TRAUTWEIN, L. G. C.; SOUZA, A. K.; MARTINS, M. I. M. Can testicular artery Doppler velocimetry values change according to the measured region in dogs? **Reproduction in Domestic Animals**, n. January, p. 1–9, 2019.

VENCATO, J.; ROMAGNOLI, S.; STELLETTA, C. Trans-scrotal ultrasonography and testicular fine-needle aspiration cytology in the evaluation of ram sperm production. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 112–115, 2014.

WANG, Q. et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Atherosclerosis**, v. 221, n. 2, p. 536–543, 2012.

WHO. Examination and processing of human semen. **WHO Press**, v. 5th Editio, p. 286, 2010.

XIN, W.; WEI, W.; LI, X. Effect of Fish Oil Supplementation on Fasting Vascular Endothelial Function in Humans: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46028, 2012.

6. ARTIGO - Efeito da suplementação na dieta com óleo de salmão sobre a congelabilidade de sêmen canino: avaliação durante e após tratamento.

Effect of dietary supplementation with salmon oil on the freezing of canine semen: evaluation during and after treatment.

M.C. Santos¹, C. Milani², P.Zucchini², S. Romagnoli², C.R. Quirino¹, I.C.N. Cunha¹

1 – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

2 – Universidade De Padova, Legnaro, PD, Itália.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do uso do óleo de salmão nos parâmetros seminais e níveis séricos de testosterona em cães, realizando-se mensurações durante e após tratamento. Foram utilizados 9 cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 10 a 36 Kg com idades variando de 2 a 11 anos e com histórico de fertilidade comprovada. As avaliações ocorreram no início (D0), aos 90 dias (D90) e no final do experimento (D180). Os animais foram suplementados até 90 dias com óleo de salmão na dosagem recomendada pelo fabricante (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA). Após este período o tratamento foi suspenso, porém as avaliações continuaram por mais 90 dias. Uma amostra do sêmen coletado foi congelada e estocada em botijão criogênico por pelo menos 30 dias. Após descongelado, o sêmen foi subdividido em 3 alíquotas. Na primeira alíquota foram avaliados: motilidade, vigor, integridade de membrana (HOST), relação entre vivos/mortos e integridade acrossomal pela coloração rosa bengala-fast green. A segunda e terceira alíquotas foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) a 37°C por duas e 4 horas, respectivamente, e ao final do teste foram avaliados motilidade (%), vigor (0-5) e percentual de espermatozoides vivos/mortos pela coloração de eosina/nigrosina. Não foram observadas alterações na integridade acrossomal. Ainda durante tratamento, observou-se redução do percentual de defeitos de cabeça ($p=0.04$). Após interrompida a suplementação, os parâmetros seminais permaneceram elevados por mais 60 dias. Em conclusão, a suplementação de óleo de peixe por 90 dias influenciou a qualidade do sêmen congelado. Os efeitos dos parâmetros destacados foram mantidos por mais 3 meses após cessado o tratamento, com exceção da testosterona. A suplementação de óleo de salmão influenciou a congelabilidade do sêmen canino.

Palavras-chave: ômega 3, ácidos graxos poliinsaturados, congelamento de sêmen, criopreservação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the use of fish oil on seminal parameters and serum levels of testosterone in dogs, with assessments being taken during and after treatment. Nine healthy male dogs of different breeds with

weighed between 10 and 36 kg with ages varying from 2 to 11 years and with a proven fertility record. Evaluations occurred at the beginning (D0), at 90 days (D90) and at the end of the experiment (D180). The animals were supplemented to 90 days with fish oil at the dosage recommended by the manufacturer (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA). After this period the treatment was suspended, but the evaluations continued for another 90 days. A sample of the collected semen was frozen and stored in a cryogenic cylinder for at least 30 days. After thawing, the semen was subdivided into 3 aliquots. In the first aliquot were evaluated: motility, vigor, membrane integrity (HOST), relationship between live / dead and acrosomal integrity by rose bengal-fast green staining. The second and third aliquots were submitted to the thermoresistance test (TTR) at 37 ° C for two and four hours, respectively, and at the end of the test were evaluated motility (%), vigor (0-5) and percentage of live spermatozoa / killed by eosin / nigrosin staining. No changes in acrosomal integrity were observed. Also during treatment, a reduction in the percentage of head defects was observed ($p = 0.04$). After discontinuation of supplementation, the seminal parameters remained elevated for a further 60 days. In conclusion, fish oil supplementation for 90 days influenced semen quality and serum testosterone levels. The effects of the highlighted parameters were maintained for a further 3 months after cessation of treatment. The supplementation of fish oil influenced positively the freezing of canine semen.

Key words: omega 3, polyunsaturated fatty acids, semen freezing, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

O congelamento dos espermatozoides canino permite seu armazenamento a longo prazo. Desde a introdução do glicerol como agente crioprotetor por Polge et al. (1949) e a descoberta de dimetil sulfóxido (DMSO) por Lovelock e Bishop (1959), muitas técnicas de criopreservação foram desenvolvidas, principalmente por métodos empíricos. A criobiologia, como uma ciência fundamental, apareceu de uma necessidade para entender os efeitos de temperaturas abaixo de zero graus Celsius em sistemas celulares e usar este conhecimento no desenvolvimento de técnicas de criopreservação e descreve os efeitos de temperaturas subzero em organismos vivos (POLGE et al., 1949). Uma importante complicação da criobiologia é a inevitável variação que interfere na determinação de um protocolo ideal de congelamento, devido às diferenças entre uma ideal otimização e as propriedades específicas da célula que está sendo congelada. Apesar disso, o desenvolvimento da criobiologia resultou na compreensão de propriedades fundamentais que interferiram no processo de criopreservação dos espermatozoides caninos, permitindo que resultados fossem melhorados. Os principais fatores que influenciam a sobrevivência dos espermatozoides criopreservados são: propriedades osmóticas do gameta, taxas de resfriamento e aquecimento e formação de cristais de gelo intracelulares (HEZAVEHEI et al., 2018).

A criopreservação expõe os espermatozoides ao estresse físico e químico, e menos de 50% sobrevivem com a capacidade de fertilização mantida. Os efeitos

negativos do resfriamento, congelamento/descongelamento são causados principalmente por transições da fase lipídica, cristalização da água (formação do gelo) e fluxos de água induzidos osmoticamente e as subseqüentes reorganizações de membrana influenciam a integridade, estrutura e função da membrana (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Efeitos benéficos dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega-3 especificamente, o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) foram relatados em melhoria da membrana plasmática, da qualidade espermática e do sêmen em diferentes espécies (CONQUER et al., 2000; MASOUDI et al., 2016; NISSEN e KREYSEL, 1983). Em mamíferos, a composição da membrana espermática é caracterizada por uma alta proporção de ácidos graxos ômega-3 (DÍAZ et al., 2016; GAVAZZA, 2009; PARKS e LYNCH, 1992; RAMOS ANGRIMANI et al., 2017).

A composição lipídica do sêmen tem sido associada à integridade e fluidez da membrana, motilidade dos espermatozoides e sensibilidade ao frio (HOSSAIN et al., 2007; MOCÉ et al., 2010; WHITE, 1993). PUFAs são sintetizados no corpo usando seu precursor, que é o ácido alfa-linolênico (ALA) (CALDER, 2018; GULLIVER et al., 2012). Portanto, a inclusão das fontes de ALA ou o fornecimento direto de DHA e EPA na dieta podem melhorar a qualidade espermática (BRINSKO et al., 2005; GONZÁLEZ-RAVINA et al., 2018).

O óleo de peixe é uma das fontes mais ricas de DHA e EPA e sua eficácia foi avaliada para a melhora dos parâmetros seminais em touros (KHOSHVAGHT et al., 2016), cães (SANTOS et al., 2016), carneiros (MASOUDI et al., 2016), aves (SAFARI ASL et al., 2018), cavalos (KHERADMAND GARMSIR et al., 2014). Durante o processo de resfriamento, a membrana plasmática precisa ser mais flexível e, portanto, o enriquecimento da dieta com fonte de EPA e DHA, que induzem mais flexibilidade, poderia aumentar a proteção dos espermatozoides contra os danos causados pelo congelamento.

Os efeitos positivos dos ácidos graxos poliinsaturados na dieta também foram descritos em relação ao resfriamento (AURICH et al., 1997; CASTELLANO et al., 2010; SCHMID-LAUSIGK e AURICH, 2014; STRZEŻEK et al., 2004) e congelamento de sêmen (ESMAEILI et al., 2012), embora a ausência de efeitos sobre a congelabilidade espermática também foi observada (CASTELLANO et al., 2010).

Assim, o objetivo deste estudo foi em avaliar o efeito da suplementação de óleo de salmão na congelabilidade do sêmen canino.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e desenho experimental

Os dados foram coletados entre setembro de 2017 até março de 2018. Este estudo foi aprovado no comitê de ética da UENF (CEUA-UENF) sob o protocolo de número 393. Foram utilizados 9 cães machos saudáveis de diferentes raças, pesando entre 10 a 36 Kg com idades variando de 2 a 11 anos e com histórico de fertilidade comprovada. Os cães permaneceram com seus proprietários durante todo o estudo. Os animais foram avaliados em três momentos: D0 –

início do tratamento; D90 e D180 – última avaliação. Os primeiros 90 dias os animais receberam suplementação de óleo de salmão na dosagem recomendada pelo fabricante (Grizzly Salmon Oil, Grizzly Pet Products, LLC, Woodinville, Washington, USA), onde a cada 3,5 ml do produto continha: ômega 3 – 935 mg; ômega 6 – 95 mg; DHA – 355 mg; EPA – 320 mg. Passados os 90 dias iniciais (D90), a suplementação foi suspensa, contudo as avaliações permaneceram até 180 dias (D180).

2.2. Coleta de sêmen e avaliação espermática

O sêmen foi coletado por estimulação manual. Após a coleta, o volume de sêmen (mL) foi determinado na fração espermática usando um tubo graduado. A motilidade (MOT) (%), foi obtida imediatamente após a coleta, retirando-se 10 μ L de sêmen em uma gota de sêmen e depositado entre lâmina e lamínula e visualizada por microscopia de luz com aumento de 400x em 10 campos, em placa aquecida a 37°C. A concentração espermática (sptz x106/ mL) foi determinada em uma câmara de Bürker (WHO, 2010), seguida de um cálculo da contagem total de espermatozoides (sptz x 106mL x volume espermático = sptz totais). O vigor, subjetivo, definido como a linearidade e a qualidade do movimento espermático, foi avaliado com escore de 0 a 5, conforme descrito anteriormente (CBRA, 2013). A relação de vivos/mortos (%) foi determinada pelo teste supravital (coloração eosina/nigrosina) e a integridade da membrana citoplasmática dos espermatozoides (%) pelo teste hiposmótico (HOST), utilizando 100 μ L de uma solução hiposmótica de 150 mosM (0,735 g de citrato de sódio e 1,351 g de frutose e 100 mL de água destilada). A morfologia espermática foi classificada como normal ou com defeito maior ou menor (BLOM, 1972) utilizando microscopia de contraste de fase (1000x de magnitude).

2.3. Congelamento do sêmen

O sêmen foi centrifugado a 700 \times g por 6 min. O sobrenadante foi removido e ao pellet formado foi acrescido, a temperatura ambiente, diluidor Tris-glicose-ácido cítrico contendo 3% de glicerol (ROTA et al., 2006) para uma concentração de 200 x 106 sptz / mL. Após uma hora de equilíbrio a 4°C, a amostra foi diluída uma segunda vez com um volume igual de um diluidor (também a 4°C) contendo 1% Equex STM Paste® (Nova Chemicals Sales, Scituate, MA, EUA) e 7% glicerol. Depois disso, um volume igual do segundo extensor (também a 4 ° C), contendo 7% de glicerol e 1% de pasta Equex STM (Nova Chemicals Sales, Scituate, MA, EUA) foi adicionado, para obter uma concentração final de 5% de glicerol, 0,5% de pasta Equex STM e 100 x 106 espermatozoides/ mL. Após 10 min a 4 ° C, palhetas de 0,5 mL foram preenchidas com o sêmen diluído e seladas com Seal-Ease® (Becton Dickinson e Company, Franklin Lanes, NJ, EUA), colocadas horizontalmente 4cm acima da superfície de nitrogênio líquido por 10 min e então imersos nele.

2.4. Avaliação do sêmen pós- descongelamento

As palhetas congeladas foram imersas em banho-maria a 37°C por 1 min e o conteúdo foi esvaziado em um tubo de ensaio onde um tampão Tris (ROTA et al., 1999) foi adicionado a 37°C em uma relação 1:2 (sêmen: tampão Tris). Uma pequena gota de sêmen foi usada para avaliar subjetivamente a motilidade total sob microscopia de luz (400 ×).

Imediatamente após descongelado, o sêmen foi dividido em três alíquotas. A primeira alíquota foi avaliada para motilidade, vigor, integridade de membrana (HOST), relação entre vivos/mortos pela coloração de eosina/nigrosina (WHO, 2010), integridade acrossomal pela coloração rosa bengala-*fast green* (POPE et al., 1991). A segunda e terceira alíquotas foram submetidas ao teste de termorresistência a 37°C por duas e 4 horas, respectivamente, e ao final do teste foram avaliados motilidade (%), vigor (0-5) e percentual de espermatozoides vivos/mortos pela coloração de eosina/nigrosina.

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida (SAS 9.4 version - SAS Institute Inc., Cary, NC) utilizando modelo ANOVA – SNK, sendo efeito devido ao período e a hora. Os dados foram apresentados como a média e desvio padrão. O nível de significância de $P < 0.05$ foi utilizado em todos os casos.

3. Resultados

Um total de 27 análises foram realizadas. Na tabela 1, encontram-se os parâmetros utilizados na avaliação pós descongelamento de sêmen. Os resultados mostraram aumento da motilidade espermática em D90. Houve diferenças significativas de todos os parâmetros, exceto na integridade do acrossoma.

A tabela 2 nos mostra o comportamento da motilidade, pós-descongelamento, ao teste de termo resistência, entre os momentos D0, D90 e D180. Nota-se que a zero hora do TTR dos períodos D0 e D90 foi diferente estatisticamente em relação a 2 e 4 horas. Entretanto, tal comportamento não foi observado ao período D180. Destaca-se a maior porcentagem da motilidade do período D90 ao momento de zero hora do TTR, porém ao passar das horas, tal diferença não foi mais evidenciada.

Dados relativos ao vigor encontram na tabela 3 que nos evidenciou uma queda progressiva no decorrer das horas. Nos 3 períodos (D0, D90 e D180) foram encontradas diferenças significativas entre os três momentos (0, 2 e 4 horas) de avaliação do TTR, exceto em D180 que entre 2 e 4 horas não houve diferença estatística.

Já na tabela 4, encontram-se os valores do percentual de vivos/mortos. Destaca-se a maior porcentagem de espermatozoides vivos no período D90 em relação a D0 e D180, logo após o descongelamento. Entretanto tal diferença não é mais notada para 2 e 4 horas do TTR entre os períodos.

Resultados da morfologia espermática são ilustrados na tabela 5. Observou-se diferença do percentual de espermatozoides normais entre D0 e D90, porém não mais entre D90 e D180. Da mesma maneira se comportou a

porcentagem de espermatozoides com defeitos menores, onde uma queda dos valores foi verificada entre D0 e D90, contudo sem diferença estatística entre D90 e D180. Para a característica defeito maiores, não foram observadas diferenças.

Tabela 1. Média e desvio padrão de parâmetros seminais de sêmen congelado de 9 cães, submetidos a suplementação oral de óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).

PARÂMETRO	D0	D90	D180	P valor
Motilidade (%) (34,74-82,48)	34,80±22,11b	52,03±23,17a	40,11±17,28b	0,0014
Vigor (0-5) (2,0-5,0)	2,66±0,43a	2,83±0,56a	1,88±0,33b	0,0006
Vivos e mortos (%) (28,17-76,82)	52,33±5,94ab	64,22±5,94a	40,77±5,94b	0,036
Integridade acrossomal (%) (37,04-71,62)	54,55±5,75	59,44±5,75	49,22±5,75	0,18
HOST (%) (33,21-77,0)	62,0±5,45ab	65,44±5,45a	44,77±5,45b	0,02

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas entre os períodos (D0, D90, D180).

Tabela 2. Média e desvio padrão de motilidade (%) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).

PERÍODO\TTR	0 hora	2 horas	4 horas
D0	56,66±14,57aB	30,62±16,13bB	16,66±12,75bB
D90	71,66±14,79aA	46,66±19,70bA	37,77±21,95bA
D180	45,55±5,94aB	38,88±18,83aA	35,88±17,01aA

*dentro de período e entre horas: médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk; médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk.

Tabela 3. Média e desvio padrão de vigor (0-5) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).

PERÍODO\TTR	0 hora	2 horas	4 horas
-------------	--------	---------	---------

D0	2,66±0,43aA	1,87±0,58bA	1,27±0,44cA
D90	2,83±0,56aaA	1,72±0,87bA	1,0±0,0cA
D180	1,88±0,33aB	1,27±0,44bA	1,11±0,33bA

*dentro de período e entre horas: médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk; médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk.

Tabela 4. Média e desvio padrão de vivos/mortos (%) de sêmen congelado, submetido ao teste de termo resistência ao tempo de 2 e 4 horas, de 9 cães tratados com óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).

PERÍODO\TTR	0 hora	2 horas	4 horas
D0	52,33±12,19aB	33,87±9,83bA	29,25±11,80bA
D90	64,22±20,27aA	38,33±16,25bA	32,66±21,8bA
D180	40,77±19,87aB	36,0±17,58aA	38,11±18,25aA

*dentro de período e entre horas: médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk. dentro de período e entre horas: médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk.

Tabela 5. Mediana e intervalo interquartil de morfologia espermática em 9 cães suplementados com óleo de salmão por 90 dias (D0-D90) e pós suplementação (D90-D180).

PARÂMETRO	D0	D90	D180	P valor
Espermatozoides normais (%)	57,5 (45-65)b	80 (75-86)a	84 (83-87)a	0,005
Defeitos maiores (%)	6,5 (4,5-20)	4 (2-7)	6 (3-8)	0,32
Defeitos menores (%)	36 (26-40,5)a	13 (11-19)b	10 (9-11)b	0,003

*médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha apresentam diferenças ao 5% pelo teste snk;

4. Discussão

No presente estudo, nós investigamos os efeitos benéficos do uso do óleo de salmão na criopreservação de sêmen canino. A motilidade foi influenciada pela suplementação de óleo de peixe, com aumento de seu valor no período em que os animais foram suplementados.

A membrana plasmática dos espermatozoides é composta por uma bicamada de fosfolipídios, com os ácidos graxos saturados ou insaturados sendo

estes as unidades funcionais (PARKS e HAMMERSTEDT, 1985). A origem do conteúdo lipídico da membrana plasmática deriva da célula espermatogonial, no entanto, pode ser modificada durante a espermatogênese e a maturação espermática (REJRAJI, 2006). Ao passar pela primeira região epididimal (cabeça), a membrana plasmática dos espermatozoides é flexível, facilitando a remodelação lipídica (CHRISTOVA et al., 2002). No entanto, através dos outros segmentos epididimários (corpo e cauda), o espermatozoide torna-se mais estável e capaz de suportar os danos durante o armazenamento, situado na cauda dos epidídimos (AMANN et al., 1993). A organização lipídica dos espermatozoides durante a maturação no epidídimo é mediada por constituintes proteicos e lipídicos do líquido epididimal (BELLEANNEE et al., 2011; LENZI et al., 1996; PARKS e HAMMERSTEDT, 1985). Assim, a membrana plasmática do espermatozoide muda de acordo com o ambiente no qual o espermatozoide está localizado. Apenas no estágio final de maturação no epidídimo, a membrana plasmática atinge sua composição final, que consiste, geralmente, em 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros (principalmente colesterol) e 5% de glicolipídios (AWANO et al., 1993; JONES, 1971; LUCIO et al., 2016). Entre os ácidos graxos poliinsaturados, o ácido docosahexaenóico (DHA) representa cerca de 48-52% do conteúdo total de células espermáticas com morfologia normal (LENZI et al., 1996). Um estudo realizado em macacos constatou que o DHA é significativamente mais concentrado na cauda do espermatozoide (19,6%) em comparação com a cabeça (1,1%) (CONNOR et al., 1998), sugerindo que o DHA está envolvido no movimento espermático.

Segundo Martinez-Soto et al. (2013), ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), especialmente DHA, estão diretamente correlacionados com a motilidade e viabilidade espermática após o congelamento/descongelamento, e que ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) foram inversamente correlacionados, sugerem ainda que a composição de ácidos graxos poderia ser usada como um preditor da capacidade de criopreservação. Entretanto, outros autores não observaram influência de PUFA na congelabilidade espermática de cães, sobretudo no que diz respeito a motilidade (RODRIGUES et al., 2017).

No teste de termo resistência, a motilidade se comportou de modo elevado nos animais suplementados (D90) que permaneceu com valores superiores em 2 e 4 horas de TTR, quando comparados aos períodos não suplementados (D0 e D180). Portanto, presumimos que os níveis de PUFA, sobretudo de DHA presente na membrana espermática, tenham sido elevados, e consequentemente proporcionaram uma melhor proteção aos ataques da peroxidação lipídica, evitando a ação dos radicais livres (NISSEN e KREYSEL, 1983) que por conseguinte acarretou na melhora da motilidade espermática. Masoudi et al. (2016), reportaram, em carneiros, aumento da motilidade de sêmen congelado após suplementação de óleo de peixe.

Com relação a viabilidade, ou seja, a relação de vivos e mortos, não foi alterada em nosso experimento, diferentemente de Khoshvaght et al. (2016), que encontraram aumento do percentual de espermatozoides vivos, sendo este percentual potencializado, quando a suplementação foi adicionada vitamina E

(HABIBI et al., 2017). Para ganhões, além da vitamina E, a suplementação com L-carnitina e selênio em combinação com ômega-3 e -6 resultou em aumento da motilidade e integridade do acrossoma e da membrana plasmática de sêmen fresco e congelado/descongelado (FREITAS et al., 2016). Além disso, os autores concluíram que o aumento da motilidade espermática está relacionado ao uso de antioxidantes, enquanto a melhoria na integridade da membrana foi atribuída principalmente à maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados associados a antioxidantes. Assim, em ganhões, o uso isolado de ômegas não resultou em grandes efeitos na qualidade do sêmen (FREITAS et al., 2016). Estes efeitos foram atribuídos apenas a suplementação de antioxidantes (SCHMID-LAUSIGK e AURICH, 2014).

Em cães, a infertilidade pode estar relacionada à porcentagem de defeitos espermáticos, portanto, 80% ou mais dos espermatozoides no ejaculado devem estar sem defeitos morfológicos (OETTLÉ, 1993; ROOT e JOHNSTON, 1994). Tanto a porcentagem de defeitos menores bem como o número de espermatozoides normais, aumentaram no D90 e permanecendo até D180, demonstrando que a suplementação de óleo de peixe acarretou na melhora desses parâmetros. A diminuição de defeitos espermáticos também foi documentada por Attaman et al. (2012), em humanos que ingeriram uma dieta suplementada com ômega-3.

Morfologia e integridade acrossômica dos espermatozoides após o congelamento, não foram afetados pelas dietas deste estudo. O acrossomo e a morfologia dos espermatozoides podem mudar durante o armazenamento de resfriamento devido à alteração da membrana (JOHN MORRIS et al., 2012). Devido ao efeito positivo de PUFA's na motilidade, integridade da membrana e atividade das mitocôndrias, esperávamos que o óleo de peixe na dieta melhorasse a morfologia e sobretudo a integridade do acrossoma dos espermatozoides de cães no congelamento. No entanto, em nosso estudo, a integridade do acrossoma não foi afetada pelo tratamento, corroborando com Masoudi et al. (2016), porém discordando de Panida et al. (2012).

5. Conclusão

A suplementação de óleo de salmão por 90 dias, influenciou a congelabilidade de sêmen canino, com ênfase no aumento da motilidade espermática, elevação do percentual de vivo/mortos e redução de defeitos menores. As características: percentual de espermatozoides normais e defeitos menores permaneceram elevados, após cessado tratamento, por mais 3 meses.

6. Agradecimentos

Agradecimento a empresa Grizzly pet products® pelo fornecimento do óleo de salmão. A Universidade de Padova, a CAPES e o Programa Doutorado Sanduiche no Exterior.

Referências:

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The

epididymis and sperm maturation: A perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 4, p. 361–381, 1993.

ATTAMAN, J. A. et al. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1466–1474, 2012.

AURICH, J. E. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled- stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 185–192, 1997.

AWANO, M.; KAWAGUCHI, A.; MOHRI, H. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 99, n. 2, p. 375–383, 1993.

BELLEANNEE, C. et al. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1952–1964, 2011.

BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519–1527, 2005.

CALDER, P. C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 77, n. 1, p. 52–72, 2018.

CASTELLANO, C. A. et al. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1482–1490, 2010.

CHRISTOVA, Y. et al. Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene. **J Androl**, v. 23, n. 3, p. 384–392, 2002.

CONNOR, W. E. et al. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 7, p. 1404–11, 1998.

CONQUER, J. A. et al. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. **Lipids**, v. 35, n. 2, p. 149–154, 2000.

DA ROCHA, A. et al. Effect of Daily Food Supplementation with Essential Fatty Acids on Canine Semen Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 313–315, jul. 2009.

DÍAZ, R. et al. Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. **Andrologia**, v. 48, n. 6, p. 723–726, 2016.

FREITAS, M. L. et al. Quality of Fresh, Cooled, and Frozen Semen From Stallions Supplemented with Antioxidants and Fatty Acids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 46, p. 1–6, 2016.

GAVAZZA, M. Lipid peroxidation assays in canine fresh semen. **Rev. vet**, v. 20, n. 2, p. 97–102, 2009.

GONZÁLEZ-RAVINA, C. et al. Effect of dietary supplementation with a highly pure and concentrated docosahexaenoic acid (DHA) supplement on human sperm function. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 3, p. 282–288, 2018.

GULLIVER, C. E. et al. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 1–2, p. 9–22, 2012.

HABIBI, M. et al. Effect of dietary fish oil with or without vitamin E supplementation on fresh and cryopreserved ovine sperm. **Animal Production Science**, v. 57, n. 3, p. 441, 2017.

HAMMERSTEDT, H.; GRAHAM, K.; NOLAN, P. Cryopreservation What of Mammalian Sperm: We Ask Them to Survive other retrace. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–88, 1990.

HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018.

HOSSAIN, M. D. S. et al. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 6, n. 4, p. 235–239, 2007.

JOHN MORRIS, G. et al. Freezing injury: The special case of the sperm cell. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 71–80, 2012.

JONES, R. Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. **J Reprod Fertil Suppl**, n. April, 1971.

KHERADMAND GARMSIR, A. et al. Effects of Dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) and Fish Oil on Semen Quality of Miniature Caspian Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 9, p. 1069–1075, 2014.

KHOSHVAGHT, A. et al. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 807–812, 2016.

LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: From polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246–256, 1996.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v. 183, n. 4672, p. 1394–5, 16 maio 1959.

LUCIO, C. et al. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 208–213, 2016.

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.

MASOUDI, R. et al. Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin– and egg yolk–based extenders. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1583–1588, 2016.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 236–247, 2010.

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**, v. 15, n. 3, p. 264–9, 1983.

PANIDA, C.; KAMPON, K.; PADET, T. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3697–3703, 2012.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane 1. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653–668, 1985.

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

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low. **nature**, v. 164, p. 666, 1949.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for quantifying the acrosomal status of cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 257, 1991.

RAMOS ANGRIMANI, D. S. et al. Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2017.

REJRAJI, H. Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 6, p. 1104–1113, 2006.

RODRIGUES, A. C. et al. Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 5, p. 3069–3076, 2017.

ROTA, A. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1045–58, 15 abr. 1999.

ROTA, A. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1848–1858, jun. 2006.

SAFARI ASL, R. et al. Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. **Cryobiology**, v. 84, n. April, p. 15–19, 2018.

SANTOS, M. C. et al. **The effects of omega 3 (fish oil) supplementation on canine semen quality and in serum testosterone levels.** EVSSAR. **Anais...**2016

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 966–973, 2014.

STRZEŻEK FRASER, L., KUKLIŃSKA, M., DZIEKOŃSKA, A., LECEWICZ, M., J. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproductive**

Biology, v. 4, n. 3, p. 271–287, 2004.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639–658, 1993.

WHO. Examination and processing of human semen. **WHO Press**, v. 5th Editio, p. 286, 2010.