



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2022; 12:1-15. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.23>  
Artigo Original. Recebido: 13/12/2020. Aceito:03/08/2022. Publicado: 20/08/2022. Chave: e2020-13.  
<https://www.youtube.com/watch?v=cLgN2zeaeOs>

## Inclusão de óleo de soja na dieta de criopreservação do sêmen de ovelha

Inclusion of soybean oil in the diet on cryopreservation of ram semen



Tun-Moo Maximiliano<sup>2</sup> ID, Ramón-Ugalde Julio<sup>2</sup> ID, Loeza-Concha Henry<sup>3</sup> ID, Rodríguez-Gutiérrez Itzel<sup>2</sup> ID, Castellanos-Zacarías Carlos<sup>2</sup> ID, Domínguez-Rebolledo Álvaro<sup>\*1</sup> ID

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. México. <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal. Antigua carretera Mérida-Motul km 16.3, Conkal, C. P. 97345, Yucatán, México. Antigua Carretera Mérida-Motul km 16.3, C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná. km 17.5, C.P. 24450; Sihochac, Champotón, Campeche. México. \*Autor para correspondência: Álvaro Domínguez Rebolledo. E-mail: maxtun\_14@hotmail.com, julio.ramon9@gmail.com, loeza.jesus@colpos.mx, Itzel.rgutierrez@outlook.com, carlos.castellanos@itconkal.edu.mx, dominguez.alvaro@inifap.gob.mx

### RESUMO

O objetivo era avaliar o efeito do óleo de soja (OS) na dieta sobre a criopreservação do sêmen de ovelha. Durante 60 dias, 27 ovelhas foram divididas em três tratamentos (n=9): T1: 0% OS (controle); T2: 3% OS e T3: 6% OS. Foram analisados a motilidade, viabilidade, atividade mitocondrial, integridade do acrossomo e da membrana caudal (hospedeiro) no descongelamento. Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA e Tukey para comparação de meios. T1 e T3 foram similares e superiores (P<0,05) a T2 tanto em motilidade total quanto em motilidade progressiva. A velocidade média e a integridade acrossômica de T1 foi maior (P<0,05) do que T2 e T3. A viabilidade de T1 era semelhante a T2 e T3, embora T2 e T3 fossem diferentes (P<0,01). Por outro lado, a atividade mitocondrial de T3 era maior que T1 e T2 (P<0,05). Não foram encontradas diferenças (P>0,05) nos outros parâmetros de motilidade e Host. A inclusão de óleo de soja na dieta não melhora a criopreservação do sêmen ovino, embora a adição de 6% favoreça a atividade mitocondrial.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, espermatozoides, congelados.

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of soybean oil (SO) supplemented diet on the cryopreservation of Pelibuey ram semen. Twenty-seven rams were divided three treatments (n= 9): T1: 0% SO (control); T2: 3% SO and T3: 6% SO, for a period of 60 days. The frozen-thawed semen was assessed for sperm motility parameters, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, acrosome integrity and tail membrane integrity (Host). The results were analyzed by ANOVA, followed by Tukey's comparison test. T1 and T3 were similar and superior (P<0.05) to T2 in total motility and progressive motility. Mean velocity and acrosome integrity in T1 were higher (P<0.05) compared to T2 and T3. Viability in T1 was similar to that of T2 and T3, however, T2 and T3 were different (P<0.01). Mitochondrial activity in T3 was higher, compared to T1 and T2 (P<0.05). No differences (P>0.05) were found in the other motility parameters and in host. The inclusion of soybean oil in the diet did not improve the cryopreservation of ram semen, although the inclusion of 6% soybean oil in the diet increased mitochondrial activity.

**Keywords:** fatty acid, spermatozoa, frozen-thawed.



## INTRODUÇÃO

A nutrição e a reprodução estão geralmente ligadas, pois o sucesso reprodutivo do animal depende de seu estado nutricional. O efeito desta associação tem sido estudado ao longo dos anos, muitas vezes alterando as dietas de várias maneiras, a fim de observar as mudanças resultantes nos parâmetros reprodutivos dos animais (Yeste *et al.*, 2011). Uma das mudanças mais significativas é a adição de ácidos graxos polinsaturados (frequentemente referidos por sua sigla PUFAs (Poli-insaturados Ácidos Graxos) a sua dieta. Diferentes fontes de PUFAs têm sido estudadas na dieta dos mamíferos, como ômega-3 e ômega-6, e tem sido observado que seu consumo influencia algumas funções reprodutivas da fêmea, como um aumento no diâmetro e número de folículos presentes no ovário (Nurlatifah *et al.*, 2020); assim como um período mais curto para a primeira ovulação (Salehi *et al.*, 2016) e um efeito positivo na fertilidade (Rebollar *et al.*, 2014). Em homens, produz um aumento na libido (Castellano *et al.*, 2010), tamanho testicular (Van Tran *et al.*, 2017; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2017), concentração de esperma (Alizadhe *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017), motilidade (Alizadhe *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017) e viabilidade do esperma (Alizadhe *et al.*, 2014; Esmaeili *et al.*, 2012<sup>b</sup>). Da mesma forma, na composição e estrutura das membranas da mitocôndria espermática (Gürler *et al.*, 2015), que são responsáveis pela produção da energia necessária para produzir movimento flagelar, aumentando sua fluidez e plasticidade e, portanto, sua função (Sullivan *et al.*, 2018).

Na maioria dos tecidos de mamíferos, o ácido graxo mais predominante é o ácido linoleico (18:2 n-6), onde sua concentração reflete a ingestão dietética (Guyenet & Carlson, 2015). O ácido linoleico é obtido através de óleos vegetais dietéticos, como óleos de girassol, soja, milho e canola; assim como nozes e sementes (Sullivan *et al.*, 2018). O óleo de soja é composto de várias substâncias, principalmente ácidos graxos polinsaturados, particularmente ácido linoleico (LA, C18: 2), um ácido graxo ômega-6 ( $\omega_6$ ) que constitui ~ 55% do óleo de soja (Deol *et al.*, 2017) e também ácido linolênico (ALA, C18: 3), um ácido graxo ômega-3 ( $\omega_3$ ) que constitui ~ 5-9% (Sullivan *et al.*, 2018).

Por outro lado, o PUFA mais abundante nas membranas da maioria dos espermatozoides de mamíferos é o ômega-3, que tem um papel importante na funcionalidade das células espermáticas, proporcionando fluidez e permeabilidade; ambos estão relacionados à capacidade de realizar fertilização (Esmaeili *et al.*, 2012<sup>b</sup>), e ao aumento da crio-resistência (Towhidi *et al.*, 2012; Fair *et al.*, 2014).

Foi relatado que os espermatozoides ovinos são mais suscetíveis ao choque frio durante a criopreservação do que outros mamíferos (Grötter *et al.*, 2019). Essas diferenças são atribuídas, em parte, à composição lipídica (Mandal *et al.*, 2014; Chunrong *et al.*, 2019) e ao conteúdo de PUFAs presentes nas membranas dos espermatozoides (Mandal *et*



*al.*, 2014). Além disso, os mamíferos são incapazes de sintetizar os ácidos graxos de novo com ligações duplas nas posições n-6 (série linoleica) e n-3 (série linolênica) por falta de enzimas desaturase (Byrne *et al.*, 2017), portanto, os PUFAs devem ser incluídos na dieta.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do óleo de soja rico em PUFAs n-6 e n-3 adicionado na dieta em quantidades de 3 e 6%, sobre a criopreservação do sêmen de ovino Pelibuey.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização

O estudo foi realizado durante os meses de setembro a novembro de 2018 no Pelibuey and Blackbelly Sheep Germplasm Bank do Instituto Nacional de Pesquisas Florestais, Agricultura e Pecuária (INIFAP) no município de Mocochoá, Yucatán, México, localizado na região centro-norte do estado, entre os paralelos 21° 05' e 21° 10' Latitude norte e meridianos 89° 27' e 89° 30' Longitude oeste, a uma altitude de 9 m acima do nível do mar. O clima predominante na região é quente sub úmido (Aw0) com chuvas no verão, com uma precipitação de 997 a 1132 mm, e uma temperatura média anual de 26,5 °C.

### Animais

Foram utilizados 27 ovinos machos da raça Pelibuey, com idade média de 2,0 ± 0,5 anos, peso vivo médio de 42,5 ± 2,9 kg e condição corporal de 3,5 em uma escala de 1 a 5 pontos. Os animais também foram verificados quanto a quaisquer anormalidades físicas que pudessem excluí-los do estudo.

### Dieta

As ovelhas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos (n=9 por grupo), sendo cada grupo alimentado com diferentes porcentagens de óleo de soja (OS) na dieta: Tratamento de controle (T1): (0% OS); Tratamento 2 (T2): 3% OS e Tratamento 3 (T3): 6% OS, complementado com 30% de ração comercial (NUTRIMYN Borrego 14% PC, MYN Distribuidora de S. A de C.V.) e 70% capim CT-115 (*Pennisetum purpureum*) (Tabela 1). As rações foram alimentadas gratuitamente a 450 g<sup>-1</sup>/a<sup>-1</sup>/d<sup>-1</sup> pela manhã (11:30h), durante 60 dias (espermatogênese em ovelhas: 58 dias; Díaz *et al.* 2017), incluindo um período de adaptação de 14 dias, onde o óleo de soja (Bakers & Chefs®, Hermosillo, México) foi gradualmente adicionado à dieta até atingir o nível estabelecido em cada tratamento.



**Tabela 1. Composição química das dietas experimentais**

Componentes	T1	T2	T3
Proteína (%)	14.00	14.00	14.00
Energia (Mcal EM/kg MS) *	2.71	2.79	2.64
Cálcio (g).	6.3	6.3	6.3
Fósforo (g).	3.2	3.2	3.2
Óleo de soja 3 % (g).	0	300	0
Óleo de soja 6 % (g).	0	0	550

\*Estimado con base al NRC (2007). \*Estimado com base no NRC (2007)

### Coleta de amostras de sêmen

Usando uma vagina artificial e com a ajuda de um boneco de ovelha, foram selecionados 162 ejaculados (6 ejaculados/ ovelha<sup>-1</sup>; 54/grupo<sup>-1</sup>) que atendessem aos seguintes critérios: volume >0,5, motilidade de massa >4 (escala 0-5), motilidade >70% e concentração de esperma >3.000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (Arando *et al.*, 2019, 2020). O sêmen era coletado duas vezes por semana (uma ejaculação/dia/reprodutor) pela manhã (8:00), e por 3 semanas após o período de suplementação.

### Diluição do esperma

Os ejaculados selecionados foram diluídos com Triladyl<sup>®</sup> + água bidestilada + 20% gema de ovo para uma concentração final de 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e depois embalados em palhinhas francesas de 0,25 mL (Minitüb<sup>®</sup>, Tiefenbach, Alemanha).

### Congelamento do sêmen

O congelamento das amostras foi realizado colocando as palhetas 4 cm acima da superfície de nitrogênio líquido (LN2) por 10 minutos, imediatamente após o qual as palhetas foram imersas em LN2 e armazenadas até a avaliação.

### Descongelamento do sêmen

O procedimento de descongelamento foi realizado mergulhando as palhetas em um banho de água a 37°C por 30 segundos.

### Concentração de esperma

5 µL da amostra de sêmen foram diluídos em 995 µL de água destilada. Posteriormente, 9 µL da amostra diluída foram colocados em cada um dos dois lados da câmara Bückner e 4 campos de cada lado foram capturados com o sistema computadorizado de análise de esperma da Estação IA (SPERM.TECH<sup>®</sup>, Valência, Espanha).



### **Motilidade do espermatozóide**

A motilidade foi analisada com o sistema da Estação AI colocando 5  $\mu\text{L}$  de sêmen descongelado diluído a  $\sim 30 \times 10^6/\text{mL}$  de espermatozóides em uma câmara de contagem Makler<sup>®</sup> (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) pré-aquecida a 37 °C; e pelo menos cinco campos com um mínimo de 300 espermatozóides/amostra foram capturados. Os parâmetros de motilidade analisados foram: Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade retilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade média (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), Índice de linearidade ( $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$ ), Índice de retidão ( $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$ ), Índice de oscilação ( $\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$ ), Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ) e Frequência do batimento da cauda (BCF, Hz).

### **Viabilidade dos espermatozóides**

A viabilidade do espermatozóide foi avaliada pelo SYBR-14 e a coloração com iodeto de propidium (IP) (Live/Dead<sup>®</sup> kit L-7011, Invitrogen<sup>™</sup>). As amostras foram coradas com 1  $\mu\text{L}$  de SYBR-14 (10  $\mu\text{M}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de PI (12  $\mu\text{M}$ ) e incubadas durante 10 minutos a 37°C no escuro. Posteriormente, 5  $\mu\text{L}$  da amostra foram colocados em uma lâmina pré-aquecida a 37°C e avaliados usando um microscópio de epifluorescência (LWScientific i40-DNA). A porcentagem de células viáveis foi determinada pela contagem de 200 espermatozóides por amostra. As células coradas com SYBR 14 (fluorescência verde) foram consideradas viáveis; enquanto as células coradas com PI (fluorescência vermelha) foram consideradas mortas.

### **Integridade do acrossoma**

Foi avaliado pela coloração FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ , L-0770, Sigma-Aldrich<sup>™</sup>). As amostras foram coradas com 5  $\mu\text{L}$  de FITC-PSA e incubadas por 30 minutos a 37°C no escuro; 5  $\mu\text{L}$  da amostra foram imediatamente colocados em uma lâmina e avaliados. A porcentagem de células com acrossomo intacto foi determinada contando 200 espermatozóides por amostra. Os espermatozóides corados com FITC-PSA (fluorescência verde) foram considerados como tendo o acrossomo danificado; aqueles sem fluorescência foram considerados como intactos.

### **Atividade mitocondrial**

Foi analisado com a coloração JC-1 (153  $\mu\text{M}$ , Sondas Moleculares<sup>®</sup> T-3168, Invitrogen<sup>™</sup>). As amostras foram coradas com 1  $\mu\text{L}$  de JC-1 e incubadas por 10 minutos a 37°C no escuro, depois 5  $\mu\text{L}$  da amostra foram colocados em uma lâmina e analisados. A porcentagem de espermatozóides com atividade mitocondrial foi determinada pela contagem de 200 células por amostra. Os espermatozóides com atividade mitocondrial foram considerados como espermatozóides com fluorescência laranja na parte média do



flagelo, enquanto aqueles sem fluorescência foram considerados como espermatozóides sem atividade mitocondrial.

### **Integridade da membrana plasmática da cauda (HOST)**

Isto foi avaliado com uma diluição de 5 µL de amostra de esperma em 50 µL de solução de endosmose (0,735 g de citrato de sódio di-hidratado e 1,351 g de frutose em 100 mL de água destilada) a 100 mOsm/L e incubado por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, 5 µL da amostra foram colocados em uma lâmina e analisados sob um microscópio de contraste de fase. A porcentagem de espermatozóides HOST foi determinada pela contagem de 200 células por amostra. Os espermatozóides com caudas enroladas foram considerados como tendo a membrana da cauda intacta (endosmose positiva); enquanto aqueles sem caudas enroladas foram considerados como tendo a membrana da cauda danificada (endosmose negativa).

### **Análise estatística**

As variáveis expressas em porcentagem: motilidade total, motilidade progressiva, viabilidade, atividade mitocondrial, acrossomos intactos e Host, foram transformadas para  $\arcsin\sqrt{\text{variável}/100}$  antes da análise. Posteriormente, foram analisadas com uma ANOVA; e para encontrar diferenças estatísticas entre tratamentos, o teste de Tukey foi utilizado na  $P \leq 0.05$ , através do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS Inst. Inc., 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Numerosos estudos demonstraram que a inclusão de PUFA's na dieta pode melhorar a funcionalidade das células espermáticas (Sullivan *et al.*, 2018), bem como a crioresistência (Towhidi *et al.*, 2012; Fair *et al.*, 2014), influenciando a composição e a estrutura das membranas espermáticas. Por outro lado, outros estudos mencionam que as dietas contendo PUFA's produzem um aumento na incorporação de DHA nos lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides (Gholami *et al.*, 2010), causando uma diminuição no conteúdo de colesterol e, conseqüentemente, um aumento na suscetibilidade dos espermatozóides ao choque frio (Díaz *et al.*, 2017). Neste sentido, os valores obtidos dos tratamentos T1 e T3 foram similares e superiores ( $P < 0,05$ ) ao T2, tanto em motilidade total ( $57,8 \pm 2,3; 59,6 \pm 2,6\%$  vs  $46,8 \pm 3,3\%$ ) quanto em motilidade progressiva ( $27,0 \pm 0,3; 30,2 \pm 1,2\%$  vs  $14,0 \pm 2,1\%$ ), respectivamente. Estes resultados são similares aos registrados por Losano *et al.* (2017) em sêmen descongelado de touros que foram previamente alimentados com 6% de óleo de palma por 60 dias; assim como os relatados por Díaz *et al.* (2017) em amostras de esperma descongelado de ovelhas Araucano previamente suplementadas com 3% de óleo de peixe, onde a motilidade total diminuiu e os outros parâmetros de motilidade não mostraram diferenças com relação ao tratamento de controle.



Khoshvaght *et al.* (2016), observaram maior motilidade progressiva no sêmen descongelado de touros Holstein previamente suplementado com 3,5% de óleo de peixe por 11 semanas, semelhante ao relatado em amostras de sêmen descongelado de touros Holstein suplementados com 50 g de ácido linoleico conjugado (Lutrell®) por 10 semanas (Karimi *et al.*, 2016). Para a velocidade média (VAP), T1 ( $71,4 \pm 4,7 \mu\text{m/s}$ ) foi maior ( $P < 0,05$ ) que T2 e T3 ( $53,8 \pm 3,0$  e  $50,3 \pm 6,8 \mu\text{m/s}$ , respectivamente); enquanto para os outros parâmetros de motilidade analisados (LIN, STR, WOB, ALH e BCF) não foram encontradas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos (tabela 2); isto é semelhante ao que foi encontrado por Byrne *et al.* (2017) em amostras de esperma descongelado de touros Holstein pubescentes alimentados com óleo de açafrão; onde os parâmetros de motilidade não foram afetados, mas a amplitude do deslocamento da cabeça (ALH) foi maior no que diz respeito ao controle.

Sabe-se que óleos de origem animal, como o óleo de peixe, contêm concentrações mais altas de PUFA n-3 (Omega-3) do que os de origem vegetal (Omega-6); foi até mesmo demonstrado que a suplementação de PUFA n-3 na dieta modifica a composição de ácidos graxos da membrana do esperma, melhorando a qualidade do sêmen. Esses efeitos foram relatados em espermatozoides de ovinos (Samadian *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2017), cavalos (Brinsko *et al.*, 2005), suínos (Rooke *et al.*, 2001), touros (Khoshvaght *et al.*, 2016; Byrne *et al.*, 2017), cães (Alonge *et al.*, 2019) e humanos (Martínez-Soto *et al.*, 2012).



**Tabela 2. Efeito da suplementação dietética com óleo de soja sobre a motilidade do sêmen de ovinho descongelado**

Parâmetros de motilidade	Tratamento (óleo de soja %)		
	T1 (0 %)	T2 (3 %)	T3 (6 %)
MT (%)	57.8 ± 2.3 <sup>a</sup>	46.8 ± 3.3 <sup>b</sup>	59.6 ± 2.6 <sup>a</sup>
MP (%)	27.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	14.0 ± 2.1 <sup>b</sup>	30.2 ± 1.2 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	71.4 ± 4.7 <sup>a</sup>	53.8 ± 3.09 <sup>b</sup>	50.3 ± 6.8 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	113.3 ± 6.0 <sup>a</sup>	91.7 ± 3.50 <sup>a</sup>	82.1 ± 4.7 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	53.9 ± 1.9 <sup>a</sup>	36.8 ± 2.76 <sup>a</sup>	36.5 ± 3.2 <sup>a</sup>
LIN (%)	44.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	36.1 ± 1.94 <sup>a</sup>	41.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
STR (%)	69.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	59.0 ± 2.80 <sup>a</sup>	65.0 ± 2.9 <sup>a</sup>
WOB (%)	61.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	57.0 ± 1.55 <sup>a</sup>	59.6 ± 1.4 <sup>a</sup>
ALH (µm)	3.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	11.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	8.8 ± 3.51 <sup>a</sup>	8.7 ± 6.7 <sup>a</sup>

<sup>(ab)</sup> Super-escritos diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). MT, motilidade total; MP, motilidade progressiva; VAP, velocidade média; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade retilínea; LIN, índice de linearidade ( $LIN = VSL/VCL \times 100$ ); STR, índice de retidão ( $STR = VSL/VAP \times 100$ ); WOB, índice de oscilação ( $WOB = VAP/VCL \times 100$ ); ALH, amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF, frequência do batimento da cauda

Em termos de integridade do acrossoma, T1 (66,6±7,6%) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que T2 e T3 (41,3±3,8 e 29,2±5,2%, respectivamente). Isto é semelhante ao relatado por [Losano et al. \(2017\)](#) em amostras de esperma descongelado de touros que foram previamente alimentados com 6% de ácidos graxos por 60 dias; entretanto, difere do relatado por [Byrne et al. \(2017\)](#) em sêmen descongelado de touros puberais Holstein-Fresian alimentados com açafrão e óleo de peixe por 10 dias. Ao contrário do descrito por [Díaz et al. \(2017\)](#) em amostras de esperma descongelado de ovinos Araucano, que foram alimentados com óleo de peixe por 60 dias. Este resultado foi provavelmente devido ao aumento do estresse oxidativo causado pelos processos de congelamento e descongelamento das amostras, que foi exacerbado pelo efeito dos PUFA's sobre o aumento da suscetibilidade da membrana do esperma à peroxidação lipídica.

A viabilidade do T1 (43,3±6,5%) foi semelhante ao T2 (36,6±3,1%) e T3 (53,0±4,6%); embora T2 e T3 fossem diferentes ( $P < 0,01$ ) (tabela 3). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por [Moallem et al. \(2015\)](#), [Losano et al. \(2017\)](#) e [Byrne et al. \(2017\)](#) em amostras de esperma descongelado de touros alimentados com ácidos graxos e ômega-3 por 13 semanas; assim como em amostras de sêmen descongelado de touros alimentados com ácidos graxos (Megalac<sup>®</sup>) por 60 dias e em amostras de sêmen descongelado de touros puberais Holstein-Fresian, que foram alimentados com





óleo de açafrão e óleo de peixe por 12 dias em relação ao tratamento de controle, respectivamente. Entretanto, estes resultados diferem daqueles relatados por [Díaz et al. \(2017\)](#), onde a viabilidade das amostras de esperma de ovinos descongelados foi maior no tratamento de controle em comparação com o tratamento de suplementação alimentar com óleo de peixe por 60 dias. Por outro lado, [Khoshvaght et al. \(2016\)](#) relataram maior viabilidade de esperma em amostras de sêmen descongelado de touros de Holstein, que foram previamente suplementados com óleo de peixe por 11 semanas.

Diferentes estudos indicam que o aumento da concentração de esperma bovino de cadeia longa n-3 PUFAs não produz melhorias apreciáveis na fluidez da membrana plasmática em comparação com uma dieta basal ([Moallem et al. 2015](#)); [Byrne et al. \(2017\)](#), que pode ter sido o caso com PUFAs n-6 de óleo de soja nos espermatozoides de ovinos peludos deste estudo.

A atividade mitocondrial em T3 ( $65,3 \pm 6,5\%$ ) foi maior, com relação a T1 e T2 ( $37,3 \pm 7,3$  e  $33,6 \pm 3,5$ ), respectivamente ( $P < 0,05$ ). Estes resultados diferem daqueles relatados por [Losano et al. \(2017\)](#), onde a atividade mitocondrial não diferiu entre os tratamentos de amostras de esperma descongelado de touros que foram previamente alimentados com 6% de ácidos graxos durante 60 dias. Foi demonstrado que a inclusão de PUFAs n-6 na dieta pode produzir uma integração de fosfolípidos na membrana plasmática, substituindo ácidos graxos saturados que são mais lineares e rígidos, gerando um aumento na fluidez e plasticidade das membranas, facilitando a interação com as proteínas enzimáticas da membrana e, portanto, sua função ([Sullivan et al., 2018](#)). Além disso, a redução da quantidade desses fosfolípidos, que constituem 10% dos fosfolípidos mitocondriais, altera o potencial da membrana ([Jiang et al., 2000](#)). Na maioria dos tecidos de mamíferos, o ácido graxo mais predominante é o ácido linoleico (18:2 n-6) ([Guyenet & Carlson, 2015](#)), que é obtido através de óleos vegetais dietéticos, tais como óleos de girassol, soja, milho e canola; assim como nozes e sementes. Este ácido é necessário para o bom funcionamento de vários complexos da cadeia respiratória mitocondrial e, portanto, está envolvido em processos essenciais como a geração ATP ([Mileykovskaya et al., 2005](#)), condução de prótons através do citocromo bc1 ([Lange et al., 2001](#)); assim como na prevenção da instabilidade osmótica e desacoplamento da cadeia quando a taxa de respiração é alta ([Koshkin & Greenberg, 2002](#)).

Na integridade da membrana plasmática da cauda (teste do hospedeiro), não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ); o que está de acordo com o relatado no sêmen descongelado de touros Holstein alimentados com 50 g de ácido linoleico ([Karimi et al., 2016](#)). Entretanto, [Gholami et al. \(2010\)](#) mencionam que o n-3 PUFA aumenta a incorporação de DHA no pedaço de espermatozoides da cabeça e da cauda, o que influencia a composição bioquímica da membrana do espermatozoide, dando-lhe melhor plasticidade e estabilidade.



**Tabela 3. Efeito da suplementação dietética de óleo de soja sobre a motilidade, atividade mitocondrial, acrossomos intactos e hospedeiro de sêmen de ovino descongelado**

Tratamento	Óleo de soja (%)	Viabilidade (%)	Atividade mitocondrial (%)	Acrossomos intactos (%)	Host (%)
T1	0	43.3 ± 9.5 <sup>ab***</sup>	37.3 ± 7.3 <sup>b*</sup>	66.6 ± 7.6 <sup>a*</sup>	29.3 ± 1.6 <sup>a</sup>
T2	3	36.6 ± 3.1 <sup>b</sup>	33.6 ± 3.5 <sup>b</sup>	41.3 ± 3.8 <sup>b</sup>	21.5 ± 2.1 <sup>a</sup>
T3	6	53.0 ± 4.6 <sup>a</sup>	65.3 ± 6.5 <sup>a</sup>	29.2 ± 5.2 <sup>b</sup>	25.0 ± 2.5 <sup>a</sup>

<sup>(ab)</sup> Superescritos diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05\*) (p<0,01\*\*\*\*)

Finalmente, estes resultados contraditórios obtidos neste estudo com os de outros autores podem estar associados a muitos fatores, tais como: espécie e raça do animal, tempo de suplementação, estado reprodutivo do animal, quantidade de PUFAs presentes na membrana do esperma, concentração e tipo de PUFAs adicionados à dieta, entre outros ([Esmaeili et al., 2012<sup>a</sup>](#); [Liu et al., 2015](#); [Martínez-Soto et al., 2012](#)).

Nos ovinos, a dieta n-3 PUFAs provoca modificações nos perfis dos ácidos graxos do esperma, desempenhando um papel importante na qualidade do sêmen e na tolerância ao choque frio, isto se deve à incorporação de DHA nos fosfolípidos da membrana celular ([Esmaeili et al., 2012<sup>b</sup>](#)), pois foi demonstrado que existe uma relação das quantidades de DHA na membrana do esperma com sua crioresistência ([Martínez-Soto et al., 2012](#)). Por outro lado, foi documentado que a dieta n-3 PUFAS promove a suscetibilidade da membrana espermática à peroxidação lipídica, afetando a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Apesar disso, foi relatado que uma dieta enriquecida com vitamina E, zinco, selênio, ácido fólico e n-3 PUFA por pelo menos dois meses, em quantidades adequadas, melhora a quantidade e a qualidade do esperma, especialmente a contagem e a motilidade do esperma, modificando as propriedades físicas e funcionais da membrana da célula espermática (Alonge et al., 2019). Neste sentido, um estudo futuro com suplementação à base de ácidos graxos PUFAs n-6 e sua associação com antioxidantes seria aconselhável para evitar possíveis danos causados pelo efeito da peroxidação lipídica.

## CONCLUSÕES

A inclusão do óleo de soja na dieta de ração comercial e do capim CT-115 não melhora a criopreservação do sêmen de ovelha Pelibuey, embora a adição de 6% aumente a atividade mitocondrial.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Projeto Fiscal INIFAP No. 1513272874.



## LITERATURA CITADA

ALIZADEH A, Esmaeili V, Shahverdi A, Rashidi L. 2014. Dietary fish oil can change sperm parameters and fatty acid profiles of ram sperm during oil consumption period and after removal of oil source. *Cell Journal*. 16(3): 289-298. ISSN: 2228-5806. <https://celljournal.org/journal/article/abstract/292>

ALONGE S, Melandri M, Leoci R, Lacalandra GM, Caira M, Aiudi GG. 2019. The effect of dietary supplementation of vitamin E, selenium, zinc, folic acid, and N-3 polyunsaturated fatty acids on sperm motility and membrane properties in dogs. *Animals*. 9(2):34. ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani9020034>

ARANDO A, Delgado JV, Bermúdez-Oria A, León JM, Fernández-Prior A, Nogales S, Pérez-Marín CC. 2019. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*. ISSN:1439-0531. 86(2):33-39. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.002>

ARANDO A, Delgado JV, Bermúdez-Oria A, León JM, África Fernández-Prior A, Nogales S, Pérez-Marín C. 2020. Effect of olive-derived antioxidants (3,4-dihydroxyphenylethanol and 3,4 dihydroxyphenylglycol) on sperm motility and fertility in liquid ram sperm stored at 15°C or 5°C. *Reproduction in Domestic Animals*. ISSN:1439-0531. 55(1):325-332. <https://doi.org/10.1111/rda.13631>

BRINSKO S, Varner D, Love C, Blanchard T, Day B, Wilson M. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen Stallion semen. *Theriogenology*. 63(5):1519-1527. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.010>

BYRNE CJ, Fair S, English AM, Holden SA, Dick JR, Lonergan P, Kenny DA. 2017. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation of young post-pubertal dairy bulls alters the fatty acid composition of seminal plasma and spermatozoa but has no effect on semen volume or sperm quality. *Theriogenology*. 90(1):289-300. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.014>

CASTELLANO CA, Audet I, Bailey JL, Laforest JP, Matte JJ. 2010. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology*. 74(8):1482-1490. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.020>

CHUNRONG LV, Guoquan WU, Hong Q, Quan G. 2019. Spermatozoa Cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and Biobanking*. 17(2):171-182. ISSN: 1947-5535. <http://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>



DEOL P, Fahrman J, Yang J, Evans RJ, Rizo A, Grapov D, Salemi M, Wanichthanarak K, Fiehn O, Phinney B, Hammock DB and Sladek MF. 2017. Omega-6 and omega-3 oxylipins are implicated in soybean oil-induced obesity in mice. *Scientific Reports*. 7(12488): 1-13. ISSN: 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12624-9>

DÍAZ R, Torres MA, Paz E, Quiñones J, Bravo S, Farías JG, Sepúlveda N. 2017. Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoa. *Animal reproduction science*. 183:132-142. ISSN:0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.002>

ESMAEILI V, Shahverdi A, Alizadeh AR, Alipour H, Towhidi A, Zarrabi M. 2012<sup>a</sup>. Fatty acid profiles of ram's sperm after removing some fatty acid sources from the diets and persistency of fatty acids in sperm. *International Journal of Fertility and Sterility*. 5 (4):211–216. ISSN: 2008-076X.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4152183/pdf/Int-J-Fertil-Steril-5-211.pdf>

ESMAEILI V, Shahverdi AH, Alizadeh AR, Alipour H, Chehrazi M. 2012<sup>b</sup>. Saturated, Omega-6 and Omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrology*. 46(1):42-49. ISSN:1439-0272. <https://doi.org/10.1111/and.12040>

FAIR S, Doyle D, Diskin MG, Hennessy AA, Kenny DA. 2014. The effect of dietary N-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. *Theriogenology*. 81(2):210-219. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.002>

GHOLAMI H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli MH. 2010. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*. 74(9):1548-1558. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.025>

GRÖTTER LG, Cattaneo L, Estela P, Kjelland ME, Ferré LB. 2019. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. 54(4):655-665. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>

GÜRLER H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic JP, Bollwein H. 2015. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 86(2):562-571. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>



GUYENET SJ, Carlson SE. 2015. Increase in adipose tissue linoleic acid of US adults in the last half century. *Advances in Nutrition*. 6(6):660-664. ISSN: 21565376. <https://doi.org/10.3945/an.115.009944>

JIANG F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML. 2000. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*. 275(29):22387-94. ISSN: 0021-9258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909868199>

KARIMI S, Staiger MP, Buunk N, Fessard A, Tucker N. 2016. Uniaxially aligned electrospun fibers for advanced nanocomposites based on a model PVOH-Epoxy System. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 81:214–221. ISSN: 1359-835X. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.11.016>

KHOSHVAGHT A, Towhidi A, Zare-shahneh A, Noruozi M, Zhandi M, Dadashpour N, Karimi R. 2016. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology*. 85(5):807-812. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.023>

KOSHKIN V, Greenberg ML. 2002. Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochemical Journal*. 364(Pt 1): 317-322. ISSN: 1470-8728. <https://doi.org/10.1042/bj3640317>

LANGE C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C. 2001. Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *The EMBO Journal*. 20(23): 6591-6600. ISSN: 1460-2075. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6591>

LIU Q, Zhou YF, Duan RJ, Wei HK, Jiang SW, Peng J. 2015. Effects of dietary n-6: n-3 fatty acid ratio and vitamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. *Animal Reproduction Science*. 162:11–19. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.012>

LOSANO JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, Rocha CC, Brito MM, Perez EGA, Nichi M. 2017. Effect of vitamin E and polyunsaturated fatty acids on cryopreserved sperm quality in *Bos taurus* bulls under testicular heat stress. *Animal Biotechnology*. 29(2): 100-109. ISSN: 1049-5398. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1322973>

MANDAL R, Badyakar D, Chakrabarty J. 2014. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*. 2014:9. ISSN: 2314-8446 <https://doi.org/10.1155/2014/190542>



MARTINEZ-SOTO JC, Landeras J, Gadea J. 2012. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. 1(3):365-375. ISSN: 2047-2927. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x>

MILEYKOVSKAYA E, Zhang M, Dowhan W. 2005. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry*. 70:154-158. ISSN: 1608-3040. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0095-2>

MINGUEZ-ALARCÓN L, Chavarro JE, Mendiola J, Roca M, Tanrikut C, Vioque J, Jørgensen N, Torres-Cantero AM. 2017. Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. *Asian Journal of Andrology*. ISSN:1745-7262. 19(2):184-190. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.190323>

MOALLEM U, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z. 2015. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 83(7):1110-1120. ISSN 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.008>

National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington, DC: The National Academies Press. ISBN: 978-0-309-47324-8. <https://doi.org/10.17226/11654>

NURLATIFAH A, Khotijah L, Komalasari K, Astuti A. 2020. The effect of flushing with fatty acid supplementation in ewes ration on folliculogenesis. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 411: 012036. ISSN 1755-1315. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012036>

REBOLLAR PG, García-García RM, Arias-Álvarez M, Millán P, Rey AI, Rodríguez M, Formoso-Rafferty N, De la Riva S, Masdeu M, Lorenzo PL. 2014. Reproductive long-term effects, endocrine response and fatty acid profile of rabbit does fed diets supplemented with n-3 fatty acids. *Animal Reproduction Science*. 146 (3-4):202-209. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.021> .

ROOKE J, Shao CC, Speake BK. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*. 121(2): 315-322. ISSN: 1470-1626. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210315>

RODRIGUES CA, Ruiz MC, Dan De Nardo DC, Mothé BG, Rossi MF, De Sousa BD, Netto AH, De Souza FF. 2017. Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs. *Semina: Ciências Agrárias*. 38(5):3069-3076. ISSN: 1676-546X. <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445753229018.pdf>



SALEHI R, Colazo MG, Oba M, Ambrose DJ. 2016. Effects of prepartum diets supplemented with rolled oilseeds on calf birth weight, postpartum health, feed intake, milk yield, and reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99(5):3584-3597. ISSN 0022-0302. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10186>

SAMADIAN F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M. 2010. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal*. 4(12): 2017-2022. ISSN: 1751-732X. <https://doi:10.1017/S1751731110001308>

S.A.S. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide. Cary, NC, USA.

SULLIVAN ME, Pennington RE, D Green W, A Beck M, Brown AD, Shaikh RS. 2018. Mechanisms by Which Dietary Fatty Acids Regulate Mitochondrial Structure-Function in Health and Disease. *Advance in Nutrition*. 9(3): 247-262. ISSN 2161-8313. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy007>

TOWHIDI A, Parks JE. 2012. Effect of n-3 fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 29(10):1051-1056. ISSN: 1058-0468. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9834-7>

VAN TRAN L, Malla BA, Kumar S, Tyagi AK. 2017. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction - A review. *Asian-Australas Journal of Animal Science*. 30(5):622-637. ISSN: 1976-5517. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>

YESTE M, Barrera X, Coll D, Bonet S. 2011. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with Omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*. 76(1):184-96. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.032>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>