

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

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE TOUROS COM
ASTAXANTINA SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**

JOICE MARIA BAZERLA ANDRETA

Médica Veterinária

2023

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

**SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE TOUROS COM
ASTAXANTINA SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**

Joice Maria Bazerla Andreta

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Dissertação de Mestrado apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias.

A561s Andreta, Joice Maria Bazerla
Suplementação nutricional de touros com astaxantina sobre
a qualidade espermática e criopreservação de sêmen / Joice
Maria Bazerla Andreta. -- Jaboticabal, 2023
70 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Antioxidante. 2. Carotenoides. 3. Espécies reativas de
oxigênio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE TOUROS COM ASTAXANTINA
SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

AUTORA: JOICE MARIA BAZERLA ANDRETA

ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias,
área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participação Presencial)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
LINDSAY UNNO GIMENES
Data: 13/12/2023 15:05:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ANDRÉ MACIEL CRESPILO (Participação Presencial)
Universidade Santo Amaro (UNISA) / São Paulo/SP

Documento assinado digitalmente
ANDRÉ MACIEL CRESPILO
Data: 14/12/2023 10:12:15-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pesquisador Dr. FÁBIO MORATO MONTEIRO (Participação Presencial)
Instituto de Zootecnia (IZ) / São Carlos/SP

Documento assinado digitalmente
FÁBIO MORATO MONTEIRO
Data: 13/12/2023 15:23:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 20 de outubro de 2023

Impacto potencial desta pesquisa

Pesquisas sobre biotecnologias, promovem impactos científicos e econômicos na pecuária. A suplementação oral de astaxantina em touros reduz o estresse oxidativo decorrente da dificuldade de adaptação, promovendo a melhoria da qualidade do sêmen. Isso torna a produção de doses de sêmen mais eficiente, o que possibilita a disseminação de material genético melhorador para o rebanho nacional e internacional.

Potential Impact of this Research

Research on biotechnologies generates scientific and economic impacts in livestock farming. Oral supplementation of astaxanthin in bulls reduces oxidative stress resulting from adaptation difficulties, enhancing semen quality. This makes semen production more efficient, enabling the dissemination of improved genetic material for both national and international livestock.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOICE MARIA BAZERLA ANDRETA – nascida na cidade de Poloni – São Paulo, no dia 18 de janeiro de 1996. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, em fevereiro de 2014. Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2018. Em janeiro de 2019, ingressou como bolsista no Programa de Aprimoramento Profissional na Área de Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais pelo Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, cuja conclusão se deu em fevereiro de 2021. Em outubro de 2019, deu início ao MBA em Agronegócio pela Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz” - ESALQ/USP, tendo o concluído em agosto de 2021. Ingressou em agosto de 2021 no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, na área de Reprodução Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Campus* de Jaboticabal/SP, sob orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, com recebimento de bolsa CAPES.

“A vida é sofrimento, e sobreviver é encontrar sentido na dor.

Se há, de algum modo, um propósito na vida, deve havê-lo também na dor e na morte. Cada um deve descobri-lo por si mesmo e aceitar a responsabilidade que sua resposta implica.

Se tiver êxito, continuará a crescer apesar de todas as indignidades.” – Viktor Frankl.

Dedico este trabalho a minha família: Antônio, Ivânia, Jéssica e Júlia. Não houve um único dia das nossas vidas, que não foi vivido em união e propósito. Tudo o que vivi, estudei, aprendi e amadureci ao longo de tantos anos de caminhada, eu dedico com muito amor a vocês, que são e sempre serão a minha maior base.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus. Inúmeras foram as noites nas quais houve choro e ranger de dentes, mas não houve uma sequer que Deus não estivesse ao meu lado, sendo força, auxílio e proteção.

Agradeço ao meu pai, Antônio Cezar Andreta, que viveu e vive uma vida honrada e dedicada a família e ao campo, oferecendo a nós, filhas e esposa, seu suor e imensurável amor. Eu não seria nada sem o seu exemplo, sem a sua garra e sabedoria.

Agradeço à minha mãe, Ivânia Bazerla Andreta, que sonhou os meus sonhos, que chorou os meus sofrimentos, que me amou quando eu mesma já sabia amar. Todo sentimento bom que vem de mim, é fruto do seu carinho, do seu exemplo. Em especial, agradeço por ser minha maior intercessora, que reza por mim e pela nossa família todos os dias, sendo nossa maior fortaleza.

Agradeço às minhas irmãs, Jéssica Bazerla Andreta e Júlia Maria Bazerla Andreta, eu não seria completa sem vocês e nada que eu diga vai representar de forma sincera a nossa cumplicidade. Amo vocês infinitamente.

Agradeço aos meus amigos/irmãos da faculdade, Alcides, Beatriz, Larissa, Letícia, Ligia, Naysilyer, vocês são a maior conquista que a veterinária poderia ter me oferecido. Aos meus amigos da vida, Ananda, Camila, Cláudia, Eduardo, João Diego, Luana, Nayara e Miguel, Maria Júlia e Vinicius, Paulo, Rafael, Vitória. Cada um de vocês sabe o apoio incondicional que me deram, e o quanto sou grata por isso.

Agradeço às minhas professoras/orientadoras da graduação e da vida, Profa. Dra. Anelise Ribeiro Peres e Profa. Dra. Suellen Miguez Gonzalez. Tudo que eu sei sobre ciência e reprodução animal, é fruto da semente plantada um dia por vocês. Sou e serei eternamente grata por cada conselho, cada direcionamento, cada puxão de orelha e, principalmente, por todo amor e ética que vocês dedicam à profissão e transferem isso a todos ao seu redor. A vocês meu amor, admiração e gratidão.

Agradeço à toda família Cordeiro. Eu fui acolhida em um momento decisivo e importante e, talvez, vocês não tenham dimensão do quanto foram fundamentais para que esse projeto tenha se concretizado. Serei eternamente grata e dedicarei a vocês sempre o meu amor e as minhas orações.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Lindsay, que embarcou nesse desafio comigo. Agradeço também às “meninas da pós”, Aline, Alessandra, Cláudia,

Maria Eduarda, Marina, Fernanda, Laura e Nelise, nosso seletor grupo de cientistas, muito obrigada por dividirem esse momento comigo.

Agradeço de forma especial à Droga Vet (São José do Rio Preto). Sem o apoio e incansável dedicação de vocês, este trabalho não teria saído do papel. Ao Rodrigo, que pacientemente me auxiliou em encontrar a melhor fórmula, a melhor associação, e não mediu esforços para que o nosso produto fosse entregue com excelência e qualidade. À todos vocês, funcionários e farmacêuticos, muito obrigada.

Agradeço imensamente à Central Bela Vista e à CRV Lagoa. Graças à vocês, foi possível agregar tecnologia e qualidade antes inimagináveis ao projeto. Serei sempre grata à oportunidade, compromisso e parceria que cada membro e colaborador desempenhou para que este projeto pudesse ganhar forma e ser concluído com tanto sucesso. Agradeço de forma especial à toda a equipe do Laboratório de Análises, aos técnicos e auxiliares, estagiários e ao Prof. Dr. André Maciel Crespilho, que compartilharam comigo conhecimento, técnica, precisão, dedicação e respeito pelo que fazem, entregando qualidade em cada etapa do processamento do sêmen. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e, em especial, à Dra. Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – SP, que colaboraram com a etapa final de análises, agregando conhecimento e técnicas que permitiram obter resultados fundamentais para a conclusão do projeto. Particularmente, agradeço à Camila por dividir comigo sua visão sobre o mundo, sobre ser pesquisadora, veterinária, esposa e mãe em uma grandiosa jornada. Levarei nossas conversas sempre com imenso carinho.

E, por último e não menos importante, agradeço à “Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), por permitir que nós, pesquisadores e cientistas, continuemos desenvolvendo nossas ideias e projetos ao lado de renomados professores, representando com orgulho o nome da instituição. De coração, muito obrigada!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

SUMÁRIO

	Páginas
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	2
3. OBJETIVOS	2
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
4.1. Produção de sêmen em CCPS	2
4.2. Criopreservação de sêmen para bovinos	4
4.3. Metabolismo mitocondrial	5
4.4. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio	6
4.5. Antioxidantes	8
4.6. Carotenoides	9
4.7. Astaxantina	10
4.7.1. Uso da astaxantina na produção e reprodução animal	12
5. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ASTAXANTINA SOBRE A QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE “TOUROS-PROBLEMA”	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Local, animais e grupos experimentais	30
2.2. Colheita, avaliação física e morfológica do sêmen	32
2.3. Criopreservação do sêmen	33
2.4. Avaliações pós-criopreservação	34
2.4.1. Cinética espermática	34

2.4.2. Integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e estresse oxidativo	34
2.5. Análise estatística.....	36
3. RESULTADOS.....	36
3.1. Análises pré-criopreservação	36
3.2. Análises pós-criopreservação	41
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÃO	48
6. AGRADECIMENTOS	49
7. REFERÊNCIAS.....	50

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Impacto da suplementação nutricional de touros com astaxantina sobre a criopreservação de sêmen"**, protocolo nº 2937/21, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 28 de outubro de 2021.

Vigência do Projeto	10/01/2022 a 10/01/2023
Espécie / Linhagem	Bovina / Anelorados
Nº de animais	8 animais
Peso / Idade	400 kg / 3 a 6 anos
Sexo	Macho
Origem	UNESP-FCAV - Rebanho didático Reprodução Animal

Jaboticabal, 28 de outubro de 2021.

Fabiana Pilarski
Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE TOUROS COM ASTAXANTINA SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

RESUMO – Características individuais de desempenho e adaptação podem conferir a touros reprodutores problemas de produção de sêmen dentro dos parâmetros preconizados para criopreservação e produção de doses em Centrais de Coleta e processamento de Sêmen (CCPS). Esta dificuldade individual de adaptação pode desencadear um quadro de estresse, promovendo alterações clínico-metabólicas que contribuem para um quadro de estresse oxidativo e consequente redução da qualidade espermática. O uso de carotenoides como fornecimento de potencial antioxidante é uma importante ferramenta no controle do estresse oxidativo. Dentre este grupo, a astaxantina (ASTX) se destaca por possuir elevado potencial antioxidante no combate às espécies reativas de oxigênio (ERO). Estudos em diversas espécies avaliaram o impacto da suplementação oral de ASTX. Entretanto, não foram encontrados trabalhos com o seu uso na dieta para touros reprodutores com problemas de qualidade espermática. O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da suplementação oral de ASTX sobre a qualidade pré e pós-criopreservação, e estresse oxidativo do sêmen de reprodutores bovinos considerados problemáticos para criopreservação de sêmen (touros “problema”). Para o estudo, foram selecionados 14 touros da raça Nelore mantidos em regime de coleta em uma CCPS. Com base no banco de dados da central, foram avaliados os ejaculados produzidos entre os meses de jan-ago (n=417), período esse dividido em pré-suplementação (PRE=170), suplementação (SUP=111), pós-suplementação imediata (PSI=51) e pós-suplementação tardia (PST=85). Os ejaculados foram classificados em ejaculados colhidos (EC=417), ejaculados submetidos à criopreservação (ESC=109), ejaculados liberados (ELIB=92) e doses produzidas (DP=23.602). Para suplementação, os animais foram divididos em grupo controle negativo (CONT, n = 7) e grupo tratado (ASTX, n = 7), os quais foram submetidos à suplementação oral com 0,5 mg/kg de ASTX por 60 dias. Para análises de cinética espermática, integridade de membranas e estresse oxidativo foram realizadas 7 colheitas de sêmen (C0-C6) e criopreservação durante o período de SUP e PSI. Foi observada interação grupo*período para as variáveis de motilidade total ($p<0,01$), vigor ($p<0,01$), defeitos maiores testiculares ($p=0,05$), defeitos menores ($p=0,05$) e defeitos totais ($p=0,01$) pré-criopreservação. Para as análises de cinética espermática pós-criopreservação, integridade de membranas e estresse oxidativo não foi observada diferença conforme o tratamento ou interação grupo*período. Com base em tais resultados, foi possível concluir que a suplementação oral de astaxantina teve efeitos benéficos para qualidade espermática pré-criopreservação de touros reprodutores com problemas de criopreservação de sêmen. No entanto, os benefícios da astaxantina oral não foram observados sobre qualidade e cinética espermática pós-criopreservação, integridade de membranas e estresse oxidativo, sendo necessários mais estudos sobre seus efeitos e períodos de suplementação para touros “problema” em regime de coleta em CCPS.

Palavras-chave: Antioxidante, Carotenoides, Espécies reativas de oxigênio.

NUTRITIONAL SUPPLEMENTATION OF BULLS WITH ASTAXANTHIN ON SPERM QUALITY AND SEMEN CRYOPRESERVATION

ABSTRACT – Individual performance and adaptation characteristics can cause breeding bulls to have problems producing semen within the parameters recommended for cryopreservation and production of doses in Semen Collection and Processing Centers (CCPS). This individual difficulty in adapting can lead to stress, promoting clinical-metabolic changes that contribute to oxidative stress and a consequent reduction in sperm quality. The use of carotenoids to provide antioxidant potential is an important tool for controlling oxidative stress. Among this group, astaxanthin (ASTX) stands out for its high antioxidant potential in combating reactive oxygen species (ROS). Studies on various species have evaluated the impact of oral ASTX supplementation. However, no studies were found on its use in the diet of breeding bulls with sperm quality problems. The aim of this study was to evaluate the influence of oral ASTX supplementation on the pre- and post-cryopreservation quality and oxidative stress of semen from bovine sires considered to be problematic for semen cryopreservation ("problem" bulls). For the study, 14 Nelore bulls kept in collection at a CCPS were selected. Based on the center's database, the ejaculates produced between January and August (n=417) were evaluated. This period was divided into pre-supplementation (PRE=170), supplementation (SUP=111), immediate post-supplementation (PSI=51) and delayed post-supplementation (PST=85). The ejaculates were classified as ejaculates collected (EC=417), ejaculates submitted to cryopreservation (ESC=109), ejaculates released (ELIB=92) and doses produced (DP=23,602). For supplementation, the animals were divided into a negative control group (CONT, n = 7) and a treated group (ASTX, n = 7), which were orally supplemented with 0.5 mg/kg of ASTX for 60 days. For analysis of sperm kinetics, membrane integrity and oxidative stress, 7 semen samples were collected (C0-C6) and cryopreserved during the SUP and PSI periods. A group*period interaction was observed for the variables of total motility ($p < 0.01$), vigor ($p < 0.01$), major testicular defects ($p = 0.05$), minor defects ($p = 0.05$) and total defects ($p = 0.01$) pre-cryopreservation. For the analyses of post-cryopreservation sperm kinetics, membrane integrity and oxidative stress, no difference was observed according to treatment or group*period interaction. Based on these results, it was possible to conclude that oral astaxanthin supplementation had beneficial effects on the pre-cryopreservation sperm quality of breeding bulls with semen cryopreservation problems. However, the benefits of oral astaxanthin were not observed on post-cryopreservation sperm quality and kinetics, membrane integrity and oxidative stress, and further studies are needed on its effects and supplementation periods for "problem" bulls in the CCPS collection regime.

Keywords: Antioxidant, Carotenoids, Reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferenças e semelhanças entre capacitação e criocapacitação de espermatozoides. Fonte: Adaptado de Benko <i>et al.</i> , 2022.....	5
Figura 2 - Estrutura química da Astaxantina (C ₄₀ H ₅₂ O ₄). Fonte: Adaptado de Higuera-Ciapara <i>et al.</i> , 2006.	11
Figura 3 - Posição da astaxantina na membrana celular. Fonte: Adaptado de Nishida <i>et al.</i> , 2022.....	11
Figura 4 -Períodos de realização do experimento.....	33
Figura 5 – Motilidade (%) pré criopreservação entre os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.	38
Figura 6 - Vigor (1-5) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.	38
Figura 7 - Defeitos espermáticos menores (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.....	39
Figura 8 - Defeitos espermáticos totais (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.....	39
Figura 9 - Defeitos maiores testiculares (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.....	40
Figura 10 - Percentual de ejaculados submetidos a criopreservação em relação ao total de ejaculados colhidos, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).....	44
Figura 11 - Percentual de ejaculados liberados para comercialização de doses em relação aos ejaculados submetidos a criopreservação, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).	44
Figura 12 - Número absoluto de doses comerciais produzidas por grupo, ao longo dos períodos de avaliação, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de qualidade espermática pré-criopreservação e classificação morfológica espermática, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.	37
Tabela 2 - Valor-p, média e EPM das análises pré-criopreservação, conforme efeito principal de período	41
Tabela 3 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de cinética espermática pós-criopreservação, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.	41
Tabela 4 - Valor-p para as variáveis de integridade de membrana e estresse oxidativo pós-criopreservação conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.	42
Tabela 5 - Valor-p, média e EPM das análises de cinética espermática, integridade de membranas e estresse oxidativo, conforme efeito de período	43
Tabela 6 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de produção de ejaculados e doses de sêmen, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.	43
Tabela 7 - Valor-p, média e EPM das análises de ejaculados e doses produzidas, conforme efeito principal de período	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTX	Astaxantina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzimas catalisadoras de adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCPS	Centrais de coleta e processamento de sêmen
-CO	Cetona
Cu ⁺	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Ejaculados criopreservados
ELIB	Ejaculado liberado para comercialização
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EP	Ejaculado produzido
EPM	Erro padrão médio
Fe ⁺⁺	Ferro
GH	Hormônio do crescimento
GP _x	Glutational peroxidase
GR	Glutational reductase
GSH	Glutational
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIF	Fator indizível por hipóxia
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IA	Inseminação artificial
MDA	Malondialdeído
MS	Matéria seca
MTX	Metotrexato
Na ⁺ /K	Bomba sódio-potássio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH _{oxidase}	Complexo enzimático: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa potenciador de cadeia leve de células B ativadas
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH ^o	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPU	Recuperação oocitária por aspiração folicular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRE	Período pré-suplementação
PSI	Período pós-suplementação imediato
PST	Período pós-suplementação tardia
RNS	espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
SUP	Período suplementação
TAC	Capacidade antioxidante total
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TTR	Teste de termorresistência

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O expressivo aumento no uso de biotecnologias da reprodução, torna evidente a necessidade de produção e comercialização de doses de sêmen criopreservado. Consequente a isso, se dá o incremento no número de touros em Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen no país (CCPS; ASBIA, 2023).

Nas CCPS, existem cuidados criteriosos para fornecimento de bem-estar, alimentação balanceada e manejo técnico específico para animais de alto valor genético e comercial. Apesar de tais cuidados, alguns indivíduos podem apresentar resistência à adaptação, o que leva o animal a produzir um sêmen de baixa qualidade e o impede de transmitir seu potencial melhorador através da produção de doses (Garcia-Oliveros *et al.*, 2020; Crespilho, 2021; Costa-e-Silva; Sampaio; Macedo, 2023). Assim como na espécie equina, o indivíduo que apresenta características como ejaculados com baixa concentração espermática e alterações específicas de morfologia e motilidade (Morrell *et al.*, 2011), além de demonstrar resistência à adaptação, pode ser considerado um touro problema.

A dificuldade de adaptação e ocorrência de problemas individuais destes reprodutores pode induzir um estresse efetivo, e desencadear modificações metabólicas e endócrinas (Garcia-Oliveros *et al.*, 2020; Costa-e-Silva; Sampaio; Macedo, 2023), que podem resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), culminando em um quadro de estresse oxidativo, desenvolvimento de alterações subclínicas e supressão do desempenho animal, podendo estar relacionada à redução da qualidade espermática dos touros. Uma das formas de correção do desequilíbrio redox se dá por meio do fornecimento de antioxidantes dietéticos (Ponnampalam *et al.*, 2022).

Dentre os carotenoides, grande grupo de antioxidantes dietéticos, a astaxantina (ASTX) é considerada uma das mais eficazes na remoção de ERO (Ribeiro *et al.*, 2018). Encontrada em organismos marinhos, sendo principalmente produzida pela microalga *Haematococcus pluvialis* (Nishida *et al.*, 2022), seu mecanismo antioxidante atua na degradação de ERO, e outros radicais livres, além de inibir a peroxidação lipídica das membranas celulares, evitando o acúmulo de peróxidos lipídicos (Miki, 1991; Iwamoto *et al.*, 2000; Ouchi *et al.*, 2010). Diversos estudos com a suplementação oral de astaxantina buscaram melhor compreender

os impactos do seu mecanismo de ação contra o estresse oxidativo nas diversas espécies animais.

Para a espécie bovina, estudos realizados com suplementação oral de ASTX em novilhas Sahiwal e Karan Fries (Holstein × Tharparkar) identificaram menor alteração de parâmetros fisiológicos em situação de estresse térmico, maior capacidade antioxidante total, maiores níveis de GH circulante, maior precocidade/peso para puberdade (Kumar; Singh, 2020), redução dos níveis de cortisol plasmático (Kumar; Singh, 2019) e maior nível de leptina plasmática (Kumar; Singh; Bhan, 2019). Já em vacas holandesas lactantes, a suplementação de 0,50 mg/Kg de ASTX promoveu uma maior recuperação e melhor qualidade oocitária (Costa *et al.*, 2021). Embora haja estudos realizados com bovinos, existe uma escassez de trabalhos com a suplementação de astaxantina em touros reprodutores, demonstrando a importância da realização de novos estudos nesta área.

2. HIPÓTESE

A suplementação oral de ASTX reduz o estresse oxidativo em touros considerados problemáticos por apresentam padrões de qualidade espermática abaixo do preconizado para criopreservação de sêmen, melhorando a qualidade do sêmen e, conseqüentemente, o desempenho na produção de doses.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da suplementação oral de ASTX sobre a qualidade pré e pós-criopreservação, e estresse oxidativo do sêmen de reprodutores bovinos considerados problemáticos para criopreservação de sêmen.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Produção de sêmen em CCPS

Detendo o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 202,78 milhões de cabeças em 2022, o Brasil atingiu uma taxa de ocupação para 1,32 cabeças por hectare, demonstrando um maior número de animais em menor área,

aumentando a produtividade do rebanho nacional (ABIEC, 2023). Um importante fator associado à produtividade de um rebanho é sua eficiência reprodutiva. De acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2023), no decorrer dos últimos anos o país apresentou um aumento expressivo no uso da inseminação artificial (IA) em bovinos, evidenciando a necessidade da produção e comercialização de doses de sêmen criopreservado e, conseqüentemente, um incremento no número de touros em Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS).

Existe uma grande preocupação por parte das CCPS em oferecer manejo e ambientes adaptados ao bem-estar animal, bem como alimentação balanceada aos reprodutores, para que eles recebam todo aparato necessário para expressarem seu potencial reprodutivo e produzir ejaculados dentro dos limites preconizados para a criopreservação e produção de doses de sêmen (Bascuñan *et al.*, 2008; Crespilho, 2021). Apesar de tais cuidados, alguns indivíduos podem apresentar resistência à adaptação, o que leva o animal a produzir um sêmen de baixa qualidade e o impede de transmitir seu potencial melhorador através da produção de doses (Garcia-Oliveros *et al.*, 2020; Crespilho, 2021; Costa-e-Silva; Sampaio; Macedo, 2023).

Assim como na espécie equina, o indivíduo que apresenta características como ejaculados com baixa concentração espermática e alterações específicas de morfologia e motilidade (Morrell *et al.*, 2011), além de demonstrar resistência à adaptação, pode ser considerado um touro problema.

A dificuldade de adaptação e ocorrência de problemas individuais destes reprodutores pode induzir um estresse efetivo, e desencadear modificações metabólicas e endócrinas (Garcia-Oliveros *et al.*, 2020; Costa-e-Silva; Sampaio; Macedo, 2023), que podem resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), culminando em um quadro de estresse oxidativo, desenvolvimento de alterações subclínicas e supressão do desempenho animal, podendo estar relacionada à redução da qualidade espermática dos touros (Ponnampalam *et al.*, 2022).

Para ser considerado apto a produção de doses, o ejaculado precisa cumprir os seguintes requisitos: motilidade pré-criopreservação $\geq 60\%$; vigor pré-criopreservação ≥ 3 ; defeitos maiores $\leq 20\%$, defeitos menores $\leq 30\%$; defeitos totais $\leq 30\%$; motilidade total pós-criopreservação $\geq 40\%$; motilidade progressiva

pós-criopreservação $\geq 30\%$; vigor pós-criopreservação ≥ 3 . No entanto, alguns indivíduos produzem ejaculados com baixo padrão de qualidade do sêmen fresco, impedindo a criopreservação do sêmen comercialização de doses pela central (Arruda *et al.*, 2015).

4.2. Criopreservação de sêmen para bovinos

A utilização de biotécnicas como a criopreservação possibilita a maximização da produtividade do rebanho, distribuindo em ampla escala material genético superior de forma eficiente e econômica (Ugur *et al.*, 2019; Grötter *et al.*, 2019). Apesar das inúmeras vantagens, o uso desta técnica ainda é um desafio por desencadear cascatas biológicas, perda e reorganização dos componentes da membrana plasmática (Upadhyay *et al.*, 2021). Estes desafios reduzem a motilidade espermática, integridade estrutural das membranas e atividade mitocondrial, além de induzirem a fragmentação do DNA (Dias *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2020; Mejía-Flores *et al.*, 2022). Em animais com baixo padrão de qualidade do sêmen fresco, estes desafios são ainda maiores e podem reduzir ainda mais a qualidade e fertilidade do sêmen ao final do processo de descongelação.

As etapas de criopreservação do espermatozoide consistem na diluição do ejaculado, refrigeração, desidratação da célula, congelação, armazenamento e descongelação (Ugur *et al.*, 2019). Em condições normais, os espermatozoides possuem uma membrana plasmática composta por uma bicamada de fosfolípidios, responsável por sua fluidez celular. Quando submetidos a temperaturas reduzidas, os lípídeos presentes na membrana passam por uma reorganização de seus componentes, promovendo a transição de fase líquida para fase gel, conferindo maior rigidez à membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial (Purdy; Graham, 2004; Borges *et al.*, 2011).

Consequente ao estresse da congelação-descongelação, se dá uma alteração de equilíbrio entre a atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase, iniciando a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, caracterizando a etapa de reação acrossomal e a liberação de ERO (Vishwanath; Shannon, 2000; Benko *et al.*, 2022). Essa reorganização assemelha-se à ocorrida durante a capacitação espermática (Figura 1), promovendo alteração nos componentes das membranas, interferindo na sua fluidez e nas trocas realizadas com o meio, permitindo influxo e acúmulo de cálcio, o que leva à alcalinização do

citoplasma e ativação dos canais iônicos, produzindo ERO (O'Flaherty; Lamirante; Gagnon, 2006; Aguiar *et al.*, 2019). Tal processo, reduz a viabilidade espermática e sua capacidade de interação com o trato reprodutivo da fêmea (Medeiros *et al.*, 2002).

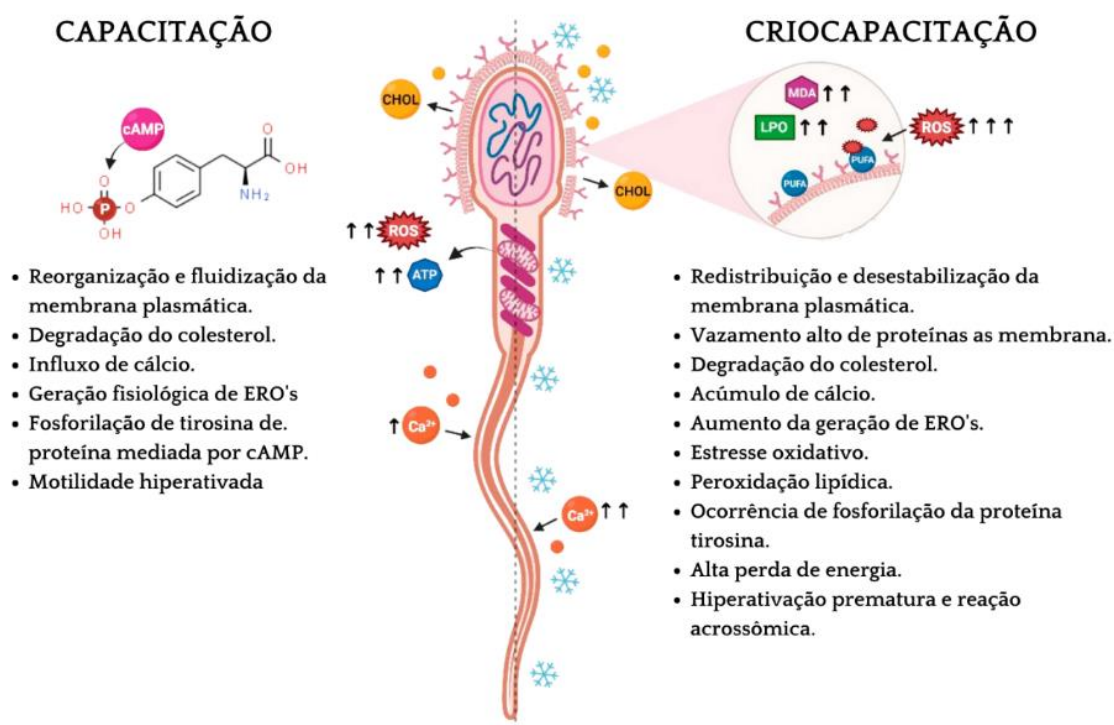


Figura 1 - Diferenças e semelhanças entre capacitação e criocapacitação de espermatozoides. Fonte: Adaptado de Benko *et al.*, 2022.

Apesar dos avanços nos estudos, a cinética da criocapacitação ainda não está totalmente esclarecida, havendo inúmeras semelhanças com a capacitação fisiológica (Benko *et al.*, 2022).

4.3. Metabolismo mitocondrial

As mitocôndrias são organelas essenciais para diversas atividades celulares, entre elas a produção de moléculas de ATP. Na célula espermática, durante a etapa de espermiogênese, grande parte do citoplasma celular é perdido e, com ele, suas organelas celulares. Entretanto, o espermatozoide dos mamíferos mantém em sua peça intermediária uma certa quantidade de mitocôndrias, responsável pelo seu metabolismo após o processo de maturação e capacitação, mantendo-o viável até sua chegada ao trato reprodutivo da fêmea (Hill *et al.*, 2012; Chianese; Pierantoni, 2021).

A presença das mitocôndrias na peça intermediária é fundamental para fornecimento de energia para motilidade espermática por meio da fosforilação oxidativa. Quando ocorrem defeitos na via mitocondrial é acionada a via metabólica glicolítica, podendo sustentar a motilidade. Essas vias podem ser acionadas de forma individual ou conjunta, variando de acordo com a disponibilidade de substrato presente no ambiente (Plessis *et al.*, 2015; Tourmente *et al.*, 2015; Barbagallo *et al.*, 2020).

Para que a produção de ATP ocorra de forma satisfatória é necessário que o potencial de ação da membrana mitocondrial esteja em pleno funcionamento (Luo; Schatten; Sun, 2013). A membrana mitocondrial atua no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia liberada no transporte de elétrons (Chen, 1988). Este processo de ativação da cadeia de transporte de elétrons é um dos responsáveis pela geração de ERO, que ocorre através de complexos proteicos (complexo I-V), que carregam elétrons de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para o oxigênio (O_2). A junção de prótons de carga positiva com o complexo proteico V gera o potencial mitocondrial, dando início à produção de ATP (Amaral *et al.*, 2013). Entretanto, em situação de estresse, se dá o vazamento de elétrons da cadeia de transporte mitocondrial, levando a uma redução parcial de O_2 em superóxido (O_2^- ; Cadenas; Davies, 2000; Benko *et al.*, 2022). Além disso, a presença de ácidos graxos poliinsaturados favorece a produção de aldeídos e metabólitos lipídicos. O desfecho desta complexa cascata é um ciclo auto repetitivo, gerando cada vez mais ERO e aldeídos lipídicos derivados da peroxidação das membranas (Benko *et al.*, 2022; Aitken *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013)

4.4. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres possuem uma função concentração-dependente no organismo, atuando de forma benéfica ou prejudicial de acordo com tal variação (Ahmadinejad *et al.*, 2017). De forma geral, a presença controlada dessas espécies atua como via de sinalização intracelular, regulação de tônus vascular, ativação da síntese de insulina e do fator induzível por hipóxia (HIF), além da proliferação, diferenciação e migração de células de defesa (Thannickal *et al.*, 2000; Bashan *et al.*, 2009).

No âmbito reprodutivo, a presença de níveis controlados de ERO é considerada essencial no plasma seminal para que ocorra a hiperativação espermática, capacitação, reação acrossomal e interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida. Entretanto, em níveis elevados as ERO são prejudiciais aos espermatozoides, reduzindo sua mobilidade e promovendo fragmentação do DNA, peroxidação lipídica das membranas espermáticas e falha no empacotamento da cromatina (Aitken; Krausz, 2001; Cocuzza *et al.*, 2007; Chandra *et al.*, 2015; Agarwal *et al.*, 2016; Oluwakemi; Olufeyisipe, 2016).

Define-se como estresse oxidativo o desequilíbrio entre a presença excessiva das ERO e a ausência ou insuficiência de fatores antioxidantes, impossibilitando sua redução e neutralização. Este desempenha um importante fator coadjuvante nos quadros de infertilidade masculina, devido a danos causados na função espermática e em membranas celulares pelas ERO (Alahmar, 2018), pois estes danos estão, na maioria das vezes, relacionados à redução da capacidade de fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário, além de aumentar as chances de perdas gestacionais e presença de mal formações congênitas (Henkel *et al.*, 2003; Ozmen *et al.*, 2007; Tarozzi *et al.*, 2007; Zini; Gabriel; Bazzoem, 2009; Lewis; Simon, 2010; Blumer *et al.*, 2011; Tremellen, 2018).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas pela atividade de enzimas celulares como mieloperoxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) e óxido nítrico sintase (NOS). A produção das espécies reativas de nitrogênio ocorre a partir da reação entre o O_2^- e óxido nítrico (NO), formando moléculas de peroxinitrito (ONOO⁻), que irão desempenhar um papel semelhante ao das ERO, promovendo danos aos lipídeos, proteínas e fita de DNA (Ahmadinejad *et al.*, 2017).

As ERO são consideradas altamente reativas e eletronicamente instáveis. Comportam-se como agentes oxidantes, atuando no organismo como receptores de elétrons, ou agentes redutores, que atuam como doadores (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005).

Dentre as ERO, destacam-se três principais: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\bullet$). O superóxido é um radical livre que se forma espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, através da adição de um elétron ao oxigênio molecular. É considerado um radical de pouca reatividade, incapaz de ultrapassar as membranas lipídicas, atuando apenas onde é produzido

(Agarwal; Gupta; Sharma, 2005). O peróxido de hidrogênio origina-se como produto do processo de dismutação do superóxido. Além disso, a presença de algumas enzimas oxidases podem gerá-lo de forma direta. Já a hidroxila é considerada o radical livre com maior potencial de lesão dentre as ERO. Sua molécula é produto da reação de Fenton, que leva o peróxido de hidrogênio a uma reação catalisada pelo Fe^{++} ou Cu^+ . Quando presente, a hidroxila desencadeia o processo de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação; Mello-Filho; Hoffmann; Meneghini, 1984; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005).

Independente da origem do estresse oxidativo, é fundamental a recuperação do equilíbrio entre os fatores oxidantes e antioxidantes, promovendo a homeostase redox ao organismo (Ahmadinejad *et al.*, 2017).

4.5. Antioxidantes

Considera-se um antioxidante qualquer substância capaz de retardar, reverter ou prevenir a oxidação de um substrato. Este processo ocorre por meio da conversão de ERO em moléculas de água (Andrade *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ser substâncias enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx; Andrade *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2011). O sistema glutathione é um dos responsáveis pela conversão de ERO, por meio da ação do selênio como cofator (Meister; Anderosn, 1983; Brigelius-Flohé, 1999). Já o sistema SOD utiliza como cofator a ação da relação cobre/zinco no citosol e do manganês nas mitocôndrias, catalisando os ânions de superóxido em O_2 e H_2O_2 (Bannister; Bannister; Rotilio, 1987; Zelko *et al.*, 2002).

Os antioxidantes não enzimáticos, de origem sintética ou nutricional, são um grupo de substâncias de baixo peso molecular que atuam de duas formas: removendo o agente oxidante antes que se conclua o processo de lesão ou reparando uma lesão já ocorrida. Dentre os antioxidantes não enzimáticos, pode-se citar o selênio, coenzima Q10, ácido úrico, ácido lipoico, zinco, taurinas, carotenoides, ascorbato, tocoferol, flavonoides, entre outros (Leite *et al.*, 2011).

4.6. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais compostos por dois grandes grupos: os carotenos, que possuem em sua estrutura apenas moléculas de carbono e hidrogênio e as xantofilas, que podem ter em sua estrutura a presença de oxigênio, em forma de grupos hidroxila, grupos carbonil, ou até mesmo em uma junção de ambos, como no caso da ASTX (Higuera-Ciapara; Félix-Valenzuela; Goycoolea, 2006).

Os carotenoides primários reduzem os níveis excessivos de energia durante a fotossíntese das clorofilas. Além disso, atuam como pigmentos complementares que ampliam o espectro de absorção de luminosidade das microalgas (Gong; Bassi, 2016). Já as xantofilas, carotenoides secundários, são responsáveis pela proteção das microalgas contra os fotodanos, criando uma camada de proteção sobre as células em situações de exposição excessiva à luz. Consequentemente, ao serem submetidas a condições de estresse, as microalgas produzem maiores quantidades de carotenoides secundários (Gong; Bassi, 2016; Rammuni *et al.*, 2018).

Além da capacidade de fotoproteção, as xantofilas, desempenham um papel antioxidante contra radicais livres, estabilização das funções metabólica e prevenção da degradação oxidativa dos lipídeos intracelulares (Bhosale; Bernstein, 2005). São elementos que possuem a capacidade de absorver luz em comprimentos de onda entre 400-550 nm, uma gama que não é convertida em metabolismo fotossintético (Gong; Bassi, 2016).

Para o organismo animal, os carotenoides são considerados compostos provitamina, por serem capazes de induzir a síntese metabólica de Vitamina A (Britton, 1996; Álvarez *et al.*, 2015; Nishida *et al.*, 2022). Dentre os compostos do grupo dos carotenoides, o betacaroteno possui maior atividade pro-vitamínica. A vitamina A é fundamental para atividades fisiológicas de diversos sistemas como a diferenciação celular, manutenção do sistema imunológico, sistema reprodutivo e oftálmico. No sistema reprodutivo masculino, a deficiência acentuada de vitamina A reduz a qualidade espermática quanto à motilidade e vigor, além de interferir na espermatogênese, causando alterações na morfologia espermática (Arruda *et al.*, 2010).

Diferentemente de outros carotenoides, a ASTX possui baixo potencial pro-vitamínico, desempenhando esta função apenas em condições de extrema

deficiência de Vitamina A nos organismos (Sangeetha; Baskaran, 2010). Por meio da ação enzimática, os carotenoides e seus derivados são metabolizados em apocarotenoides, retinoides, entre outras moléculas (Lobo *et al.*, 2012).

4.7. Astaxantina

Membro do grupo dos carotenoides, a ASTX é abundantemente encontrada em organismos marinhos, sendo principalmente produzida pela microalga *Haematococcus pluvialis* (Nishida *et al.*, 2022). Possui coloração vermelha e apresenta um relevante efeito antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo e anti-apoptótico (Dokumacioglu *et al.*, 2018; Heidari-Khoei *et al.*, 2019; Qamar *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Kohandel *et al.*, 2022).

Inicialmente, as algas *Haematococcus pluvialis* apresentam coloração verde e mobilidade. Conforme seu desenvolvimento e crescimento, o ambiente onde está inserida torna-se pobre em nutrientes, com redução da luminosidade entre as algas e aumento da pressão osmótica local. Todos esses fatores conferem uma característica desfavorável ao *Haematococcus pluvialis*, induzindo sua transição a um estado de repouso, permitindo o acúmulo de ASTX em células císticas (Focsan; Polyakov; Kispert, 2017). Quando submetidas a essas condições, a ASTX produzida se acumula majoritariamente no citoplasma celular como uma mistura racêmica de mono e di-ésteres e em uma pequena fração como ASTX livre. Neste processo, também são recuperadas pequenas quantidades de betacaroteno, luteína, cantaxantina e neoxantina (Gong; Bassi, 2016).

A ASTX é um derivado do betacaroteno, tendo uma divergência em sua estrutura devido à presença de anéis terminais de beta-ionona (Nishida *et al.*, 2022). Suas propriedades químicas são consideradas exclusivas pois a sua composição estrutural possui porções hidroxila (OH^o) e cetona (-CO) em cada um de seus anéis β -ionona, tornando sua estrutura suscetível à oxidação, o que lhe confere capacidade antioxidante (Hussein *et al.*, 2006; Kishimoto *et al.*, 2010; Santos-Sanchez *et al.*, 2020). Sua coloração vermelha origina-se de sua composição, com treze ligações duplas conjugadas (Figura 2; Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela; Goycoolea, 2006; Santos-Sanchez *et al.*, 2020).

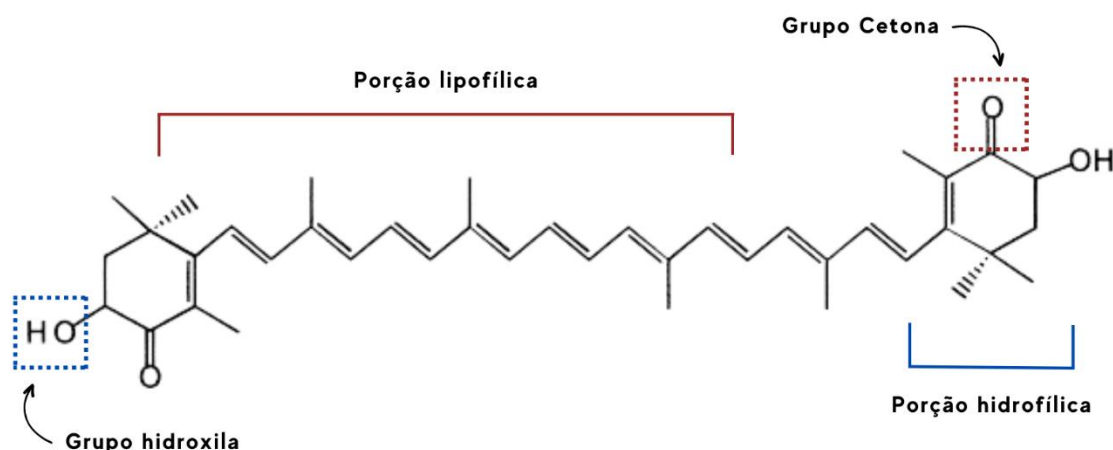


Figura 2 - Estrutura química da Astaxantina ($C_{40}H_{52}O_4$). Fonte: Adaptado de Higuera-Ciapara *et al.*, 2006.

Atua na estabilização de radicais centrados em carbono (Martin *et al.*, 1999), capturando radicais livres ao longo da cadeia de polieno e na porção terminal do anel. Enquanto a cadeia insaturada de polieno captura os radicais livres na membrana, os anéis terminais ficam responsáveis pela eliminação dos radicais através do interior da membrana fosfolipídica e em sua superfície (Figura 3; Miki, 1991).

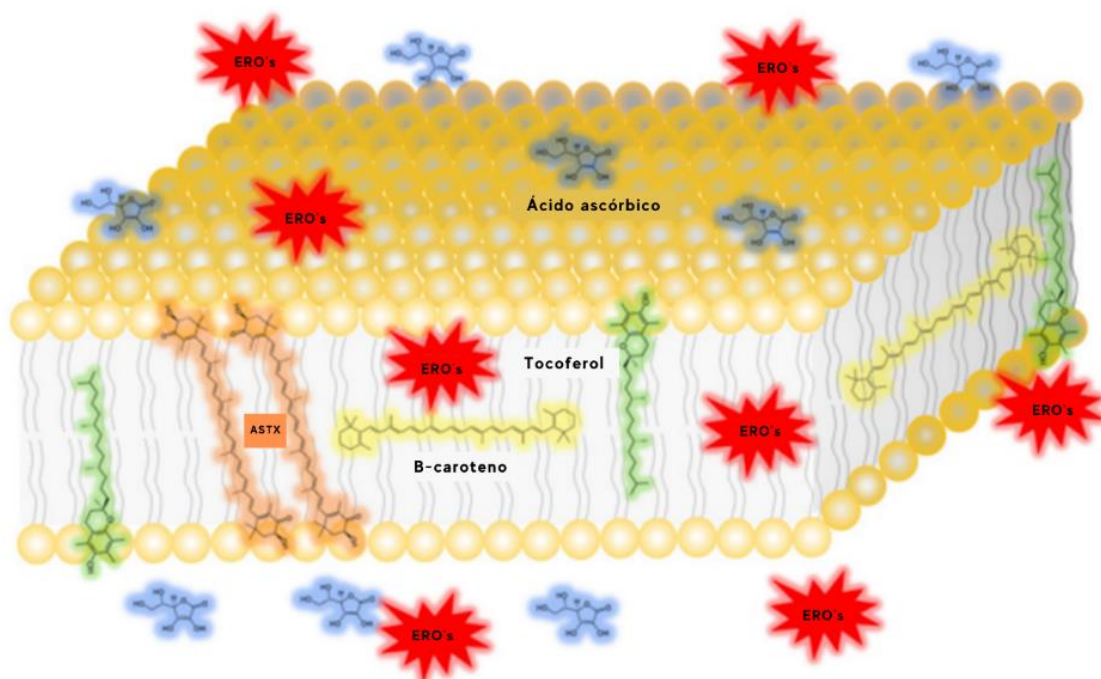


Figura 3 - Posição da astaxantina na membrana celular. Fonte: Adaptado de Nishida *et al.*, 2022.

Seu mecanismo antioxidante atua na degradação de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e outros radicais livres, além

de inibir a peroxidação lipídica das membranas celulares, evitando o acúmulo de peróxidos lipídicos (Miki, 1991; Iwamoto *et al.*, 2000; Ouchi *et al.*, 2010). Devido à sua característica lipofílica, no organismo animal, a ASTX pode ser encontrada associada a membranas celulares, proteínas e lipídeos (Nur-e-Borhan *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2006; Miyazawa *et al.*, 2011; Wayama *et al.*, 2013). Sua capacidade de proteção se estende à camada interna e superficial das membranas fosfolipídicas (Nishida *et al.*, 2022) além de possuir capacidade de empacotamento da membrana fosfolipídica e redução da mobilidade da cadeia alquil quando em fase fluida (Widomska; Zareba; Subczynski, 2016).

A ASTX natural, possui baixa estabilidade e baixa solubilidade em água, fatores esses que dificultam a sua manipulação e processamento. Tal fator tem estimulado as indústrias químicas mundiais a buscarem o desenvolvimento de sistemas artificiais de ASTX-proteína, aumentando sua biodisponibilidade (Nishida *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de moléculas sintéticas de ASTX pode trazer benefícios à manipulação e produção de suplementos alimentícios, prevenindo sua degradação e consequente perda de potencial antioxidante. Em decorrência dos processos necessários para extração de ASTX natural, o custo de produção torna-se oneroso, incentivando cada vez mais as indústrias químicas e farmacêuticas a migrarem para a produção sintética (Nair *et al.*, 2023; Yao *et al.*, 2023).

Um cenário inovador que surge nas indústrias químicas produtoras de ASTX é o uso de nanocarreadores à base de lipídeos como sistema de liberação controlada. Por meio do encapsulamento, torna-se possível aumentar a solubilidade, estabilidade da molécula, absorção celular, especificidade, tolerabilidade e índice terapêutico (Abdelazim *et al.*, 2023).

4.7.1. Uso da astaxantina na produção e reprodução animal

Estudos realizados em suínos (Guo *et al.*, 2021; Basioura *et al.*, 2020), ovinos (Abdi-Benemar *et al.*, 2020) e bovinos (Carrer, 2022) avaliaram a eficiência da suplementação da ASTX associada a diluentes contra os danos oriundos do processo de criopreservação.

Na suplementação oral, estudos foram realizados com machos murinos (Vahidinia; Rahbar; Mahmoodabadi, 2016; Khoei *et al.*, 2018; Ashrafizadeh; Ahmadi, 2019; Sobhani *et al.*, 2019; Hao, 2020; Ulucan *et al.*, 2021; Roudmajani *et*

al., 2022), e fêmeas murinas (Fan *et al.*, 2021); galos (Najafi *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2021), e galinhas poedeiras (He *et al.*, 2023); fêmeas bubalinas (Priyadarshini; Aggarwal, 2018; Somagond *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022) e em fêmeas bovinas (Kumar; Singh, 2019; Kumar; Singh; Bhan, 2019; Kumar; Singh, 2020; Costa *et al.*, 2021), apresentando resultados positivos e que corroboram para compreensão do potencial antioxidante da ASTX via suplementação oral nas espécies domésticas.

Vahidinia, Rahbar e Mahmoodabadi (2016), avaliaram o efeito da associação da suplementação de astaxantina (100 mg/kg) com vitamina E (100 mg/kg) e C (200 mg/kg) na qualidade espermática de ratos submetidos a estresse calórico. Durante 86 dias, 40 ratos foram divididos em 4 grupos: G1- dieta *ad libitum*; G2 – restrição calórica; G3- *ad libitum* + ASTX, vit C e vit E; G4 – restrição + ASTX, vit C e vit E. De acordo com o estudo, a motilidade espermática comparada pré e pós-período de suplementação apresentou-se maior no G2, 3 e 4 em relação ao G1. A capacidade antioxidante plasmática foi avaliada no início e final do período de estudo, por meio do método de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), demonstrando um aumento no grupo 3 ($p = 0,02$) e no grupo 4 ($p = 0,02$) em comparação aos grupos 1 e 2. Na avaliação de concentração espermática, aumento na contagem média de espermatozoides foi observado no grupo 4 ($p = 0,01$) em relação ao grupo 3.

Em um estudo realizado por Khoei *et al.* (2018), foi avaliado o efeito da ASTX contra os efeitos tóxicos causados pelo metotrexato (MTX), medicamento antagonista de ácido fólico utilizados em distúrbios autoimunes. Foram utilizados 30 ratos divididos em 5 grupos: G1 – controle óleo de azeite; G2 – 30 mg/kg MTX, e G 3, 4 e 5 com 25, 50 e 100 mg/kg de ASTX + 30 mg/kg de MTX, respectivamente. Os animais receberam a ASTX 6 dias antes da aplicação do MTX. A aplicação de uma única dose de MTX apresentou redução ($p < 0,05$) na contagem de espermática, motilidade e morfologia espermática quando comparado aos grupos pré-suplementados com ASTX. Para avaliação de estresse oxidativo, foi realizado a dosagem de MDA (malondialdeído), SOD e CAT, tendo os animais do G2 apresentado maior produção de MDA. Os animais previamente suplementados com ASTX demonstraram um aumento de SOD ($p < 0,05$). Em relação à CAT, os animais do G4 (50 mg/kg) e G5 (100 mg/kg) ATX) apresentaram maior atividade quando comparado ao grupo controle MTX (G2).

Em camundongos, foi avaliado o impacto da suplementação de ASTX sobre a qualidade espermática (Ashrafizadeh; Ahmadi, 2019). Os animais foram divididos em 6 grupos: G1 – controle solução salina, G2 – nicotina 1,5 mg/kg, G3 – ASTX 25 mg/kg, G4 – ASTX 50 mg/kg, G5 – nicotina 1,5 mg/kg + ASTX 25 mg/kg e G6 - nicotina 1,5 mg/kg + ASTX 50 mg/kg. Ashrafizadeh e Ahmadi (2019), observaram que a contagem espermática no G2 foi menor em relação ao G1. Além disso, observou-se que a concentração espermática máxima foi atingida pelo G4 em relação aos demais grupos. A motilidade espermática também foi reduzida no G2 em relação aos demais grupos.

Sobhani *et al.* (2019) realizaram análises histopatológicas dos testículos de camundongos expostos a nicotina e suplementados com astaxantina, utilizando como parâmetro de avaliação o sistema de classificação de Cosentino *et al.* (1985). Foi identificado que controle apresentou sinais de vacuolização, espessamento de capsula e descamação dos túbulos seminíferos, além de distribuição irregular de células de Sertoli, hemorragia e edema intersticial (grau médio: 3,66; faixa: 3,5-4). Comparado ao controle, o grupo suplementado com 25 mg/kg apresentou sinais moderados de hemorragia e lesões histológicas (grau médio: 2,78; faixa: 2,25-4). No grupo suplementado com 50 mg/kg, foram identificados hemorragia leve e danos histológicos (grau médio: 1,66; faixa: 1,5-2).

Em bubalinos, Priyadarshini e Aggarwal (2018), avaliaram 32 búfalas Murrah prenhes sob efeito da suplementação quanto aos níveis de leptina e IgG no plasma sanguíneo no pré e pós-parto, durante diferentes estações do ano. Os animais do grupo tratado foram suplementados com 0,25 mg/kg de peso corporal/animal/dia durante o período de 30 dias pré a 30 dias pós-parto. Segundo os autores, os níveis de leptina e IgG dos animais suplementados com ASTX foram maiores ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle durante ambas as estações, além disso, quando comparadas as estações, os níveis de leptina e IgG foram maiores ($P < 0,05$) no inverno em relação ao verão.

Kumar *et al.* (2022) avaliaram o efeito da suplementação de ASTX no crescimento, imunidade, potencial antioxidante de novilhas Murrah em crescimento. Foram avaliadas 28 novilhas, divididas em quatro grupos: G1 – controle sem suplementação; G2 - 0,20 mg/kg de peso corporal de ASTX; G3 - 10 mg/kg de matéria seca (MS) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); G4 - 0,20 mg/kg de peso corporal de ASTX + 10 mg/kg de MS ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ao longo de 90 dias de estudo. O grupo

suplementado com ASTX e MS apresentou maior consumo e peso corporal que os demais grupos. Além disso, foi identificado um aumento das atividades de SOD, CAT e antioxidante total dos grupos 2 e 4, assim como a redução do nível de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) dosado em sangue total hemolizado (coleta com EDTA), em relação ao grupo controle.

Kamada, Akagi e Watanabe (2017), suplementaram vacas leiteiras gestantes com ASTX (1,0 mg/kg – tipo SS) associada a ração mista, uma vez ao dia, por duas semanas. Ao final da suplementação, realizou-se a colheita de sangue em tubos heparinizados para realização de dosagem de ASTX no plasma sanguíneo por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Segundo os autores, a ASTX foi detectada em um tempo de retenção de aproximadamente 7,1 min no perfil HPLC, comprovando a capacidade de absorção da molécula de ASTX suplementada na dieta de bovinos.

Kumar e Singh (2020) avaliaram o impacto da suplementação de ASTX na dieta de novilhas Sahiwal e Karan Fries (Holstein × Tharparkar) durante o verão quanto à precocidade e ao estresse oxidativo. O estudo avaliou 12 novilhas de 10 a 12 meses divididas em grupo controle e tratamento (0,25 mg/kg peso vivo/dia/animal), sendo avaliado os sinais fisiológicos (frequência respiratória - FR, pulso – RP, e temperatura retal – TR) e os níveis de capacidade antioxidante total (TAC), estresse oxidativo (via TBARS), hormônio do crescimento (GH) através da análise de plasma sanguíneo. As fêmeas do grupo tratamento apresentaram menores parâmetros fisiológicos ($P \leq 0,01$) em relação ao grupo controle. Os níveis de TAC foram maiores ($P \leq 0,05$) no grupo tratamento em relação ao grupo controle. Já os níveis de TBARS apresentaram-se elevados no grupo controle em relação ao grupo tratado. Identificaram-se níveis ($P \leq 0,05$) mais altos de GH no grupo tratamento em relação ao grupo controle.

Kumar e Singh (2019), avaliaram o efeito da ASTX sob a inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa potenciador de cadeia leve de células B ativadas (NF- κ B) induzida por estresse térmico. 12 novilhas Karan Fries (Holstein × Tharparkar) foram divididas em grupo controle e tratamento (0,25 mg/kg peso vivo/dia/animal) e submetidas a colheitas de sangue para dosagem de cortisol plasmático e interleucina plasmática – 12 (IL-12), além do isolamento de RNA transcrito em cDNA para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, avaliando a expressão gênica de NF- κ B, IL-2, caspase-3 e Bcl-2.

Segundo os autores, os níveis de cortisol plasmático, IL-12, padrão de expressão de NF- κ B, IL-2 e caspase-3 foram ($P \leq 0,05$) menores no grupo de tratamento do que em relação ao grupo controle, enquanto o Bcl-2 foi maior ($P \leq 0,05$) no grupo suplementado com ASTX, indicando o potencial da molécula em reduzir os danos causados pelo estresse térmico no verão.

Kumar, Singh e Bhan (2019) ainda avaliaram o efeito da suplementação dietética da ASTX (0,25 mg/kg peso vivo/dia/animal) quanto a taxa de crescimento e alterações metabólicas por dosagem de leptina e grelina em 12 novilhas Karan Fries durante estresse térmico no verão. O ganho de peso corporal, consumo de ração e níveis de leptina plasmática foram ($P \leq 0,05$) maiores no grupo tratado em relação ao grupo controle, já a frequência respiratória e os níveis de grelina foram menores no grupo tratado quando comparado ao controle.

Em um estudo realizado no Paraná – Brasil, 45 vacas Holandesas em lactação foram suplementadas com ASTX (grupos: 0, 0,25 ou 0,50 mg/kg/dia – 75 dias) para avaliação do impacto do antioxidante na recuperação oocitária por aspiração folicular (OPU) e desenvolvimento embrionário *in vitro*. De acordo com os autores, identificou-se um número maior de oócitos recuperados na primeira OPU realizada, referente ao Grupo – 0,50 mg/kg dia de ASTX quando comparado aos demais grupos. Além disso, a qualidade oocitária do grupo tratado com 0,50 mg/kg apresentou-se mais homogênea, sendo melhor quando comparado ao grupo sem ASTX ($p= 0,0050$) e no grupo com 0,25 mg/kg/dia de ASTXA ($p= 0,0022$). O mesmo efeito positivo não foi observado no desenvolvimento embrionário *in vitro* entre os grupos (Costa *et al.*, 2021).

Até o momento, não houve estudos sobre a suplementação oral de ASTX em touros adultos com problemas de qualidade espermática, apesar de pesquisas semelhantes com bovinos. Este estudo visa avaliar seu potencial para melhorar a qualidade espermática em touros reprodutores.

5. REFERÊNCIAS

- ABDELAZIM, K.; GHIT, A.; ASSAL, D.; DORRA, N.; NOBY, N.; KHATTAB, S. N.; EL-FEKY, S. E.; HUSSEIN, A. Production and therapeutic use of astaxanthin in the nanotechnology era. **Pharmacological Reports**, v. 75, p. 771-790, 2023.
- ABDI-BENEMAR, H.; KHALILI, B.; ZAMIRI, M. J.; EZAZI, H.; SOTOUDEH ARDABILI, G.; MOGHADAM, S. H.; SIMANOOR, N. Effects of astaxanthin supplementation on the freezability, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and post-thawing fertility of ram sêmen. **Small Ruminant Research**, v. 192, p. 106213, 2020.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R, K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 28, 2005.
- AGARWAL, A.; ROYCHOUDHURY, S.; BJUGSTAD, K. B.; CHO, C. L. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? **Therapeutic Advances in Urology**, v.8, n.5, 302-318, 2016.
- AGUIAR, G. B.; CALDAS-BUSSIÉRE, M. C.; MACIEL JR, V. L.; CARVALHO, C. S. P.; SOUZA, C. L. M. Association of L-arginine with heparin on the sperm capacitation improves in vitro embryo production in bovine. **Animal Reproduction**, v. 16, n.4, p.938-944, 2019.
- AHMADINEJAD, F.; MOLLER, S. G.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; BIDKHORI, G.; JAMI, M. S. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. **Antioxidant**, v. 6, n.51, p.1-15, 2017.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, 497-506, 2001.
- AITKEN, R. J.; WHITING, S.; DE LULIIS, G. D.; McCLYMONT, S.; MITCHELL, L. A.; BAKER, M. A. Electrophilic Aldehydes Generated by Sperm Metabolism Activate Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Apoptosis by Targeting Succinate Dehydrogenase. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p.33048 –33060, 2012.
- ALAHMAR, A. T. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 52, n. 2, p. 57-66, 2018.
- ÁLVAREZ, R; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; ALCALDE, M. J. Carotenoid and Vitamin A Contents in Biological Fluids and Tissues of Animals as an Effect of the Diet: A Review. **Food Reviews International**, v. 31, p. 319–340, 2015.
- AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, p. 163–174, 2013.

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

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; ALONSO, M. A.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; GALLEGOS, A. M.; MARTINS, S. M. M. K.; GRANATO, T. M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 393-400, 2010.

ASHRAFIZADEH, M.; AHMADI, Z. Effect of Astaxanthin Treatment on the Sperm Quality of the Mice Treated with Nicotine. **Reviews in Clinical Medicine**, v. 6, n.1, p. 1-5, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). Capítulo 4, 2023. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-04/>>. Acesso em: 28/08/2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Index ASBIA Mercado, 1º trimestre de 2023. Disponível em: < https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_1Tri_2023.pdf>. Acesso em: 28/08/2023.

BANNISTER, J. V.; BANNISTER, W. H.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, v. 22, p. 111–180, 1987.

BARBAGALLO, F.; LA VIGNERA, S.; CANNARELLA, R.; AVERSA, A.; CALOGERO, A. E.; CONDORELLI, R. A. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n.363, 2020.

BASCUÑAN, D. S. R.; JORGE, A. M.; ROCHA, G. P.; WESCHLER, F. S.; ANDRIGHETTO, C. Comportamento sexual de touros zebuínos e Angus em central de coleta e processamento de sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.254-260, 2008.

BASHAN, N.; KOVSAN, J.; KACHKO, I.; OVADIA, H.; RUDICH, A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 27–71, 2009.

BASIOURA, A.; TSAKMAKIDIS, I. A.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LI, J.; MOLINA, M. F.; MOLINA, M. F.; THEODORIDIS, A.; BOSCHOS, C. M.; PARRILLA, I. Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 218, p. 106478, 2020.

BENKO, F.; DURACKA, M.; BANAS, S.; LUKACM N.; TVRDA, E. Biological Relevance of Free Radicals in the Process of Physiological Capacitation and Cryocapacitation. **Oxygen**, v. 2, p. 164-176, 2022.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial xanthophylls. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 445-455, 2005.

BLUMER, C. G.; RESTELLI, A. E.; GIUDICE, P. T. D.; SOLER, T. B.; FRAIETTA, R.; NICHI, M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU International**, v. 109, p. 259-265, 2011.

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

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 951–965, 1999.

BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. 2. ed. Torquay, Devon: SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V. cap. 7, p. 197-240, 1996.

CADENAS, E.; DAVIES, K. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n.3-4, p. 222-230, 2000.

CARRER, A. R. 2022. **Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina**. 60f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2022.

CHANDRA, K.; SALMAN, A. S.; MOHD, A.; SWWTY, R.; ALI, K. N. Protection Against FCA Induced Oxidative Stress Induced DNA Damage as a Model of Arthritis and In vitro Anti-arthritic Potential of Costus speciosus Rhizome Extract. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 2, p. 383-389, 2015.

CHEN, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.4, p.155-181, 1988.

CHIANESE, R.; PIERANTONI, R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. **Antioxidants**, v. 10, n. 92, p. 1-19, 2021.

COCUZZA, M.; SIKKA, S. C.; ATHAYDE, K. S.; AGARWAL, A. Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n. 5, p. 603-621, 2007.

COSENTINO, M. J.; NISHIDA, M.; RABINOWITZ, R.; COCKETT, A. T. K. Histological Changes Occurring in the Contralateral Testes of Prepubertal Rats

Subjected to Various Durations of Unilateral Spermatic Cord Torsion. **The Journal of Urology**, v. 133, n. 5, p. 906-911, 1985.

COSTA, R. A.; SANTOS, M. L. P.; CASTRO, I. C.; MATTIELLO, M.; SOUZA, J. A.; ALMEIDA, W. F.; BOETTCHER, D. L.; CUCHI, D.; PAIM, B. H. R.; VIEIRA, F. M. C.; PAULA-LOPES, F. F.; BARROS, F. R. O. Effect of astaxanthin supplementation on *in vitro* embryo development and immune response of dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.33, p.171-171, 2021.

COSTA-E-SILVA, E. V.; SAMPAIO, B. F. B.; MACEDO, G. G. Comportamento sócio-sexual e seus problemas no desempenho de touros **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.47, n.3, p.616-624, 2023.

CRESPILHO, A. M. Produção de sêmen em regime de central – muito além do espermiograma. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.45, n.4, p.566-573, 2021.

DIAS, E. A. R.; CAPANHOLI, S. P.; ROSSI, G. F.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA' JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ZORZETTO, M. F.; PAZ, C. C. P.; OLIVEIRA, L. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; MONTEIRO, F. M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine sêmen. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 102-111, 2018.

DOKUMACIOGLU, E.; ISKENDER, H.; YENICE, G.; KAPAKIN, K. A.T.; SEVIM, C.; HAYIRLI, A.; SARAL, S.; COMAKLI, S. Effects of astaxanthin on biochemical and histopathological parameters related to oxidative stress on testes of rats on high fructose regime. **Andrologia**, v. 50, n. 7, p. e-13042, 2018.

FAN, Q.; CHEN, Z.; WU, Y.; ZHU, J.; YU, Z. Study on the Enhancement of Immune Function of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Foods**, v. 10, p. 1847, 2021.

FOCSAN, A. L.; POLYAKOV, N. E.; KISPERT, L. D. Photo Protection of *Haematococcus pluvialis* Algae by Astaxanthin: Unique Properties of Astaxanthin Deduced by EPR, Optical and Electrochemical Studies. **Antioxidants**, v. 6, n. 80, 2017.

FREITAS, D. S.; LOPES, G. A. G.; NASCIMENTO, B. R.; PEREIRA, L. A. A. C.; BATISTA, R. I. T. P.; CAMPOS JÚNIOR, P. H. A. Ácido linoleico conjugado como potencial bioativo para modulação e criotolerância de gametas e embriões. **Ciência Animal Brasileira**. v. 21, p. e-63574, 2020.

GAO, S.; HENG, N.; LIU, F.; GUO, Y.; CHEN, Y.; WANG, L.; NI, H.; SHENG, X.; WANG, X.; XING, K.; XIAO, L.; QI, X. Natural astaxanthin enhanced antioxidante capacity and improved semen quality through the MAPK/Nrf2 pathway in aging layer breeder roosters. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, p.112, 2021.

GARCIA-OLIVEROS, L. N.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; GONZAGA, V. H. G.; NOGUEIRA, V. J. M.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; ALMEIDA, F. S.; ALVES, M. B. R.; PINTO, S. C. C.; NICHI, M.; LOSANO, J. D. A.; KAWAI, G. K. V.;

CELEGHININ, E. C. C. Efeitos do estresse térmico em espermatozoides bovinos: uma abordagem cronológica para os primeiros achados. **Revista Internacional de Biomaterologia**, v. 64, p.1367–1378, 2020.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1396-1412, 2016.

GRÖTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P. E.; KJELLAND, M. E.; FERRÉ, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 655–665, 2019.

GUO, H. T.; WANG, J. R.; SUN, L. Z.; JIN, X. H.; SHI, X. Y.; SHI, X. Y.; YUE, S. L.; YUE, S. L. Effects of astaxanthin on plasma membrane function and fertility of boar sperm during cryopreservation. **Theriogenology**, v. 164, p. 58-64, 2021.

HAO, Z. A astaxantina melhora a expressão de citocinas séricas e a qualidade do sêmen de camundongos com diabetes mellitus KKAY. **Interações químico-biológicas**, v. 332, p.1-23, 2020.

HE, W.; WANG, H.; TANG, C.; ZHAO, Q.; ZHANG, J. Dietary supplementation with astaxanthin alleviates ovarian aging in aged laying hens by enhancing antioxidant capacity and increasing reproductive hormones. **Poultry Science**, v. 102, n.1, p. 102258, 2023.

HEIDARI-KHOEI, H.; FAKHRI, S.; PARVARDEH, S.; SHAMS MOFARAHE, Z.; BANINAMEH, Z.; VARDIANI, M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 3, p. 248-254, 2019.

HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; HAJIMOHAMMAD, M.; STALF, T.; HOOGENDIJK, C.; MEHNERT, C.; MENKVELD, R.; SCHILL, W. B.; KRUGER, T. F. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 4, p. 477- 484., 2003.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185-196, 2006.

HILL, B. G.; BENAVIDES, G. A.; LANCASTER, J. R. JR.; BALLINGER, S.; DELL'ITALIA, L.; JIANHUA, Z.; DARLEY-USMAR, V. M. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 393, n. 12, p. 1485–1512, 2012.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 443-449, 2006.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; KURATA, H.; MATSUMOTO, A.; MIKI, W.; KAMIYAMA, M.; ITAKURA, H.; YAMAMOTO, S.; KONDO, K. Inhibition of Low-

Density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 7, n. 4, p. 216-222, 2000.

KAMADA, H.; AKAGI, S.; WATANABE, S. Astaxanthin increases progesterone.

KHOEI, H. H.; FAKHRI, S.; PARVARDEH, S.; MOFARAHE, Z. S.; BANINAMEH, Z.; VARDIANI, M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 3, p. 248-254, 2018.

KISHIMOTO, Y.; TANI, M.; UTO-KONDO, H.; IIZUKA, M.; SAITA, E.; SONE, H.; KURATA, H.; KONDO, K. Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. **European Journal of Nutrition**, v. 49, p. 119-126, 2010.

KOHANDEL, Z.; FARKHONDEH, T.; ASCHNER, M.; POURBAGHER-SHAHRI, A. M.; SAMARGHANDIAN, S. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 145, p. 112179, 2022.

KUMAR, R.; SAHU, D. S.; CHANDRA, G.; YADAV, S. P.; KUMAR, R.; ALI, N.; ROY, D.; MAURYA, P. S. Effect of Astaxanthin and Copper Supplementation on Growth, Immunity, Antioxidant, and Blood Biochemical Status of Growing Murrah Buffalo Heifers. **Biological Trace Element Research**, v. 200, p. 5052-5063, 2022.

KUMAR, S.; SINGH, S. V. Inhibition of NF- κ B signaling pathway by astaxanthin supplementation for prevention of heat stress-induced inflammatory changes and apoptosis in Karan Fries heifers. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p.1125-1134, 2019.

KUMAR, S.; SINGH, S. V.; BHAN, S. C. Effect of dietary supplementation of astaxanthin (potent antioxidant) on growth rate, DMI, FCR and metabolic changes in Karan Fries heifers during heat stress. **Journal of Agrometeorology**, v. 21, n. 1, p. 80-88, 2019.

KUMAR, S.; SINGH, S. V. Influence of astaxanthin supplementation on attainment of puberty and lipid peroxidation in Sahiwal and Karan Fries (Holstein $\times$ Tharparkar) heifers during summer season. **Biological Rhythm Research**, v. 51, n.1, p.15-28, 2020.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 279-286, 2011.

LEWIS, S. E. M.; SIMON, L. Clinical implications of sperm DNA damage. **Human Fertility**, v. 13, n. 4, p. 201-207, 2010.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WNAG, H.; YANG, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**, v.6, n.19, p. 1-19, 2013.

LOBO, G. P.; AMENGUAL, J.; PALCZEWSKI, G.; BABINO, D.; VON LINTIG, J. Mammalian carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, p. 78-87, 2012.

LUO, S. M.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Sperm mitochondria in reproduction: Good or bad and where do they go? **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, p. 549–556, 2013.

MARTIN, H. D.; JAGER, C.; RUCK, C.; SCHMIDT, M.; Anti- and Prooxidant Properties of Carotenoids. **Journal für praktische Chemie**, v. 341, n. 3, p. 302-308, 1999.

MATTHEWS, S. J.; ROSS, N. W.; LALL, S. P.; GILL, T. A. Astaxanthin binding protein in Atlantic salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 206-214, 2006.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm of cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p.327-344, 2002.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711–760, 1983.

MEJÍA-FLORES, I.; HERNÁNDEZ-IGNACIO, J.; CHIQUETE-FÉLIX, N.; CORNEJO-CORTES, M. A.; LAMMOGLIA-VILLAGÓMEZ, M. Á. Efecto de la adición de un antioxidante sobre la actividad mitocondrial y la motilidad del espermatozoide bovino criopreservado. **Revista Biológico Agropecuária Tuxpan**, v. 10, n. 2, p. 103-114, 2023.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1984.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KIMURA, F.; SATOH, A.; MIYAZAWA, T. Erythrocytes Carotenoids after Astaxanthin Supplementation in Middle-Aged and Senior Japanese Subjects. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 10, p. 495-499, 2011.

MORRELL, J. M.; MARI, G.; KÚTVÖLGYI, G.; MEURLING, S.; MISLEI, B.; IACOMO, E.; RODRIGUEZ-MARTINES, H. Pregnancies Following Artificial Insemination with Spermatozoa from Problem Stallion Ejaculates Processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 642-645, 2011.

NAIR, A.; AHIRWAR, A.; SINGH, S.; LODHI, R.; LODHI, A.; RAI, A.; JADHAV, D.A.; HARISH; VARJANI, S.; SINGH, G.; MARCHAND, J.; SCHOEFS, B.; VINAYAK, V. Astaxanthin as a King of Ketocarotenoids: Structure, Synthesis, Accumulation, Bioavailability and Antioxidant Properties. **Marine Drugs**, v. 21, n. 176, p. 1-23, 2023.

NAJAFI, D.; TAHERI, R. A.; NAJAFI, A.; SHAMSOLLAHI, M.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M. Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. **Poultry Science**, v. 99, p. 1678-1686, 2020.

NISHIDA, Y.; NAWAZ, A.; HECHT, K.; TOBE, K. Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. **Nutrients**, v.14, n. 107, p. 1-39, 2022.

NUR-E-BORHAN, S. A.; OKADA, S.; WATABE, S.; YAMAGUCHI, K. Carotenoproteins from the Exoskeleton and the Muscular Epithelium of the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. **Fisheries Science**, v. 61, n. 2, p. 337-343, 1995.

O'FLAHERTY, C.; LAMIRANTE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 528-540, 2006.

OLUWAKEMI, O.; OLUFEYISIPE, A. DNA fragmentation and oxidative stress compromise sperm motility and survival in late pregnancy exposure to omega-9 fatty acid in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, p. 511-520, 2016.

OUCHI, A.; AIZAWA, K.; IWASAKI, Y.; INAKUMA, T.; TERAOKA, J.; NAGAOKA, S. I.; MUKAI, K. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Carotenoids and Food Extracts in Solution. Development of a Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9967-9978, 2010.

OZMEN, B.; KOUTLAKI, N.; YOUSSEF, M.; DIEDRICH, K.; AL-HASANI, S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 3, p. 384-395, 2007.

PLESSIS, S.S.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; VAN DER LINDE, M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? **Asian Journal Andrology**, v. 17, p. 230–235, 2015.

PONNAMPALAM, E.N.; KIANI, A.; SANTHIRAVEL, S.; HOLMAN, B.W.B.; LAURIDSEN, C.; DUNSHEA, F.R. The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality—Invited Review. **Animals**, v.12, p. 3279, 2022.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Criobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004.

PRIYADARSHINI, L.; AGGARWAL, A. Effect of Astaxanthin Supplementation on Blood Plasma Leptin and IgG Profiles in Pre and Postpartum Murrah (*Bubalus bubalis*) Buffaloes during Different Seasons. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1303-1311, 2018.

production in cultured bovine luteal cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n. 79, p. 1103-1109, 2017.

QAMAR, A. Y.; FANG, X.; BANG, S.; SHIN, S. T.; CHO, J. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog sêmen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 9, p. 1163-1171, 2020.

RAMMUNI, M. N., ARIYADASA, T. U., NIMARSHANA, P. H. V., ATTALAGE, R. A. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*, **Food Chemistry**, v. 277, p. 128-134, 2019.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; SILVA, A. M. S.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v.120, p.681-699, 2018.

ROUDMAJANI, E. G.; GOUDARZVAND, M.; ROODBARI, N. H.; PARIVAR, K. Astaxanthin ameliorates the impairment consequence of prenatal bacterial lipopolysaccharide exposure in adult male offspring NMRI mice. **Physiology & Behavior**, v. 257, p. 113993, 2022.

SANGEETHA, R. K.; BASKARAN, V. Retinol-deficient rats can convert a pharmacological dose of astaxanthin to retinol: Antioxidant potential of astaxanthin, lutein, and β -carotene. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 977–985, 2010.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; TORRES-ARIÑO, A.; SALAS-CORONADO, R. Astaxanthin and its Formulations as Potent Oxidative Stress Inhibitors. **Pharmacognosy Reviews**, v. 14, n. 27, p. 8-15, 2020.

SOBHANI, B.; ROOMIANI, S.; AHMADI, Z.; ASHRAFIZADEH, M. Histopathological Analysis of Testis: Effects of Astaxanthin Treatment against Nicotine Toxicity. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 41-44, 2013.

SOMAGOND, Y. M.; SINGH, S. V.; DESHPANDE, A.; SHEORAN, P.; CHAHAL, V. P. Effect Of Dietary Supplementation Of Astxanthin, Prill Fat And Their Combination On Antioxidants And Immunity Status Of Lactating Buffaloes During Heat Stress. **Buffalo Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 451-463, 2021.

TAROZZI, N.; BIZARRO, D.; FLAMIGNI, C.; BORINI, A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 746-757, 2007.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 1005–1028, 2000.

TOURMENTE, M.; VILLAR-MOYA, P.; RIAL, E.; ROLDAN, E. R. S. Differences in ATP Generation via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 290, p. 20613–20626, 2015.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 3, p. 243–258, 2008.

UGUR, M. R.; ABDELRAHMAN, A. S.; EVANS, H. C.; GILMORE, A. A.; HITIT, M.; ARIFIANTINI, R. I.; PURWANTARA, B.; KAYA, A.; MEMILI, E. Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 268, 2019.

ULUCAN, A.; YUKSEL, H.; SAHIN, E.; YAKUT, S.; BOZKURT, M. F. Protective Effects of Astaxanthin Against Formaldehyde Induced Apoptosis of Testicular Tissue in Rats. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 419-423, 2021.

UPADHYAY, V. R.; RAMESH, V.; DEWRY, R. K.; KUMAR, G.; RAVAL, K.; PATOLIYA. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. **Andrologia**, v. 53, p. 1-16, 2021.

VAHIDINIA, A.; RAHBAR, A. R.; MAHMOODABADI, M. M. S. Effect of Astaxanthin, Vitamin E, and Vitamin C in Combination with Calorie Restriction on Sperm Quality and Quantity in Male Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, p. 252-263, 2016

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

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; NANGO, N.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

WIDOMSKA, J.; ZAREBA, M.; SUBCZYNSKI, W. K. Can Xanthophyll-Membrane Interactions Explain Their Selective Presence in the Retina and Brain? **Foods**, v. 5, n. 7, p. 1-19, 2016.

YAO, Q.; JIAQI, M.; CHEN, X.; ZHAO, G.; ZANF, J. A natural strategy for astaxanthin stabilization and color regulation: Interaction with proteins. **Food Chemistry**, v. 402, p. 134343, 2023.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 337–349, 2002.

ZINI, A.; GABRIEL, M. A.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p. 427-432, 2009.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ASTAXANTINA SOBRE A QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE “TOUROS-PROBLEMA”

Effect of Astaxanthin Supplementation on the Quality and Freezability of Semen from 'Problem Bulls'

ANDRETA, J. M. B.; HERÉDIAS-RIBAS, C. M.; BORGES, M. S.; PANOSSO, A. R.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; PAULA, R. R.; PAPA, F. O.; CRESPILO, A. M.; GIMENES, L. U.

RESUMO

Características individuais de desempenho e adaptação podem conferir a touros reprodutores problemas de produção de sêmen dentro dos parâmetros preconizados para criopreservação e produção de doses em Centrais de Coleta e processamento de Sêmen (CCPS). Esta dificuldade individual de adaptação pode desencadear um quadro de estresse, promovendo alterações clínico-metabólicas que contribuem para um quadro de estresse oxidativo e consequente redução da qualidade espermática. O uso de carotenoides como fornecimento de potencial antioxidante é uma importante ferramenta no controle do estresse oxidativo. Dentre este grupo, a astaxantina (ASTX) se destaca por possuir elevado potencial antioxidante no combate às espécies reativas de oxigênio (ERO). Estudos em diversas espécies avaliaram o impacto da suplementação oral de ASTX. Entretanto, não foram encontrados trabalhos com o seu uso na dieta para touros reprodutores com problemas de qualidade espermática. O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da suplementação oral de ASTX sobre a qualidade pré e pós-criopreservação, e estresse oxidativo do sêmen de reprodutores bovinos considerados problemáticos para criopreservação de sêmen (touros “problema”). Para o estudo, foram selecionados 14 touros da raça Nelore mantidos em regime de coleta em uma CCPS. Com base no banco de dados da central, foram avaliados os ejaculados produzidos entre os meses de jan-ago (n=417), período esse dividido em pré-suplementação (PRE=170), suplementação (SUP=111), pós-suplementação imediata (PSI=51) e pós-suplementação tardia (PST=85). Os ejaculados foram classificados em ejaculados colhidos (EC=417), ejaculados submetidos à criopreservação (ESC=109), ejaculados liberados (ELIB=92) e doses produzidas (DP=23.602). Para suplementação, os animais foram divididos em grupo controle negativo (CONT, n = 7) e grupo tratado (ASTX, n = 7), os quais foram submetidos à suplementação oral com 0,5 mg/kg de ASTX por 60 dias. Para análises de cinética espermática, integridade de membranas e estresse oxidativo foram realizadas 7 colheitas de sêmen (C0-C6) e criopreservação durante o período de SUP e PSI. Foi observada interação grupo*período para as variáveis de motilidade total ($p<0,01$), vigor ($p<0,01$), defeitos maiores testiculares ($p=0,05$), defeitos menores ($p=0,05$) e defeitos totais ($p=0,01$) pré-criopreservação. Para as análises de cinética espermática pós-criopreservação, integridade de membranas e estresse oxidativo não foi observada diferença conforme o tratamento ou interação grupo*período. Com base em tais resultados, foi possível concluir que a

suplementação oral de astaxantina teve efeitos benéficos para qualidade espermática pré-criopreservação de touros reprodutores com problemas de criopreservação de sêmen. No entanto, os benefícios da astaxantina oral não foram observados sobre qualidade e cinética espermática pós-criopreservação, integridade de membranas e estresse oxidativo, sendo necessários mais estudos sobre seus efeitos e períodos de suplementação para touros “problema” em regime de coleta em CCPS.

Palavras-chave: Antioxidante, Bovino, Carotenoide, ERO, Sêmen.

ABSTRACT

Individual performance and adaptation characteristics can cause breeding bulls to have problems producing semen within the parameters recommended for cryopreservation and production of doses in Semen Collection and Processing Centers (CCPS). This individual difficulty in adapting can lead to stress, promoting clinical-metabolic changes that contribute to oxidative stress and a consequent reduction in sperm quality. The use of carotenoids to provide antioxidant potential is an important tool for controlling oxidative stress. Among this group, astaxanthin (ASTX) stands out for its high antioxidant potential in combating reactive oxygen species (ROS). Studies on various species have evaluated the impact of oral ASTX supplementation. However, no studies were found on its use in the diet of breeding bulls with sperm quality problems. The aim of this study was to evaluate the influence of oral ASTX supplementation on the pre- and post-cryopreservation quality and oxidative stress of semen from bovine sires considered to be problematic for semen cryopreservation ("problem" bulls). For the study, 14 Nelore bulls kept in collection at a CCPS were selected. Based on the center's database, the ejaculates produced between January and August (n=417) were evaluated. This period was divided into pre-supplementation (PRE=170), supplementation (SUP=111), immediate post-supplementation (PSI=51) and delayed post-supplementation (PST=85). The ejaculates were classified as ejaculates collected (EC=417), ejaculates submitted to cryopreservation (ESC=109), ejaculates released (ELIB=92) and doses produced (DP=23,602). For supplementation, the animals were divided into a negative control group (CONT, n = 7) and a treated group (ASTX, n = 7), which were orally supplemented with 0.5 mg/kg of ASTX for 60 days. For analysis of sperm kinetics, membrane integrity and oxidative stress, 7 semen samples were collected (C0-C6) and cryopreserved during the SUP and PSI periods. A group*period interaction was observed for the variables of total motility ($p < 0.01$), vigor ($p < 0.01$), major testicular defects ($p = 0.05$), minor defects ($p = 0.05$) and total defects ($p = 0.01$) pre-cryopreservation. For the analyses of post-cryopreservation sperm kinetics, membrane integrity and oxidative stress, no difference was observed according to treatment or group*period interaction. Based on these results, it was possible to conclude that oral astaxanthin supplementation had beneficial effects on the pre-cryopreservation sperm quality of breeding bulls with semen cryopreservation problems. However, the benefits of oral astaxanthin were not observed on post-cryopreservation sperm quality and kinetics, membrane integrity and oxidative stress, and further studies are needed on its effects and supplementation periods for "problem" bulls in the CCPS collection regime.

Keywords: Antioxidant, Bovine, Carotenoid, ROS, Semen.

1. INTRODUÇÃO

O expressivo aumento no uso de biotecnologias da reprodução, torna evidente a necessidade de produção e comercialização de doses de sêmen criopreservado. Consequente a isso, se dá o incremento no número de touros em Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen no país (CCPS; ASBIA, 2023).

Nas CCPS, existem cuidados criteriosos para fornecimento de bem-estar, alimentação balanceada e manejo técnico específico para animais de alto valor genético e comercial. Apesar de tais cuidados, alguns indivíduos podem apresentar resistência à adaptação, o que leva o animal a produzir sêmen de baixa qualidade e o impede de transmitir seu potencial melhorador através da produção de doses (Garcia-Oliveros et al.,2020; Crespilho, 2021; Costa-e-Silva et al.,2023). Assim como na espécie equina, o indivíduo que apresenta características como ejaculados com baixa concentração espermática e alterações específicas de morfologia e motilidade (Morrell et al., 2011), além de demonstrar resistência à adaptação, pode ser considerado um touro “problema”.

A dificuldade de adaptação e ocorrência de problemas individuais destes reprodutores pode induzir estresse efetivo e desencadear modificações metabólicas e endócrinas (Garcia-Oliveros et al.,2020; Costa-e-Silva et al.,2023), que podem resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), culminando em um quadro de estresse oxidativo, desenvolvimento de alterações subclínicas e supressão do desempenho animal, podendo estar relacionada à redução da qualidade espermática dos touros. Uma das formas de correção do desequilíbrio redox se dá por meio do fornecimento de antioxidantes dietéticos (Ponnampalam et al.,2022).

Dentre os carotenoides, grande grupo de antioxidantes dietéticos, a astaxantina (ASTX) é considerada uma das mais eficazes na remoção de ERO (Ribeiro et al.,2018). Encontrada em organismos marinhos, sendo principalmente produzida pela microalga *Haematococcus pluvialis* (Nishida et al.,2022), seu mecanismo antioxidante atua na degradação de ERO e outros radicais livres, além de inibir a peroxidação lipídica das membranas celulares, evitando o acúmulo de peróxidos lipídicos (Miki, 1991; Iwamoto et al.,2000; Ouchi et al.,2010). Diversos estudos com a suplementação oral de astaxantina buscaram melhor compreender

os impactos do seu mecanismo de ação contra o estresse oxidativo nas diversas espécies animais.

Para a espécie bovina, estudos realizados com suplementação oral de ASTX em novilhas Sahiwal e Karan Fries (Holstein × Tharparkar) identificaram menor alteração de parâmetros fisiológicos em situação de estresse térmico, maior capacidade antioxidante total, maiores níveis de GH circulante, maior precocidade/peso para puberdade (Kumar; Singh, 2020), redução dos níveis de cortisol plasmático (Kumar; Singh, 2019) e maior nível de leptina plasmática (Kumar; Singh; Bhan, 2019). Já em vacas holandesas lactantes, a suplementação de 0,50 mg/Kg de ASTX promoveu uma maior recuperação e melhor qualidade oocitária (Costa et al., 2021). Embora haja estudos realizados com bovinos, existe uma escassez de trabalhos com a suplementação de astaxantina em touros reprodutores, demonstrando a importância da realização de novos estudos nesta área.

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da suplementação oral de ASTX sobre a qualidade pré e pós-criopreservação, e estresse oxidativo do sêmen de reprodutores bovinos considerados problemáticos para criopreservação de sêmen.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais deste estudo foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal (protocolo nº 2937/21), para avaliação e certificação de sua conformidade com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), em 28 de outubro de 2021.

2.1. Local, animais e grupos experimentais

Todos os animais utilizados no experimento estavam alojados na Central Bela Vista (Botucatu-SP - 22°59'58"S 48°25'44"W, 892 m), em regime de coleta de sêmen. Para o estudo, foram utilizados 14 touros da raça Nelore, com idade média de 39,71±5,37 meses e peso médio de 797,79±30,84 kg. Conforme protocolo, todos os touros foram submetidos ao exame andrológico e a testes para brucelose e

tuberculose, previamente ao ingresso na central e mantidos em quarentena conforme preconizado. Após liberação da quarentena, cada touro foi realocado para a área de produção.

Como padrões mínimos de qualidade de sêmen para criopreservação foram considerados: concentração espermática: ≥ 200 milhões/mL; motilidade pré-criopreservação $\geq 60\%$; vigor pré-criopreservação ≥ 3 ; defeitos maiores $\leq 20\%$, defeitos menores $\leq 30\%$; defeitos totais $\leq 30\%$; motilidade total pós-criopreservação $\geq 40\%$; motilidade progressiva pós-criopreservação $\geq 30\%$; vigor pós-criopreservação ≥ 3 . O não cumprimento destes padrões caracteriza o animal como inapto à produção (Arruda et al., 2015).

O desempenho produtivo de cada indivíduo foi observado entre os meses de janeiro a agosto de 2022 por meio das informações concedidas pelo banco de dados da Central Bela Vista, totalizando a análise de $n=417$ ejaculados, em $n=53$ colheitas. Os períodos de análise foram divididos em: pré-suplementação (PRE – $n=170$; jan a mar), suplementação (SUP – $n=111$; abr-mai), pós-suplementação imediata (PSI – $n=51$; jun), e pós-suplementação tardia (PST – $n=85$; jul-ago).

Após, todos os ejaculados foram avaliados em quatro categorias: 1) ejaculados colhidos (EC, $n=417$); 2) ejaculados submetidos à criopreservação (ESC, $n=109$); 3) ejaculados liberados (ELIB, $n=92$) e 4) doses produzidas (DP, $n=23.602$).

Durante todos os períodos, os animais foram mantidos em piquetes individuais, com acesso à silagem composta por milho grão, 82,24%; milho moído, 7,97%; feno, 3,94%; farelo de soja, 1,75%; e núcleo mineral-vitamínico, 4,11% (Allgen® - Allbiom Feed, Cajuru/SP) com fornecimento diário de 22 kg, fracionado em dois tratos ao dia, com exceção dos dias de colheita, quando os animais eram conduzidos ao setor de colheita no período da manhã e tinham acesso à alimentação total diária no final do dia, quando retornavam ao piquete. A ingestão hídrica dos animais era mantida *ad libitum*.

A seleção dos animais foi baseada no histórico de produtividade de cada indivíduo, reunindo touros com baixos padrões de qualidade do sêmen fresco, impedindo a criopreservação do sêmen e comercialização de doses pela central. Os animais selecionados foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle (placebo sem suplementação de ASTX: CONT - $n=7$; $776,14 \pm 52,53$ kg; $40,4 \pm 8,4$ meses) e tratados (com suplementação de ASTX: ASTX - $n=7$; $819,43 \pm 38,36$

kg; $39,00 \pm 7,34$ meses). A distribuição dos animais para cada grupo foi realizada com base nos resultados de motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais no momento pré-criopreservação do primeiro dia do período SUP – Colheita 0 (C0).

O grupo ASTX recebeu a suplementação 0,5 mg de ASTX/kg-PV/dia em pó, conforme estudo de Costa *et al.* (2021) (mín 3%, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) associada a 50 g de sal mineral bovino (Fosbovi® Pronto, Tortuga Cia. Zootécnica Agrária, São Paulo, Brasil). A associação do sal mineral bovino + ASTX foi realizada pela farmácia de manipulação veterinária DrogaVet® (São José do Rio Preto, Brasil). O grupo CONT recebeu placebo com 50 g do mesmo sal mineral utilizado para a associação da ASTX fornecida ao grupo ASTX. O fornecimento de ambos os grupos ocorreu uma vez ao dia, por 60 dias, acompanhando a dieta ofertada pela manhã.

2.2. Colheita, avaliação física e morfológica do sêmen

Cada reprodutor foi submetido a colheitas de sêmen empregando vagina artificial própria para a espécie. Para todas as análises, foi considerado o primeiro salto de cada dia de colheita. Embora o sêmen tenha sido colhido e analisado antes da congelação dos períodos PRE ao PST, a permissão contratual na Central para a criopreservação ocorreu somente nos períodos SUP e PSI, em intervalos quinzenais. A primeira colheita do período SUP foi considerada como C0, seguida das colheitas C1, C2, C3 e C4. As colheitas C5 e C6, foram realizadas no período PSI (Figura 4). Por se tratar de touros mantidos em CCPS, dois animais do grupo

CONT foram retirados da central pelos proprietários antes do término de colheitas do período PSI.

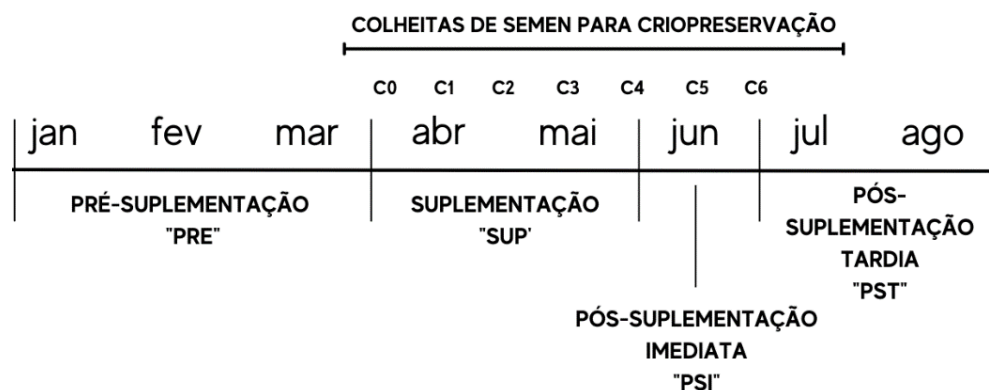


Figura 4 -Períodos de realização do experimento.

Previamente a cada colheita, o prepúcio e o pênis foram higienizados com solução de CB-30 TA, em diluição 1:3.000 (mL; Ourofino Saúde Animal® - Cravinhos, Brasil). O sêmen foi colhido em tubos cônicos graduados de 15 mL, pré-aquecidos a 37°C. Após a colheita, os tubos foram imediatamente encaminhados ao laboratório através de um sistema de condução de capsulas a vácuo, possibilitando a recepção do ejaculado, higienização externa do tubo e diluição inicial. A diluição inicial foi realizada com meio crioprotetor (OptiXcell®, IMV Brasil), na proporção de 1:1, seguida da mensuração da concentração espermática (Fotômetro Accuread Bovino®, IMV Brasil).

Em seguida, a motilidade total (%) e vigor (1-5) espermáticos foram avaliados subjetivamente sob microscopia óptica. Para avaliação morfológica foram extraídas alíquotas de cada ejaculado, depositadas em microtubos graduados de 1,5 ml previamente preenchidos com solução de formol salino 4%, seguido da realização da técnica de câmara úmida em microscópio de contraste de interferência diferencial - DIC (BX53RF®, Olympus, Tóquio, Japão). Os defeitos espermáticos foram caracterizados como maiores, menores e totais. Após a contagem dos defeitos, eles foram divididos em 4 grupos de acordo com o grau de defeito (maior e menor), e sua origem de formação (testicular e epididimário), conforme descrito por Arruda *et al.* (2015).

2.3. Criopreservação do sêmen

Para criopreservação, foi acrescentado ao sêmen previamente diluído, extensor OptiXcell® (IMV Brasil) em quantidade suficiente para concentração ajustada a 50×10^6 por dose, seguido do envase em palhetas francesas de 0,25 mL (IMV Technologies, Brasil), previamente identificadas segundo o tratamento, colheita e dados do animal. Após diluição, as palhetas foram submetidas à curva de refrigeração, com redução de $-0,25^\circ\text{C}$ por minuto até estabilização a 4°C em overnight. Após, as palhetas foram criopreservadas em congelador automático (Digitcool®, IMV Technologies, Brasil). As palhetas congeladas foram armazenadas em raques de metal previamente identificadas e transferidas para o botijão criogênico.

2.4. Avaliações pós-criopreservação

2.4.1. Cinética espermática

Para a avaliação da cinética espermática foi utilizado o sistema de análise computadorizada do movimento espermático (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA; IVOS - II, Hamilton Thorne Research, Beverly, EUA). Após descongelamento das palhetas a 36°C por 30 segundos em descongelador de sêmen (WTA® - Cravinhos, Brasil), foi depositada uma alíquota de $2,5 \mu\text{L}$ de sêmen descongelado e diluído na proporção de 2:1 (conteúdo da palheta em $420 \mu\text{L}$ de OptiXcell® em lâmina Leja® previamente aquecida a 36°C). Cinco campos microscópicos selecionados aleatoriamente foram analisados em cada amostra. Foram consideradas as seguintes variáveis: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

2.4.2. Integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e estresse oxidativo

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson®, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm (FITC, YOPRO e C11-BODYPY) e 695/40nm (Iodeto de propídio e MitoSOX Red); vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20 nm (MitoStatus Red); e

o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50 nm (Hoechst). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

Para tanto, as amostras foram diluídas em TALP-PVA, conforme protocolo de Parrish et al.,(1988) modificado: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5×10^6 espermatozoide/mL, suplementado com Hoescht 33342 (7µM; 145333, Sigma) para a eliminação dos detritos.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossômica, foi utilizada a associação de iodeto de propídio (IP) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína; Freitas-Dell'aqua et al.,2012). Assim, em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído foi adicionado 1,5 µM de IP e 2 ng de FITC-PSA. As amostras foram incubadas durante 15 min a 37 °C, ao abrigo da luz.

Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de superóxido (O₂•-) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de YOPRO (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), *MitoStatus Red* (MST; potencial mitocondrial) e *MitoSOX™ Red* (MSR; geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial Freitas-Dell'aqua et al.,2018). Assim, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram adicionados 25 nM YP, 20 µM de MST e 2 µM de MSR, seguido por incubação a 37°C por 20 min.

Para análise de peroxidação lipídica, foi seguido o protocolo de Guasti et al. (2012), utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, em 500 µL de sêmen diluído em TALP-PVA foram adicionados 5 µM de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 min, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 µl de TALP-PVA.

Todas as avaliações foram realizadas no tempo 0 e 240 min – Teste de termorresistência lento (TTR lento) pós-descongelação com as amostras mantidas a 37°C.

2.5. Análise estatística

As variáveis de cinética espermática pré e pós congelação, morfologia espermática e ejaculados produzidos foram submetidos à análise de variância considerando medidas repetidas no tempo. Foi utilizado o procedimento MIXED (SAS, 9.4) para a análise de variância, ajustando o modelo com os efeitos de tratamento (controle, tratamento) e período de coleta (PRE; SUP; PSI E PST) e a interação de ambos. Para as variáveis de estresse oxidativo e integridade de membrana plasmática espermática foi considerado também o efeito de tempo de análise, sendo o teste de termorresistência lento (TTR), com realização da análise do momento pós-incubação. A variância residual foi modelada considerando a estrutura de (co)variância CS (Compound Symmetry). As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ("LSMEANS") e comparadas, quando necessário, por meio da probabilidade da diferença ("PDIFF"). A significância foi declarada quando $P < 0,05$. Os resultados foram descritos pelas médias não transformadas $\pm$ os erros padrões das médias (EPM).

3. RESULTADOS

3.1. Análises pré-criopreservação

Não houve efeito principal de tratamento para as variáveis analisadas. O Valor-p, média e EPM para as variáveis de qualidade espermática e defeitos morfológicos espermáticos pré criopreservação, conforme a interação entre os animais do grupo CONT e ASTX durante os períodos de avaliação, encontram-se apresentados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de qualidade espermática pré-criopreservação e classificação morfológica espermática, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.

	PRE		SUP		PSI		PST		G*P
	CONT	ASTX	CONT	ASTX	CONT	ASTX	CONT	ASTX	Valor -p
MOT (%)	42,64 ^{bc±} 4,47	40,38 ^{c±} 4,38	44,97 ^{bc±} 4,60	44,56 ^{bc±} 2,59	44,65 ^{bc±} 5,18	55,26 ^{a±} 2,90	46,03 ^{abc±} 5,14	59,86 ^{a±} 4,68	<0,01
VIG (1-5)	2,68 ^{b±} 0,17	2,57 ^{b±} 0,17	2,65 ^{b±} 0,18	2,59 ^{b±} 0,18	2,52 ^{b±} 0,21	2,90 ^{a±} 0,21	2,55 ^{b±} 0,20	3,23 ^{a±} 0,18	<0,01
D. > (%)	26,21 ^{a±} 2,55	28,76 ^{a±} 2,48	27,41 ^{a±} 2,65	28,47 ^{a±} 2,64	25,53 ^{a±} 3,08	26,16 ^{a±} 3,11	21,71 ^{ab±} 3,04	16,76 ^{b±} 2,71	0,13
D. < (%)	5,86 ^{c±} 1,00	7,28 ^{bc±} 0,95	9,17 ^{ab±} 1,07	9,07 ^{ab±} 1,06	9,00 ^{ab±} 1,35	7,73 ^{abc±} 1,37	11,02 ^{a±} 1,32	7,85 ^{abc±} 1,10	0,05
D. Totais (%)	31,89 ^{a±} 2,54	36,00 ^{a±} 2,46	36,57 ^{a±} 2,69	37,55 ^{a±} 2,67	34,61 ^{a±} 3,27	33,91 ^{a±} 3,30	32,90 ^{ab±} 3,21	24,75 ^{b±} 2,77	0,01
D. > TEST (%)	10,76 ^{abc±} 1,99	14,31 ^{ab±} 1,96	13,62 ^{abc±} 2,05	16,25 ^{ab±} 2,04	11,77 ^{abc±} 2,29	16,92 ^{a±} 2,31	10,25 ^{bc±} 2,27	8,74 ^{c±} 2,08	0,05
D. > EPID (%)	15,57 ^{a±} 2,61	14,51 ^{a±} 2,57	13,79 ^{a±} 2,67	12,38 ^{a±} 2,66	13,70 ^{a±} 2,93	9,20 ^{a±} 2,95	11,44 ^{a±} 2,91	7,89 ^{a±} 2,70	0,52
D. < TEST (%)	3,41 ^{ab±} 1,10	4,45 ^{ab±} 1,07	5,35 ^{a±} 1,15	6,10 ^{a±} 1,14	4,48 ^{ab±} 1,34	3,07 ^{b±} 1,36	5,02 ^{ab±} 1,33	3,56 ^{ab±} 1,17	0,19
D. < EPID (%)	2,31 ^{b±} 1,76	2,86 ^{b±} 1,76	3,82 ^{b±} 1,91	3,05 ^{b±} 1,86	4,54 ^{ab±} 2,07	4,61 ^{ab±} 2,02	6,02 ^{a±} 1,97	4,19 ^{ab±} 1,96	0,19

PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio; PRD: período; CONT: grupo controle; ASTX: grupo astaxantina; MOT = motilidade; VIG = vigor; D. > = defeitos maiores; D. < = defeitos menores; D. totais = defeitos totais; D. > TEST = defeitos maiores testiculares; D > EPID = defeitos maiores epididimários; D < TEST = defeitos menores testiculares; D < EPID = defeitos menores epididimários; G*P: interação grupo e período; Letras minúsculas referem-se à interação grupo x período; Valor-p = ≤0,05.

Com base nos dados, foi possível identificar que houve interação grupo*período para as variáveis de motilidade total ($p=0,003$; Figura 5) e vigor ($p=0,001$; Figura 6). A partir destes resultados, os indivíduos do grupo ASTX apresentaram aumento de motilidade no PSI e PST em relação aos demais períodos e ao grupo controle no PRE, SUP e PSI. Para o vigor, o grupo ASTX apresentou aumento no período PSI e PST em relação aos demais períodos e ao grupo controle.

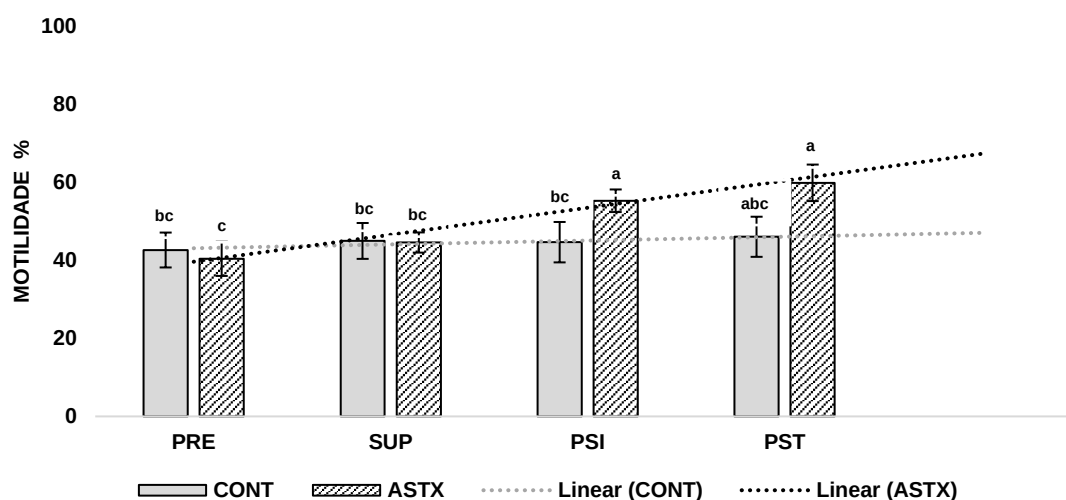


Figura 5 – Motilidade (%) pré criopreservação entre os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.

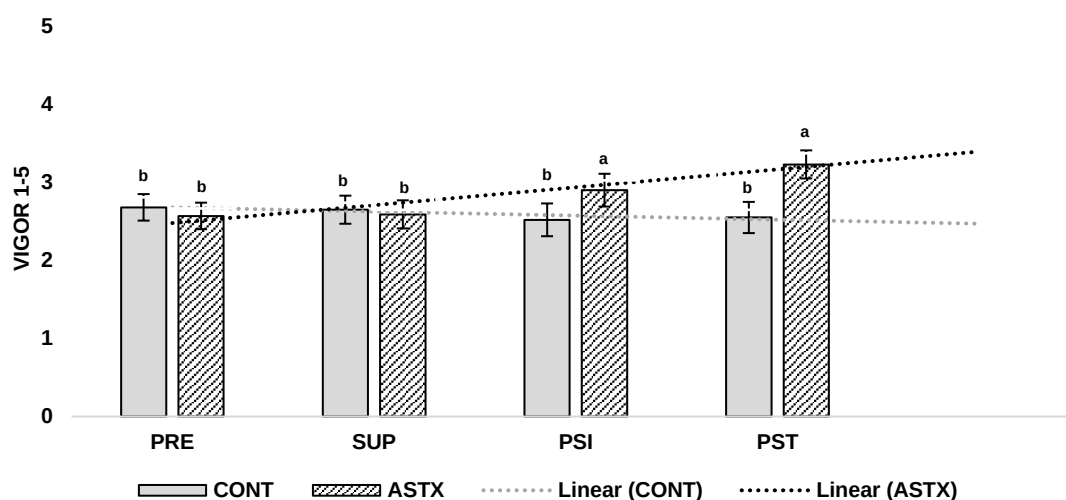


Figura 6 - Vigor (1-5) pré criopreservação entre os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.

Quanto à morfologia espermática (Tabela 1), houve diferença para os defeitos menores ($p=0,05$) e defeitos totais ($p=0,01$). Para os defeitos menores (Figura 7), ambos os grupos (controle e tratado) apresentaram menor percentual no período PRE, comparado ao SUP, bem como com relação ao grupo controle no PSI e PST. O grupo ASTX no PSI e PST não diferiu dos demais. Para os defeitos totais (Figura 8), houve menor percentual para o grupo ASTX PST comparado aos demais grupos e períodos, exceto controle PST que foi similar a todos os demais.

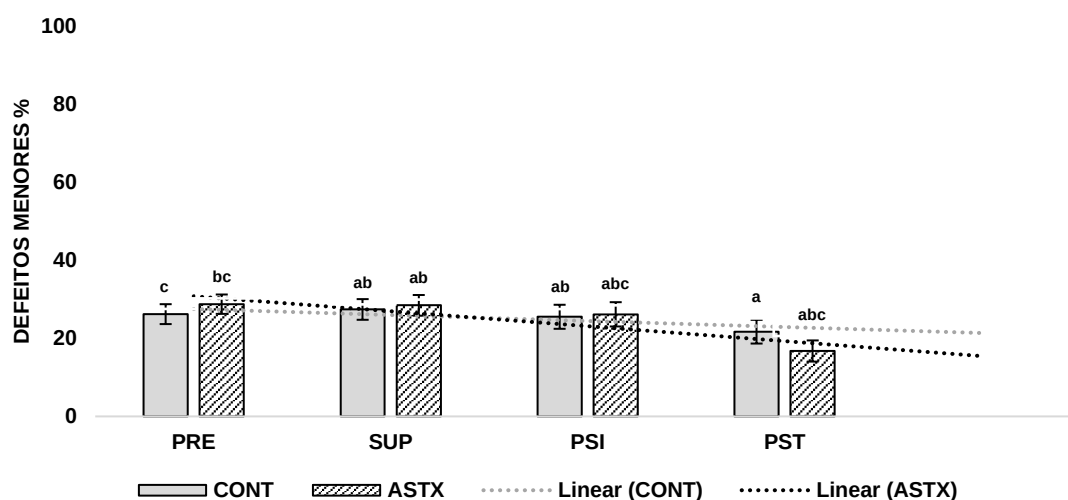


Figura 7 - Defeitos espermáticos menores (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.

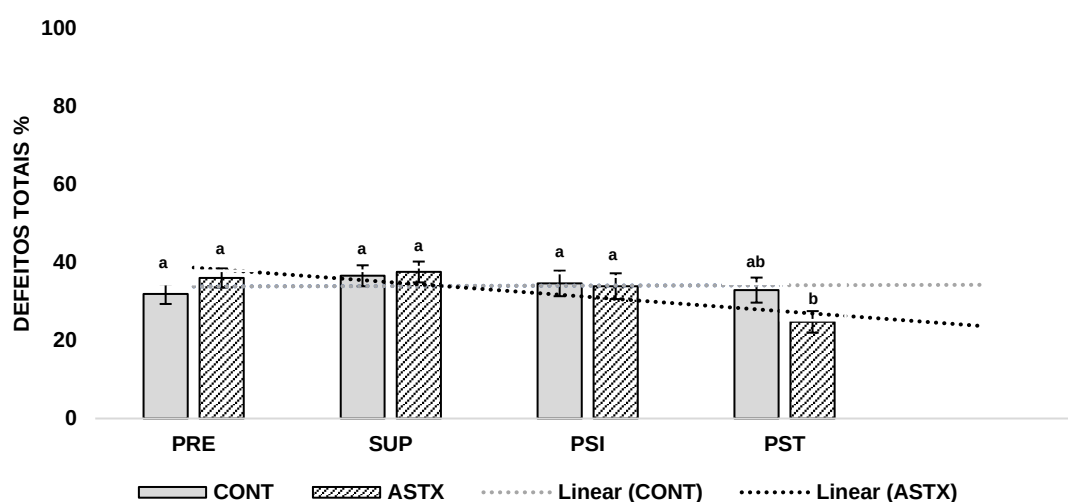


Figura 8 - Defeitos espermáticos totais (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.

Ao observarmos os defeitos maiores (Tabela 1), inicialmente não foi identificada diferença ($p=0,13$). Entretanto, quando analisados com base na classificação morfológica a partir da origem de formação dos defeitos maiores, é possível observar uma diferença para defeitos com origem testicular ($p=0,05$; Figura 9). Para os defeitos maiores testiculares, houve menor percentual para o grupo ASTX PST em relação aos demais períodos para o mesmo grupo.

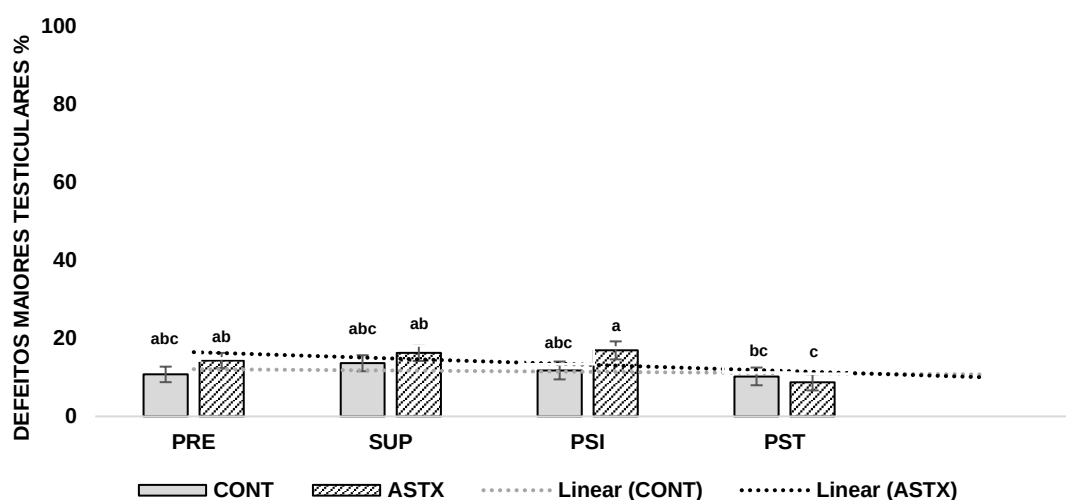


Figura 9 - Defeitos maiores testiculares (%) pré criopreservação entres os touros do grupo CONT e ASTX, conforme o período de avaliação.

Para o efeito de período, o valor-p, média e EPM das análises pré-criopreservação estão apresentados na Tabela 2. Das variáveis que não apresentaram interação, a porcentagem de defeitos maiores ($p < 0,01$) foi menor no PST em relação aos demais períodos. Para os defeitos maiores epididimários ($p < 0,01$), PST apresentou menor percentual em relação ao PRE e SUP. Já para os defeitos menores testiculares ($p = 0,02$) foi observado menor percentual no período PRE em relação a SUP, enquanto para os defeitos menores epididimários ($p < 0,01$), PRE teve menor porcentagem em relação a PSI e PST.

Tabela 2 - Valor-p, média e EPM das análises pré-criopreservação, conforme efeito principal de período

	Períodos				Valor -p P
	PRE	SUP	PSI	PST	
MOT (%)	41,51 ^c ±3,13	44,77 ^{bc} ±3,25	49,96 ^{ab} ±3,68	52,94 ^a ±3,47	<0,01
VIG (1-5)	2,62 ^b ±0,12	2,62 ^b ±0,13	2,71 ^{ab} ±0,15	2,89 ^a ±0,14	0,08
D. > (%)	27,49 ^a ±1,78	27,94 ^a ±1,87	25,84 ^a ±2,19	19,24 ^b ±2,04	<0,01
D. < (%)	6,57 ^b ±0,69	9,12 ^a ±0,75	8,36 ^{ab} ±0,96	9,44 ^a ±0,86	<0,01
D. Totais (%)	33,95 ^a ±1,77	37,06 ^a ±1,89	34,26 ^a ±2,33	28,83 ^b ±2,12	<0,01
D. > TEST (%)	12,53 ^b ±1,39	14,94 ^a ±1,44	14,34 ^{ab} ±1,63	9,50 ^c ±1,54	<0,01
D. > EPID (%)	15,04 ^a ±1,83	13,09 ^{ab} ±1,88	11,45 ^{bc} ±2,08	9,66 ^c ±1,99	<0,01
D. < TEST (%)	3,93 ^b ±0,77	5,73 ^a ±0,81	3,78 ^b ±0,95	4,29 ^{ab} ±0,89	0,02
D. < EPID (%)	2,59 ^c ±1,69	3,43 ^{bc} ±1,83	4,56 ^{ab} ±1,93	5,11 ^a ±1,87	<0,01

PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio; P: período; MOT = motilidade; VIG = vigor; D. > = defeitos maiores; D. < = defeitos menores; D. totais = defeitos totais; D. > TEST = defeitos maiores testiculares; D > EPID = defeitos maiores epididimários; D < TEST = defeitos menores testiculares; D < EPID = defeitos menores epididimários; P: efeito período; Letras minúsculas referem-se à diferença entre os períodos; Valor-p = ≤0,05.

3.2. Análises pós-criopreservação

Não houve efeito principal de tratamento ou interação entre os grupos durante os períodos avaliação para as variáveis de cinética espermática (Tabela 3), assim como para as variáveis de integridade de membrana e estresse oxidativo pós-criopreservação (Tabela 4).

Tabela 3 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de cinética espermática pós-criopreservação, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.

	SUP		PSI		G*P
	CONT	ASTX	CONT	ASTX	Valor -p
MT (%)	56,55±131,35	55,27±129,56	56,31±133,87	64,08±132,00	0,12
MPT (%)	34,03±102,85	33,91±99,65	34,28±106,00	41,12±102,71	0,14
VIG	2,34±0,18	2,37±0,18	2,86±0,24	3,19±0,24	0,38
VAP (µm/S)	89,47±4,30	92,27±4,31	93,39±5,21	95,84±5,21	0,96
LIN (%)	36,66±1,75	39,71±1,75	38,69±1,97	39,09±1,97	0,18
STR (%)	71,69±1,47	74,40±1,47	74,03±1,73	73,63±1,73	0,12
ALH (%)	9,41±0,58	9,07±0,58	9,38±0,64	9,52±0,64	0,44

SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; CONT: grupo controle; ASTX: grupo astaxantina; MT: motilidade total; MPT: motilidade progressiva total; VIG: vigor; VAP: Velocidade trajeto média; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; ALH: amplitude lateral de cabeça; G*P: interação grupo e período.

Tabela 4 - Valor-p para as variáveis de integridade de membrana e estresse oxidativo pós-criopreservação conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.

	SUP				PSI				G*P*H
	CONT – 0	ASTX – 0	CONT – TTR	ASTX – TTR	CONT – 0	ASTX – 0	CONT – TTR	ASTX – TTR	Valor -p
PEROX (UA)	523,16± 51,88	539,22± 51,88	568,70± 51,88	590,49± 51,88	716,02± 75,38	676,27± 75,38	753,79± 75,37	746,65± 75,38	0,87
MPAI (%)	45,45± 4,54	49,01± 4,54	36,81± 4,54	40,18± 4,54	50,35± 5,62	63,17± 5,63	47,32± 5,62	56,62± 5,63	0,77
CONCSO	2345,45± 638,70	1924,96± 638,73	5695,14± 638,70	4726,62± 638,73	802,16± 852,83	673,42± 853,00	2662,93± 852,83	3329,80± 853,00	0,43
PM %	49,90± 5,39	53,02± 5,39	40,52± 5,39	40,79± 5,39	56,41± 6,38	48,22± 6,38	65,10± 6,38	53,63± 6,38	0,97
QPM	30039,0± 2076,26	28742,0± 2076,14	23725,0± 2076,26	24377,0± 2076,14	35388,0± 3404,87	36696,0± 3404,18	33949,0± 3404,87	24861,0± 3404,18	0,13
QPMAPM	30886,0± 2072,15	28707,0± 2072,09	24393,0± 2072,15	25165,0± 2072,09	37739,0± 3305,16	37044,0± 3304,78	34510,0± 3305,16	25326,0± 3304,78	0,14
CELISO %	51,04± 5,06	47,75± 5,06	60,96± 5,06	60,07± 5,06	36,81± 6,14	33,64± 6,14	51,74± 6,14	60,07± 5,06	0,65

G*H*P = interação entre grupo, hora e período; UA: Unidade Arbitrária; Valor-p = $\leq 0,05$.

PEROX: peroxidação lipídica; MPAI: Membrana plasmática e acrossomal íntegra; CONCSO = concentração de ânion superóxido nas células com alta geração de ânion superóxido; PM = % de células com alto Potencial mitocondrial; QPM = Qualidade do potencial mitocondrial das células estáveis; QPMAPM = Qualidade do potencial mitocondrial das células com alto potencial mitocondrial; CELISO = % Células com alta concentração de SO.

Quanto ao efeito principal de período, verificou-se que o vigor pós-criopreservação ($p < 0,01$) foi maior no período PSI em relação a SUP, assim como a peroxidação lipídica ($p < 0,01$), e integridade de membranas plasmática e acrossomal ($p < 0,01$). A concentração de SO nas células com alta geração de SO ($p < 0,01$), foi menor em PSI, assim como a porcentagem de células com alta concentração de SO ($p < 0,01$). A porcentagem de células com alto potencial mitocondrial ($p < 0,01$), bem como a qualidade do potencial mitocondrial das células estáveis ($p < 0,01$) e a qualidade do potencial mitocondrial das células com alto potencial mitocondrial ($p < 0,01$), foram maiores no período PSI em relação a SUP (Tabela 5).

Tabela 5 - Valor-p, média e EPM das análises de cinética espermática, integridade de membranas e estresse oxidativo, conforme efeito de período

	Períodos		
	SUP	PSI	P
Vigor (1-5) pós-criop.	2,36 ^b ±0,13	3,03 ^a ±0,17	<0,01
PEROX (UA)	555,39 ^b ±29,37	723,18 ^a ±40,17	<0,01
MPAI (%)	42,86 ^b ±2,92	54,47 ^a ±3,36	<0,01
CONCSO	3673,04 ^a ±390,34	1867,08 ^b ±482,40	<0,01
PM %	46,06 ^b ±3,55	55,84 ^a ±3,94	<0,01
QPM	26721,00 ^b ±986,04	32724,00 ^a ±1671,04	<0,01
QPMAPM	27288,00 ^b ±1035,12	33655,00 ^a ±1652,77	<0,01
CELISO %	54,95 ^a ±3,29	42,10 ^b ±3,73	<0,01

VIG: vigor; UA: Unidade Arbitrária; PEROX: peroxidação lipídica; MPAI: Membrana plasmática e acrossomal íntegra; CONCSO = concentração de ânion superóxido nas células com alta geração de ânion superóxido; PM = % de células com alto Potencial mitocondrial; QPM = Qualidade do potencial mitocondrial das células estáveis; QPMAPM = Qualidade do potencial mitocondrial das células com alto potencial mitocondrial; CELISO = % Células com alta concentração de SO. Letras minúsculas referem-se à diferença entre os períodos; Valor-p = ≤0,05.

3.3. Produção de ejaculados e doses de sêmen

Para as variáveis de produção de ejaculados e doses de sêmen (Tabela 6), não foi encontrado efeito de tratamento ou interação dos grupos CONT e ASTX ao longo dos períodos observados. Entretanto, ao considerarmos a porcentagem de ejaculados submetidos à criopreservação, em relação ao total de ejaculados colhidos, podemos observar um aumento numérico (69%) do grupo ASTX PST em relação aos demais períodos, e ao grupo controle (Figura 10).

Tabela 6 - Valor-p, média e EPM para as variáveis de produção de ejaculados e doses de sêmen, conforme a interação entre o tratamento e o período de avaliação.

	PRE		SUP		PSI		PST		G*P
	CONT	ASTX	CONT	ASTX	CONT	ASTX	CONT	ASTX	Valor -p
EC	11,00±	13,29±	7,86±	8,00±	3,71±	3,57±	7,75±	9,00±	0,79
	1,31	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,75	1,43	
	1,71±	1,71±	1,86±	1,14±	0,86±	1,57±	2,62±	6,24±	0,19
ESC	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,30	1,06	
	1,43±	1,43±	1,86±	0,71±	0,71±	1,29±	1,86±	5,58±	0,08
	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,17	0,96	
DP	305,86±	359,86±	600,29±	204,43±	173,14±	293,71±	571,37±	1333,33±	0,12
	226,32	226,32	226,32	226,32	226,32	226,32	299,34	244,44	

PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio; CONT: grupo controle; ASTX: grupo astaxantina; EC: ejaculados colhidos; ESC: ejaculados submetidos a criopreservação; ELIB: ejaculados liberados; DP: doses produzidas para comercialização; G*P: interação grupo e período; Letras minúsculas referem-se à interação grupo x período; Valor-p = ≤0,05.

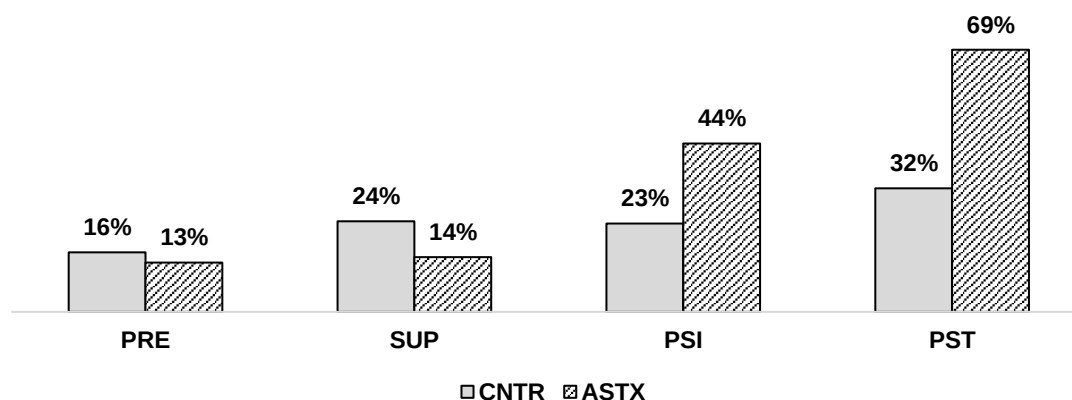


Figura 10 - Percentual de ejaculados submetidos a criopreservação em relação ao total de ejaculados colhidos, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).

No período PST, foi observado que o grupo ASTX apresentou 19% a mais de liberação de doses após a criopreservação (Figura 11). Para o valor absoluto de doses produzidas (Figura 12), é possível identificar que o grupo controle atingiu apenas 28% do total de doses produzidas pelo grupo ASTX no período PST.

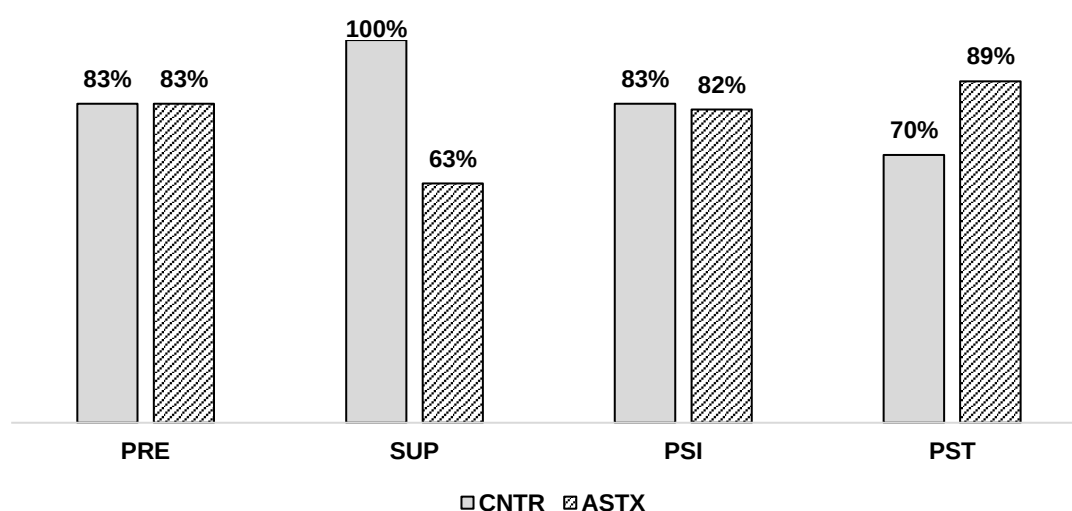


Figura 11 - Percentual de ejaculados liberados para comercialização de doses em relação aos ejaculados submetidos a criopreservação, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).

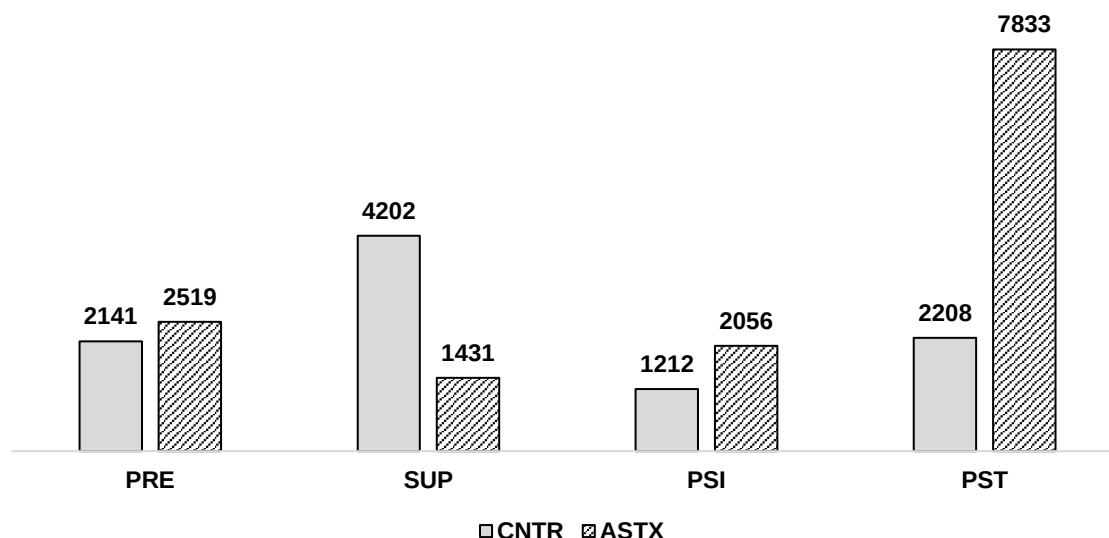


Figura 12 - Número absoluto de doses comerciais produzidas por grupo, ao longo dos períodos de avaliação, conforme o tratamento (CNTR: controle e ASTX: astaxantina) e o período de avaliação (PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio).

Para o efeito principal de período foi observado que para as análises de EC ($p < 0,01$), o período PRE diferiu dos demais, com maior média de ejaculados. Em contrapartida, as análises de ESC ($p = 0,02$), ELIB ($p = 0,03$) e DP ($p = 0,03$) foram maiores para o período PST em relação aos demais períodos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valor-p, média e EPM das análises de ejaculados e doses produzidas, conforme efeito principal de período

	Períodos				P
	PRE	SUP	PSI	PST	
EC	12,14 ^a ± 0,93	7,99 ^b ± 0,93	3,64 ^b ± 0,93	8,38 ^c ± 1,13	<0,01
ESC	1,71 ^b ± 0,70	1,50 ^b ± 0,70	1,21 ^b ± 0,70	4,43 ^a ± 0,84	0,02
ELIB	1,43 ^b ± 0,63	1,29 ^b ± 0,63	1,00 ^b ± 0,63	3,72 ^a ± 0,76	0,03
DP	332,86 ^b ± 160,03	402,36 ^b ± 160,03	233,43 ^b ± 160,03	952,25 ^a ± 193,23	0,03

PRE: período pré-suplementação; SUP: período suplementação; PSI: período pós-suplementação imediato; PST: período pós-suplementação tardio; P: período; EC: ejaculados colhidos; ESC: ejaculados submetidos a criopreservação; ELIB: ejaculados liberados; DP: doses produzidas para comercialização; Letras minúsculas referem-se à diferença entre os períodos; Valor-p = $\leq 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram, de forma inédita, que a suplementação oral de ASTX promoveu melhora da motilidade e vigor

espermáticos pré-criopreservação dos indivíduos tratados no período pós-suplementação, o que consequentemente gerou impacto positivo na produção de doses para os touros mantidos em regime de coleta em CCPS.

Em murinos submetidos a estresse calórico (Vahidinia; Rahbar e Mahmoodabadi, 2016), a suplementação de astaxantina, vitamina E e C também promoveu aumento da qualidade espermática ($p < 0,01$) dos animais suplementados. Além destes resultados, os autores também observaram um aumento na concentração média espermática ($p = 0,01$) e aumento da capacidade antioxidante total ($p = 0,02$) para os animais suplementados. Em um outro estudo, realizado na Índia (Sirivastava et al., 2023), 12 touros mestiços Karan Fries (Holstein Friesian X Tharparkar) foram tratados com um suplemento comercial composto de oligoelementos antioxidantes, observou melhora ($p < 0,05$) da motilidade e vigor, e redução de espermatozoides morfológicamente anormais após 120 dias de suplementação. Tal resultado corrobora com o obtido no presente estudo, que identificou diferença destes parâmetros no período PST, equivalente a 90-120 dias após o início da suplementação. A ocorrência da melhoria predominantemente no período PST, se justifica pela duração do ciclo espermático na espécie bovina. A espermatogênese é um processo de multiplicação e diferenciação celular, que dura em torno de 60 dias e se divide em três fases: spermatocitogênese, meiose e espermiogênese. Em touros, a duração destas fases é de aproximadamente 21, 23 e 17 dias de duração, respectivamente (Staub; Johson, 2018).

Para as variáveis de cinética espermática e integridade de membranas, Sirivastava et al. (2023) também relataram diferença ($p < 0,05$), divergindo dos resultados obtidos neste trabalho. Neste caso, a suplementação prolongada do referido estudo (120 dias), pode ter contribuído para a ocorrência de melhoria destes parâmetros, visto que no presente trabalho suplementou-se com a astaxantina por 60 dias. Além disso, a característica de touros “problema” do presente estudo confere ao suplemento um desafio maior para ação antioxidante, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão de seu potencial e ação em relação ao seu efeito prolongado para integridade de membranas e estresse oxidativo.

Identificar as possíveis causas para a manifestação deste comportamento como “reprodutor-problema” é fundamental para poder reverter este quadro,

associando-se juntamente a ferramentas que possam otimizar o potencial de produção destes reprodutores. Em ganhos, técnicas de centrifugação e preparo do sêmen, manejos de coletas e suplementação de nutracêuticos são algumas destas ferramentas (Morrell et al., 2010). Entretanto, para a espécie bovina, são escassos os estudos sobre estes touros-“problema”, sendo necessária a realização de novas pesquisas com esta abordagem.

Características individuais destes touros-“problema” conferem a eles maior dificuldade de adaptação, promovendo o estresse do indivíduo e a produção de ERO, além de modificações metabólicas e endócrinas responsáveis por causar insultos no epitélio seminífero e interferir na formação espermática (Ponnampalam et al.,2022; Costa-e-Silva et al.,2023). A duração e intensidade deste insulto é que determinará o grau de interferência na espermatogênese e, conseqüentemente, na qualidade espermática e formação de defeitos considerados maiores, menores e totais. Em touros submetidos ao estresse térmico escrotal, identificou-se que os danos decorrentes do insulto surgiram inicialmente com 7 dias após o estímulo, perdurando a ocorrência de defeitos maiores por até 28 dias (Garcia-Oliveros et al.,2020). No presente estudo, identificou-se que o grupo ASTX apresentou melhoria para defeitos maiores testiculares pré-criopreservação, em relação aos animais do grupo CTRL. Tal resultado indica que a ASTX agiu ao longo dos 60 dias de espermatogênese predominantemente nas etapas de formação e diferenciação celular.

Ao enviar um touro para uma CCPS, o principal intuito é produzir doses de sêmen com qualidade, para que estas possam ser comercializadas e, com isso, disseminar no rebanho nacional e internacional o potencial melhorador que o reprodutor tem a oferecer. Neste sentido, a melhora na qualidade espermática dos ejaculados produzidos, criopreservados e liberados para comercialização é um fator de extrema importância para o desempenho produtivo e econômico do touro durante sua estada em uma CCPS. Na pecuária mundial, a tendência na indústria é otimizar cada vez mais os ejaculados produzidos, suprimindo a demanda do mercado com qualidade e retorno econômico viável a todos os elos da cadeia (Schenk, 2018). Com base nos valores absolutos em doses produzidos pelos indivíduos do grupo ATSX foi possível observar que o impacto melhorador na qualidade espermática dos touros com problemas de produção atuou diretamente na eficiência produtiva, permitindo aos touros liberarem em média, um número

maior de doses, com menor número de saltos realizados no período PST ($DP=1.333,33\pm244,44$), em relação ao período PRE ($DP=359,86\pm226,32$). Se levado em consideração os dados de 2021 referentes ao mercado da IATF, estima-se que nos próximos 10 anos, o Brasil atinja a marca de 45,2 milhões de doses comercializadas (Baruselli et al., 2022). Tal marco deve ser considerado como um grande avanço técnico e eficiência produtiva para a pecuária nacional, e reafirma a importância da realização de estudos que possam otimizar a produção de doses de touros reprodutores mantidos em CCPS.

Quanto ao efeito dos períodos de avaliação foi possível observar um melhor desempenho geral de ambos os grupos no período PSI e PST. Estes períodos referem-se aos meses de junho, julho e agosto, considerado o inverno meteorológico que, na região sudeste do país (Botucatu-SP - $22^{\circ}59'58''S$ $48^{\circ}25'44''W$, 892 m), é característico por apresentar temperaturas amenas e redução da incidência das chuvas e umidade relativa do ar. De acordo com Landaeta-Hernández et al. (2020), tais características podem contribuir para a melhora da qualidade espermática ($p<0,01$) para animais *Bos indicus* mantidos em clima tropical. Apesar do período PSI e PST ter apresentado melhores resultados em relação aos demais períodos, é possível identificar através da interação grupo*período o melhor desempenho dos animais do grupo tratado para motilidade, vigor, defeitos maiores testiculares, defeitos menores e defeitos totais pré-criopreservação no período PST, em relação ao grupo controle.

5. CONCLUSÃO

Comprovando em parte nossa hipótese, o tratamento com astaxantina apresentou efeitos benéficos para motilidade, vigor, defeitos maiores testiculares, defeitos menores e defeitos totais pré-criopreservação, permitindo um incremento numérico na produção de doses para o grupo tratado. No entanto, tais efeitos não foram observados sobre qualidade e cinética espermática pós-criopreservação, integridade de membranas e estresse oxidativo, sendo necessários mais estudos sobre seus efeitos e períodos de suplementação para touros-“problema” em regime de coleta em CCPS.

6. AGRADECIMENTOS

À empresa Central Bela Vista – Grupo CRV® pela colaboração com este estudo em todas as etapas de manejo dos touros, colheita, processamento sêmen, envase e criopreservação das palhetas, além da disponibilização de materiais e do equipamento para análise de cinética espermática (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA; IVOS - II, Hamilton Thorne Research®, Beverly, EUA).

À equipe do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu – SP, sobretudo ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e à Dra. Camila de Paula Freitas-Dell’Aqua, pela colaboração com este estudo e pela disponibilização do citômetro de fluxo - BD LSR Fortessa (Becton Dickinson®, Mountain View, CA, USA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Reprodução Animal (CAPES, Código Financeiro 001) pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Index ASBIA Mercado, 1º trimestre de 2023. Disponível em: < https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_1Tri_2023.pdf>. Acesso em: 28/08/2023.

BARUSELLI, P. S.; SANTOS, G. F. F.; CREPALDI, G. A.; CATUSSI, B. L. C.; OLIVEIRA, A. C. S. IATF em números: evolução e projeção futura. In: Anais da VI Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal. Campinas/SP, 2022.

COSTA, R. A.; SANTOS, M. L. P.; CASTRO, I. C.; MATTIELLO, M.; SOUZA, J. A.; ALMEIDA, W. F.; BOETTCHER, D. L.; CUCHI, D.; PAIM, B. H. R.; VIEIRA, F. M. C.; PAULA-LOPES, F. F.; BARROS, F. R. O. Effect of astaxanthin supplementation on *in vitro* embryo development and immune response of dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.33, p.171-171, 2021.

COSTA-E-SILVA, E. V.; SAMPAIO, B. F. B.; MACEDO, G. G. Comportamento sócio-sexual e seus problemas no desempenho de touros **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.47, n.3, p.616-624, 2023.

CRESPILHO, A. M. Produção de sêmen em regime de central – muito além do espermograma. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.45, n.4, p.566-573, 2021.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. International Symposium on Animal Biology of Reproduction, v. 9, p. 941, 2012.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O.; CANISSO, I.F.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. International Equine Reproduction Symposium, Cambridge UK. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 57, 2018.

GARCIA-OLIVEROS, L. N.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; GONZAGA, V. H. G.; NOGUEIRA, V. J. M.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; ALMEIDA, F. S.; ALVES, M. B. R.; PINTO, S. C. C.; NICHI, M.; LOSANO, J. D. A.; KAWAI, G. K. V.; CELEGHINI, E. C. C. Efeitos do estresse térmico em espermatozoides bovinos: uma abordagem cronológica para os primeiros achados. **Revista Internacional de Biomaterologia**, v. 64, p.1367–1378, 2020.

GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P.; MONTEIRO, G. A.; LISBOA, F. P.; PAPA, P. M. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. International Symposium on Animal Biology of Reproduction, v.9 p.929.2012, 2012.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; KURATA, H.; MATSUMOTO, A.; MIKI, W.; KAMIYAMA, M.; ITAKURA, H.; YAMAMOTO, S.; KONDO, K. Inhibition of Low-

Density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 7, n. 4, p. 216-222, 2000.

KUMAR, S.; SINGH, S. V. Inhibition of NF- κ B signaling pathway by astaxanthin supplementation for prevention of heat stress-induced inflammatory changes and apoptosis in Karan Fries heifers. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p.1125-1134, 2019.

KUMAR, S.; SINGH, S. V.; BHAN, S. C. Effect of dietary supplementation of astaxanthin (potent antioxidant) on growth rate, DMI, FCR and metabolic changes in Karan Fries heifers during heat stress. **Journal of Agrometeorology**, v. 21, n. 1, p. 80-88, 2019.

KUMAR, S; SINGH, S. V. Influence of astaxanthin supplementation on attainment of puberty and lipid peroxidation in Sahiwal and Karan Fries (Holstein $\times$ Tharparkar) heifers during summer season. **Biological Rhythm Research**, v. 51, n.1, p.15-28, 2020.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A. J.; GIL-ARAÚJO, M. A.; UNGERFELD, R.; ERA, D. O.; URDANETA-MOYER, A.; PARRA-NÚÑEZ, A.; KASKE, M.; BOLLWEIN, H.; CHENOWETH, P. J. Effect of season and genotype on values for bull semen variables under tropical conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 221, 2020.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

MORRELL, J. M.; MARI, G.; KÚTVÖLGYI, G.; MEURLING, S.; MISLEI, B.; IACOMO, E.; RODRIGUEZ-MARTINES, H. Pregnancies Following Artificial Insemination with Spermatozoa from Problem Stallion Ejaculates Processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 642-645, 2011.

NISHIDA, Y.; NAWAZ, A.; HECHT, K.; TOBE, K. Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. **Nutrients**, v.14, n. 107, 2022.

OUCHI, A.; AIZAWA, K.; IWASAKI, Y.; INAKUMA, T.; TERAOKA, J.; NAGAOKA, S. I.; MUKAI, K. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Carotenoids and Food Extracts in Solution. Development of a Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9967-9978, 2010.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**. v. 38, p.1171-1180, 1988.

PONNAMPALAM, E.N.; KIANI, A.; SANTHIRAVEL, S.; HOLMAN, B.W.B.; LAURIDSEN, C.; DUNSHEA, F.R. The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality—Invited Review. **Animals**, v.12, p. 3279, 2022.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; SILVA, A. M. S.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v.120, p.681-699, 2018.

SCHENK, J. L. Review: Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. **Animal**, v. 12, p. 142-147, 2018.

SRIVASTAVA, R.; Nair, R. M.; DEWRY, R.; KULKARNI, N.; MANI, V.; BHAKAT, M.; MONDAL, G. Semen characteristics, nutrient utilization and immuno-endocrine status in response to dietary supplementation of a novel trace mineral mixture in crossbred bulls. **Journal of Trace Elements and Minerals**, v. 5, 2023.

STAUB, C.; JOHSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v.12, p. 27-35, 2018.

VAHIDINIA, A.; RAHBAR, A. R.; MAHMOODABADI, M. M. S. Effect of Astaxanthin, Vitamin E, and Vitamin C in Combination with Calorie Restriction on Sperm Quality and Quantity in Male Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, p. 252-263, 2016.