

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/06/2026.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA
QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS
DE CORTE**

Laura Fernanda Sechirolli da Silva

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA
QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS
DE CORTE**

Discente: Laura Fernanda Sechirolli da Silva

Orientador: Dr. Fabio Morato Monteiro

Coorientadora: 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

S586d

Silva, Laura Fernanda Sechirolli

Diluyente contendo astaxantina melhora qualidade do sêmen
descongelado em touros de corte / Laura Fernanda Sechirolli Silva. --
Jaboticabal, 2025
66 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fabio Morato Morato

Coorientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Antioxidante. 2. Bovinos Reprodução. 3. Estresse oxidativo. 4.
Sêmen. 5. Touros. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

A pesquisa em biotecnologia da reprodução desempenha um papel fundamental no avanço dos sistemas de produção pecuária. A adição do antioxidante astaxantina a um diluente comercial busca reduzir o estresse oxidativo e preservar a motilidade do sêmen de touros no pós-descongelamento. A melhora na qualidade espermática contribui para maior eficiência nos programas de inseminação artificial, favorecendo a disseminação de material genético superior. Essa abordagem está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 2, 8 e 9), ao promover inovação, sustentabilidade e aumento da produtividade na bovinocultura de corte.

Potential Impact of this Research

Research in reproductive biotechnology plays a fundamental role in advancing livestock production systems. The addition of the antioxidant astaxanthin to a commercial semen extender aims to reduce oxidative stress and preserve sperm motility in bulls after thawing. The improvement in sperm quality contributes to greater efficiency in artificial insemination programs, favoring the dissemination of superior genetic material. This approach is aligned with the Sustainable Development Goals (SDGs 2, 8, and 9), by promoting innovation, sustainability, and increased productivity in beef cattle farming.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS DE CORTE

AUTORA: LAURA FERNANDA SECHIROLLI DA SILVA

ORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO

COORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

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

 **FABIO MORATO MONTEIRO**
Documento assinado digitalmente
Data: 16/06/2025 14:27:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. FABIO MORATO MONTEIRO (Participação Virtual)
Instituto de Zootecnia IZ / Sertãozinho/SP

 **RUBENS PAES DE ARRUDA**
Documento assinado digitalmente
Data: 06/06/2025 13:40:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RUBENS PAES DE ARRUDA (Participação Virtual)
Departamento de Reprodução Animal / FMVZ USP Pirassununga/SP

 **FABIANA FERREIRA DE SOUZA**
Documento assinado digitalmente
Data: 16/06/2025 14:11:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANA FERREIRA DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 06 de junho de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LAURA FERNANDA SECHIROLI DA SILVA – Nascida na cidade de Monte Alto, São Paulo, no dia 28 de fevereiro de 1999. Graduada em Técnico Agrícola em 2016 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/FCAV, *Campus* de Jaboticabal/SP. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em janeiro de 2018, no Centro Universitário Barão de Mauá – CBM, – *Campus* de Ribeirão Preto, SP, concluindo a graduação em dezembro de 2022. Durante a graduação em Medicina Veterinária realizou diversos cursos e estágios na área de reprodução animal, incluindo um treinamento em reprodução bovina na UNESP/FCAV, *Campus* de Jaboticabal/SP. Foi membro da liga acadêmica de Ruminantes e Equinos – RUMEQUI, do CBM – *Campus* de Ribeirão Preto, SP durante a graduação. Realizou o estágio curricular no Instituto de Zootecnia – Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte – IZ CAPD, na unidade de Sertãozinho, SP, no segundo semestre de 2022. Em março de 2023 ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, a nível de mestrado, na área de Reprodução Animal na UNESP/FCAV, *Campus* de Jaboticabal/SP, sob a orientação do Professor Dr. Fabio Morato Monteiro e a coorientação da Professora Dra. Lindsay Unno Gimenes, com recebimento de bolsa CAPES.

O que quer que você faça, faça com amor e isso bastará para que faça bem.

Santa Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho à minha família: Paulo, Regiane, Lucas e Ramon.

Vocês são a razão da minha força e perseverança.

Todas as minhas vitórias são, na verdade, de vocês também.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que foi minha maior fonte de força e sabedoria ao longo de toda essa jornada. A cada momento de dúvida ou dificuldade, pude sentir Sua presença me guiando, dando-me a clareza necessária para superar os obstáculos e seguir em frente. Agradeço por me proporcionar a capacidade de aprender, crescer e enfrentar cada desafio com coragem e determinação.

Aos meus pais, Regiane e Paulo, não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão por tudo o que fizeram e fazem por mim. Desde o início da minha caminhada acadêmica, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando incondicionalmente, me incentivando a seguir meus sonhos e me dando força nos momentos de cansaço e desânimo. O amor e os valores que vocês me ensinaram são fundamentais para tudo o que sou e para o que conquistei. Vocês são a base sólida que me permitiu chegar até aqui, e sou eternamente grata por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu irmão, Lucas, por ter trazido um novo sentido as nossas vidas com sua chegada. Você era a peça que faltava em nossas vidas. Agradeço por toda sua bondade, companheirismo e amor. Sou muito feliz por poder ser sua “tata”.

Ao meu amor, Ramon, meu agradecimento mais profundo por ser minha âncora e meu maior aliado. A sua presença ao meu lado, dia após dia, foi crucial para esse projeto. Obrigada por ser meu maior incentivador e por toda confiança que teve em meu potencial, mesmo quando eu não tive. Sou muito grata por tudo o que fez por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio e minha coorientadora Prof. Dra. Lindsay, agradeço por todo apoio e confiança depositados em mim ao longo deste processo.

Ao Instituto de Zootecnia - Sertãozinho, um lugar que se tornou parte da minha história. Agradeço pelo empréstimo dos animais, pelo apoio dos funcionários e pelas instalações.

À minha equipe do laboratório de reprodução do IZ (Letícia, Marcelo, Marina e Pedro), agradeço por toda ajuda que deram para que esse projeto se tornasse possível.

Às meninas do LABOR (UNESP/Jaboticabal), Joice e Nelise, que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis e sempre me incentivaram.

À UNESP/Botucatu, agradeço imensamente pela oportunidade de realizar as análises do meu experimento. Às professoras Dra. Camila e Prof. Dra. Fabiana, minha gratidão por todo o conhecimento que me transmitiram durante o tempo que estive em Botucatu.

À Botupharma, agradeço pela doação do diluente Botubov para o experimento. E, por último, mas não menos importante, à CAPES, pela bolsa auxílio que me permitiu dedicar-me integralmente ao desenvolvimento deste projeto.

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

SÚMARIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. HIPÓTESE	2
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
4.1 Criopreservação de sêmen.....	3
4.2 Espécies reativas ao oxigênio (ERO).....	5
4.3 Peroxidação Lipídica e Estresse Oxidativo	6
4.4. Antioxidantes.....	8
4.5. Carotenoides	9
4.6 Astaxantina	10
5. REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2 – DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS DE CORTE.....	21
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos	24
2.1 Reagentes	24
2.2 Aspectos éticos	25
2.3 Animais e coleta sêmen	25
2.4 Avaliação do sêmen	25
2.5 Congelação do sêmen	29
2.6 Análise estatística	31
3. Resultados	31
4. Discussão	32



Protocolo nº 387-2023

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto de Zootecnia

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o protocolo intitulado “**AVALIAÇÃO DE SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM O ANTIOXIDANTE ASTAXANTINA**”, **PROTOCOLO Nº387-2023**, sob a responsabilidade de **Fabio Morato Monteiro, Lindsay Unno Gimenes, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, Laura Fernanda Sechirolli da Silva, Marina de Oliveira Silva, Marcelo Sant’Ana Borges, Leticia Padovani da Silva, Maria Eduarda Chaim, Nelise Kasue Samecima Prosperute**, que envolve a utilização de bovinos para fins de pesquisa científica e/ou treinamento – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO DE ZOOTEKNIA, em reunião de 12/05/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica () Treinamento
Vigência do Projeto	01/06/2023 a 01/06/2024
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus indicus/ Nelore</i>
No. de Animais	12
Peso/Idade	De 600 a 700kg/ 48 meses
Sexo	12 machos
Origem	Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte, Sertãozinho

José Evandro de Moraes
Presidente CEUA-IZ

DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA A QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS DE CORTE

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de astaxantina (ASTX) no diluente comercial sobre a qualidade espermática de sêmen bovino após criopreservação. Foram colhidos quatro ejaculados de 12 touros Nelores, totalizando 48 ejaculados. As amostras foram avaliadas quanto a cinética, concentração e morfologia espermática. A seguir, o sêmen foi dividido em três alíquotas e diluído em meio comercial: controle (CONTR; sem astaxantina), com 1 μmol (ASTX1) ou 2 μmol (ASTX2) de ASTX. Após a criopreservação, as amostras foram reavaliadas imediatamente após a descongelação e 30 minutos de incubação a 46°C, considerando a cinética espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e níveis de estresse oxidativo (TBARS). A motilidade total, rapidez e amplitude de deslocamento lateral de cabeça foram maiores ($P < 0,05$) no ASTX1 em relação ao CONTR. Embora a integridade da membrana plasmática, do acrossomo e o potencial de membrana mitocondrial não tenham diferido entre os tratamentos, a peroxidação lipídica foi menor ($P 0.041$) no ASTX1 comparado ao ASTX2. Concluímos que a inclusão de ASTX na concentração de 1 μmol no meio diluente melhora a qualidade espermática após a descongelação, aumentando a motilidade total e reduzindo a peroxidação lipídica nos espermatozoides de touros.

Palavras-chave: Antioxidante, bovino, estresse oxidativo, Nellore, peroxidação lipídica

EXTENDER CONTAINING ASTAXANTHIN IMPROVES THAWED SPERM QUALITY IN BEEF BULLS

The aim of this study was to evaluate the effects of adding astaxanthin (ASTX) to commercial extender on the quality of bovine semen after cryopreservation. Four ejaculates were collected from 12 Nellore bulls, totaling 48 samples. Sperm kinetics, concentration, and morphology of the samples were evaluated. The semen sample was then divided into three aliquots and diluted in commercial extender: control (without astaxanthin) and addition of 1 μmol (ASTX1) or 2 μmol (ASTX2) of ASTX. After cryopreservation, the samples were reevaluated immediately after thawing and after 30 minutes of incubation at 46 °C (rapid thermal resistance test) regarding sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidative stress levels (TBARS). Total motility, rapid sperm percentage, and the amplitude of lateral head displacement were higher ($P < 0.05$) in ASTX1 compared to control. Although there was no difference in plasma membrane integrity, acrosomal membrane integrity, or mitochondrial membrane potential between treatments, lipid peroxidation was lower ($P = 0.041$) in ASTX1 compared to ASTX2. We conclude that the inclusion of ASTX at a concentration of 1 μmol in the extender improves sperm quality after thawing, increasing total motility and reducing lipid peroxidation in bull semen.

Keywords: Antioxidant; Cattle; Oxidative stress; Nellore; Lipid peroxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

μL - microlitro

μM – Micromolar

μm/s - micrometro por segundo

¹ O₂ - Oxigênio Singleto

4-HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

ALH - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça

ASTX - Astaxantina

BCF - Frequência de batimentos cruzados

CASA - Computer-Assisted Semen Analysis

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais

-CO - Cetona

CONTR – Controle

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GSH – Glutathione peroxidase/glutathione reductase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IZ - Instituto de Zootecnia

LIN - Linearidade

MDA – Malondialdeído

mL - mililitro

MP - Motilidade progressiva

MPAI - membrana plasmática e acrossomal íntegras

MPIAL - membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada

MPLAI - membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra

MPLAL - membrana plasmática e acrossomal lesionadas

MT - Motilidade total

ng – nanograma

NO - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio

O₂⁻ -Superóxido

°C - graus Celsius

OH[•] - Radical Hidroxila

RAP - Rapidez

SAS - Statistical Analysis Software Institute

SOD – Superóxido dismutase

sptz – espermatozoides

sptz/mL - espermatozoides por mililitro

STR - Retilinearidade

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TTR - Teste de termorresistência

VAP - Velocidade de trajeto

VCL - Velocidade curvelinear

VSL - Velocidade em linha reta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média $\pm$ erro padrão das variáveis cinéticas do sêmen descongelado e do teste rápido de resistência térmica (TRT) dos grupos CONTR, ASTX1 e ASTX2.....	45
Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas pós-descongelação dos grupos CONTR, ASTX1 e ASTX2 avaliadas por citometria de fluxo.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos prejudiciais do congelamento-descongelamento em uma célula espermática.....	4
Figura 2. Estrutura química da Astaxantina, Fórmula molecular - $C_{40}H_{52}O_4$	11
Figura 3. Mecanismo de ação da astaxantina na membrana interna (lipofílica) e externa (hidrofílica).....	11

Capítulo I – Considerações Gerais

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Entre as primeiras células criopreservadas com sucesso estão os espermatozoides de mamíferos. Desde então, o uso de sêmen criopreservado para inseminação artificial e outras biotécnicas passou a desempenhar um papel crucial na produção animal (Curry, 1995). Apesar da criopreservação permitir a maximização da produtividade do rebanho, o processo provoca danos celulares, principalmente na membrana plasmática dos espermatozoides, comprometendo sua viabilidade, motilidade e fertilidade (Parks e Graham, 1992; Watson, 2000). Esses danos ocorrem devido à reorganização lipídica e alterações fisiológicas causadas pela redução metabólica e aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Baust et al., 2009).

A membrana plasmática dos espermatozoides, rica em lipídios, proteínas e colesterol, sofre transição de fase de líquido para gel durante a congelação, aumentando sua rigidez e vulnerabilidade à peroxidação (Lehninger et al., 2000; Purdy e Graham, 2004; Borges et al., 2011). Essa mudança também afeta a membrana mitocondrial, elevando a produção de ERO (Wang et al., 1997), que em condições fisiológicas contribuem positivamente para a fertilização (Kodama et al., 1996), mas em excesso causam estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1989; Sanocka e Kurpisz, 2004).

As ERO mais comuns incluem o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), sendo este último o mais agressivo, responsável por iniciar a peroxidação lipídica (Richard et al., 1991; Winterbourn, 1995; Ferreira e Matsubara, 1997). A peroxidação lipídica compromete a função celular ao modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Bayir e Kagan, 2008), além de causar alterações na morfologia espermática e perda de viabilidade (Aitken et al., 1996; Misro et al., 2004).

Para combater esses danos, o organismo conta com antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Agarwal et al., 2008). Contudo, sob estresse, como o da criopreservação, os antioxidantes endógenos não são suficientes, sendo necessária

a suplementação no meio diluente (Liu e Zeng, 2000; Amidi et al., 2016). Essa suplementação busca restaurar o equilíbrio redox celular e minimizar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Os carotenoides, pigmentos naturais com atividade antioxidante, se destacam por sua ação na neutralização do oxigênio singlete e radicais peroxil (Truscott, 1990; Young e Lowe, 2001). A astaxantina (ASTX), presente em algas e peixes, possui a mais alta capacidade antioxidante entre os carotenoides e atravessa a barreira hematoencefálica (Igielska-Kalwat et al., 2015; Fanaee-Danesh et al., 2019).

O mecanismo antioxidante da ASTX baseia-se na transferência de energia do oxigênio singlete, dissipando-a como calor sem se degradar, o que permite ação antioxidante contínua (Nielsen et al., 1998). Essa característica faz com que a ASTX atue de forma eficiente mesmo sob condições de alto estresse oxidativo. Sua estrutura química, com grupos hidroxila e ceto, permite interação tanto com a parte lipofílica quanto hidrofílica da membrana, aumentando sua eficácia (Brotosudarmo et al., 2020; Nishida et al., 2022). Além disso, reduz a mobilidade da cadeia alquil da membrana em fase fluida, protegendo a estrutura celular (Widomska et al., 2016).

Diversos estudos demonstram que a ASTX exerce efeitos positivos na reprodução, especialmente por sua ação antioxidante. Em homens com infertilidade, a suplementação dietética de ASTX melhorou a motilidade total e progressiva dos espermatozoides, aumentou a capacidade antioxidante do fluido seminal e reduziu citocinas inflamatórias (Aitken et al., 1996; Misro et al., 2004, Salih et al., 2024, Comhaire et al., 2005). Efeitos semelhantes foram observados quando ASTX foi adicionada ao diluente de sêmen em homens normozoospermicos (Dede e Saylan, 2022).

Em carneiros, doses de 2 e 4 μM no diluidor aumentaram a integridade da membrana e a motilidade espermática (Fang et al., 2015; Abdi-Benemar et al., 2020). Em suínos, a concentração ideal foi de 0,5 μM , sendo que concentrações maiores prejudicaram a cinética dos espermatozoides (Basioura, 2020). Já em bovinos, embora poucos estudos existam, observou-se melhora da motilidade progressiva com doses de 0,5 a 1 μM , enquanto concentrações mais altas (2 μM) mostraram efeito negativo, evidenciando que o efeito benéfico da ASTX depende da concentração utilizada (Farzan et al., 2014).

Implicações

Apesar de o presente estudo ter abordado aspectos importantes relacionados ao estresse oxidativo e à cinética dos espermatozoides, a avaliação da fecundação não foi realizada, o que constitui uma limitação significativa. Embora a motilidade e a integridade celular dos espermatozoides sejam indicativos da sua viabilidade inicial, a verdadeira capacidade fecundante e a fertilidade não foram confirmados.

Apoio

O estudo teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil, Processos N° 2017/50339-5 e N° 2021/19932-5).

Agradecimentos

Os autores agradecem a Botupharma® (Botucatu, São Paulo, Brasil) pela doação de meio diluente (BotuBov®); e ao Instituto de Zootecnia – Centro Avançado de Bovinos de Corte (IZ CAPD, Sertãozinho, São Paulo, Brasil) pela disponibilização de animais, estrutura e funcionários.

Referências

Abdi-Benemar, H., Khalli, B. Zamiri, M. J., Ezazi, H., Ardabili, G. S., Moghadam, S. H., Simanoor, N., 2020. Effects of astaxanthin supplementation on the freezability, lipid peroxidation, antioxidante enzyme actives and post-thawing fertility of ram sêmen. **Small Ruminat Research** 192, 106213. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106213>.

Aitiken, John R., 2020. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Society for Reproduction and Fertility** 159, 4. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>.

Atiken, J. R., Wignate, J. K., Iullis, N. De., McLaughlin, E. A., 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using bodypy C11. **Molecular Human Reproduction** 13, 4. <https://doi:10.1093/molehr/gal119>.

Barreiros, A.L.B.S., David, J. M., David, J. P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** 29, No 1, 113-123.

Basioura, A., Tsakmakidisa, I. A., Martinezb, E. A., Rocab, J., Lib, J., Molinabe, M. F., Theodoridisc, A., Boscosa, C. M., Parillab, I., 2020. Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. **Animal Reproduction Science** 218, 106478.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106478>.

Borges, J. C., Silva, M. R., Guimarães, J. D., Esper, C. R., Franceschini, P. H., 2011. Bovine sperm plasma membrane: effect of oxygen metabolites, antioxidants and cryopreservation. **Brazilian journal of animal reproduction** 35, 303-314.

Brouwers, J. F. H. M., Gadella, B. M., 2003. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine** 35, 11. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.010>.

Brouwers, J. F. H. M., Silva, P. F. N., Gadella, B. M., 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology** 63, 458-469.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.046>.

Campanholi, S. P., Monteiro, F. M., Dias, E. A. R., Mercadante, M. E. Z., Paz, C. C. P., Junior, J. A. D., Papa, F. O., Dell'Aqua, C. P. F., Vantini, R. Garcia, J. M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology** 89, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.008>.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal., 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.

Di Meo, S. Reed, T. T., Venditti, P., Victor, M. V., 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.

Domínguez-Rebolledo, A. E., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Olmo, E., Bisal, A., Ros-Santenaella, J. L., Garde, J. J., 2010. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in domestic animals** 45, e360-368. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01578.x>.

Donoso, A. González-Durán, J. Muñoz, A. A., González, P. A., Agurto-Muñoz, C., 2021. "Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials". **Pharmacological Research** 166, 105479. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105479>.

Fang, Y., Zhong, R., Chen, L., Feng, C., Sun, H., Zhou, D., 2015. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidante capacity of ram sêmen during liquid storage. **Small Ruminant Research** 130, 178-182.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.016>.

Farzan, M., Chamani, M. Varnaseri, H., 2014. The antioxidante effect of astaxanthin on quantitative and qualitative parametres of bull sperm. **Indian Journal of Foudamental and Applied Life Sciences** 4, 425-430.

Freitas-Dell'Aqua, C.P., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Dell'Aqua, J.R.J.A., Papa, F.O., 2012. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, 9:941.

Freitas-Dell'Aqua, C.P., Guasti, P.N., Papa, F.O., Canisso, I.F., Dell'Aqua, J.R.J.A., 2018. 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**, 66:57.

Guasti, P.N., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Maziero, R.R.D., Hartwig, F.P., Monteiro, G.A., Lisboa, F.P., Papa, P.M., 2012. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. **International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, 9:929.

Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology** 142, 231-255.

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P., 1990. Cryopreservation of Mammalian Sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology** 11, 73-88. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>.

Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Thatcher, C. D., Nebel, R. L., Cassel, B. G., 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxidase dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology** 67, 1004-1012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.013>.

Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., Zhang, Y., 2021. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. **Frontiers in Veterinary Science** 8, 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>.

Kodama, H., Kuribayashi, Y., Cagnon, C., 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology** 17, 2.

Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., Plessis, S. S., 2010. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology** 48, 425-435.

Kumar, D., Kumar, P., Singh, P., Yadav, S. P., Sarkar, S. K., Bharadwaj, A., Yadav, P. S., 2014. Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Sciences** 84, 389-392.

Lakey-Beitia, J., Kumar, J., Hegde, M. L., Rao, K. S., 2019. Carotenoids as Novel Therapeutic Molecules Against Neurodegenerative Disorders: Chemistry and Molecular Docking Analysis. **International Journal of Molecular Sciences** 20, 5553. <https://doi.org/10.3390/ijms20225553>.

Leclerc P., Lamirande, E., Gagnon, C., 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology & Medicine** 22, 4.

Li, L., Chen, Y., Jiao, D., Yang, S., Li, P., 2020. Protective effect of astaxanthin on Ochratoxin A-Induced Kidney injury from ice by regulating oxidative stress-related NRF2/KEAP1 Pathway. **Molecules** 25, 1368. <https://doi.org/10.3390/molecules25061386>.

Lim, B. P., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T., Takama, K., 1992. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism** 1126, 178-184. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90288-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90288-7).

Marqui, F. N., Martins-Jr, A., Cruz, T. E., Berton, T. I. U., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Dell'Aqua Jr, J. A., 2023. Iodixanol supplementation in freezing extender improves the

antioxidant capacity of semen. **Reproduction in Domestic Animals** 58, 1551-1558.

[https://DOI: 10.1111/rda.14470](https://doi.org/10.1111/rda.14470).

Maxwell, W. M. C., Watson, P. F., 1996. Recent progress in the preservation of ram sêmen. **Animal Reproduction Science** 42, 55-65. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01544-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01544-8).

Miller, J. K., Brezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F. C., 19993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **J. Dairy Sci** 76, 2812-2823. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77620-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1).

Nguyen, K. D., 2013. Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production. **Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works**. Tennessee Reserch and Creative Exchange.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay fot lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry** 95, 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

Oliveira, L. Z., Arruda, R. P., Andrade, A. F. C., Celeghini, E. C. C., Reeb, P. D., Martins, J. P. N., Santos, R. M., Beletti, M. E., Peres, R. F. G., Monetrio, F. M., Lima, V. F. M. H., 2013. Assessmente of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science** 137, 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.01.010>.

Pandey, A. N., Yadav, P. K., Premkumar, K. V., Tiwari, M., Pandey, A. K., Chaube, S. K., 2024. Reactive oxygen species signaling in the deterioration of quality of mammalian oocytes cultured in vitro: Protective effect of antioxidants. **Cellular signaling** 117, 111103. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111103>.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., First, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**. 38:1171-1180.

Pessoa, E. R., Vasconcelos, F. R., Paula-Marinho, S. O., Daloso, D. M., Guerreiro, D. D., Martins, J. A. M., Gomes-Filho, E., Moura, A. A., 2023. Metabolomic profile of seminal plasma from Guzará bulls (*Bos indicus*) with contrasting sperm freezability phenotypes. **Reproduction in Domestic Animals** 58, 1379-1392. [https://DOI: 10.1111/rda.14453](https://DOI:10.1111/rda.14453).

Tran, L. V., Malla, B. A., Kumar, S. Tyagi, A. K., 2017. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 30, 622-637. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>.

Valença, R. M. B., Guerra, M. M. P., 2007. Reactive oxygen species (ROS) and the use of antioxidants in the cryopreservation of swine semen. **Brazilian journal of animal reproduction** 31, 47-53.

Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science** 60-61, 481-492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).

Yamashita, E., 2015. Let astaxanthin be thy medicine. **PharmaNutrition** 3, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.09.001>.

Zhou, C., et al. (2016). "Sperm motility, integrity, and fertilization capacity." **Journal of Reproductive Medicine**, 61(7): 433-440.