

**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

CERTIFICADO

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 curvilinear

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).

2. OBJETIVOS

Diante da escassez de trabalhos na literatura sobre a utilização da ASTX como antioxidante na reprodução de bovinos de corte e seu potencial para aumentar a qualidade espermática pós-descongelação, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de ASTX a um meio diluente comercial à base de gema de ovo na criopreservação do sêmen de bovinos de corte.

3. Hipótese

A adição de astaxantina a um diluente comercial à base de gema de ovo melhora a qualidade espermática pós-descongelação do sêmen de bovinos de corte, ao reduzir o estresse oxidativo, contribuindo para a preservação da integridade das membranas espermáticas, motilidade e redução dos danos oxidativos induzidos pelo processo de criopreservação.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Criopreservação de sêmen

Entre as primeiras células a serem criopreservadas com sucesso, estão os espermatozoides de mamíferos e desde então, o uso de sêmen congelado-descongelado para inseminação artificial e outras técnicas passou a desempenhar um papel crucial na produção animal (Curry, 1995). O uso de biotecnologias, como a criopreservação, permite a maximização da produtividade do rebanho, viabilizando a distribuição eficiente e econômica de material genético superior em grande escala (Grotter et al., 2019; Ugur et al., 2019). O desempenho reprodutivo masculino bem-sucedido é caracterizado principalmente pela produção de células espermáticas viáveis e de boa qualidade em bovinos (Kokubu et al., 2019). A criopreservação é um processo que permite a sobrevivência de células ou tecidos a baixas temperaturas, com a redução ou suspensão da atividade metabólica (Watson, 2000).

O processo de congelação das células ocorre por quiescência e redução metabólica, diminuindo o consumo energético e a produção de catabólitos (Hammerstedt et al., 1990). Contudo, durante esse processo, as células sofrem diversos danos em sua anatomia e fisiologia, que resulta na redução da função celular (Parks e Graham, 1992). No caso do sêmen, esses danos são particularmente evidentes, afetando fisicamente, bioquimicamente e oxidativamente a membrana espermática, o que diminui a viabilidade e a capacidade de fertilização do espermatozoide. Esses desafios reduzem a motilidade espermática, comprometem a integridade estrutural das membranas e a atividade mitocondrial, podendo induzir a fragmentação do DNA e apoptose (Watson, 2000).

As etapas da criopreservação do sêmen envolvem processos que visam preservar a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides ao longo do tempo. Inicialmente, o sêmen é diluído para equilibrar a concentração de espermatozoides e proteger as células contra danos térmicos (Ugur et al., 2019). Os principais estressores as células são o resfriamento e a congelação. Na etapa do resfriamento, as células ficam sujeitas a efeitos como o desacoplamento metabólico, desequilíbrios nos íons, ativação de proteases, acidificação celular, redução da disponibilidade energética, mudança na fase das membranas, instabilidade do citoesqueleto e formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO), conforme ilustrado na Figura 1 (Baust et al., 2009, Ugur et al., 2019).

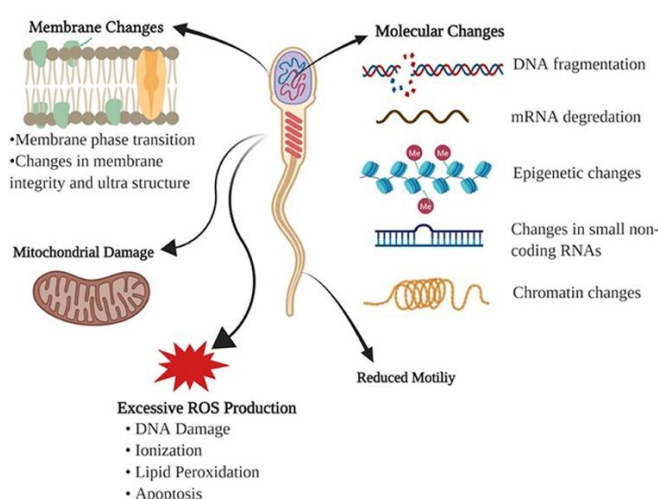


Figura 1. Efeitos prejudiciais do congelamento-descongelamento em uma célula espermática (Ugur et al., 2019).

Dentre as principais lesões celulares dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, destaca-se as lesões de membrana plasmática. A membrana plasmática envolve todo espermatozoide e seus principais componentes são os lipídios, proteínas e o colesterol. Em condições normais, os espermatozoides possuem uma membrana plasmática composta por uma bicamada de fosfolipídios, responsável pela fluidez celular. (Lehninger et al., 2000; Borges et al., 2011; Tran et al., 2017). As proteínas presentes na membrana agem como canais através da membrana, atuando como receptores para outras moléculas (Amann e Pickett, 1987), enquanto o colesterol tem uma função reguladora, prevenindo o início da reação acrossomal precoce (Langlais e Roberts, 1985; Scott, 2000).

As injúrias na membrana plasmática dos espermatozoides ocorrem pela reorganização dos seus componentes. Quando submetidos a baixas temperaturas, os lipídeos 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 e Graham, 2004; De Leeuw et al., 1990). A alteração na fluidez da membrana mitocondrial leva a um aumento no potencial da membrana e um consequente aumento na produção de ERO (Wang et al., 1997).

4.2 Espécies reativas ao oxigênio (ERO)

O metabolismo basal das células aeróbias, como o espermatozoide, produz constantemente e de forma natural ERO, acompanhada pela sua contínua inativação por mecanismos antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1989). Os metabólitos do oxigênio são substâncias instáveis que apresentam número ímpar de elétrons, podendo apresentar um ou mais elétrons desemparelhados. Para atingirem a estabilidade, essas moléculas buscam completar seus pares de elétrons, agindo, por isso, como agentes que recebem ou cedem elétrons (Halliwell e Gutteridge, 1989; Sanocka e Kurpysz, 2004). Em nível fisiológico, as ERO influenciam benéficamente nos processos relacionados à fertilidade, como a capacitação espermática, a fusão do espermatozoide com o oócito, entre outros (Kodama et al., 1996; Leclerc et al., 1997).

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, que vão incluir os radicais livres e espécies não radicalares. Quando o oxigênio em seu estado básico absorve energia, ele se transforma em uma espécie excitada eletronicamente conhecida como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é altamente reativo. Durante a redução unieletrônica do oxigênio para formar água, são gerados o radical superóxido (O_2^-), o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (Richard et al., 1991; Hasanoglu et al., 1994). O radical superóxido é um dos principais intermediários na formação de outras ERO, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, e sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. Apesar de abundante, é um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas (Winterbourn, 1995; Sies, 2015).

O radical hidroxila é considerado o radical mais reativo e agressivo dos sistemas biológicos, por reagir com praticamente todas as moléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos extensivos à célula. Ao reagir com os lipídios, o radical hidroxila inicia a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas, ou seja, a peroxidação lipídica (Winterbourn, 1995; Ferreira e Matsubara, 1997; Nordeberg e Arnér, 2001; Sies, 2015). Enquanto, o peróxido de hidrogênio apesar de não ser um radical livre, também é considerado nocivo pela sua participação na formação do radical hidroxila e por sua capacidade de atravessar membranas (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordeberg e Arnér, 2001).

O ataque dessas espécies reativas abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, e além de iniciar o processo de peroxidação lipídica, produz um novo radical lipídico, perpetuando a reação em cadeia. Esse processo pode se espalhar rapidamente, afetando várias moléculas e estruturas celulares, resultando em danos generalizados (Halliwell e Gutteridge, 1999). A peroxidação lipídica gera produtos como malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e ácidos graxos peroxidados, que podem modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo a função celular (Bayir e Kagan, 2008).

4.3 Peroxidação Lipídica e Estresse Oxidativo

A oxidação é definida como um processo no qual um átomo ou molécula perde elétrons, resultando em uma mudança na sua carga elétrica (Halliwell e Gutteridge, 1989). Devido à composição lipídica dos espermatozoides, as membranas espermáticas apresentam alta sensibilidade à peroxidação, ou seja, oxidação de seus lipídios, principalmente quando estressadas (Maxwell e Watson, 1996). Sendo assim, o estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio na quantidade de ERO e antioxidantes, podendo esse desequilíbrio ocorrer tanto por um aumento na produção de ERO, quanto por uma redução diminuição dos compostos antioxidantes presentes no meio (Lushchak e Storey, 2021).

A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque de um lipídio por qualquer ERO que tenha reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, e a reação apenas finaliza quando os radicais lipídicos e peroxila produzidos espalham-se até destruírem a si próprios. O radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora da peroxidação (Halliwell e Gutteridge, 1999; Ferreira e Matsubara, 1997). Em humanos, espermatozoides defeituosos apresentam níveis de peroxidação lipídica maior, do que quando comparados a espermatozoides funcionais, comprovando uma alteração morfológica consequente da lipoperoxidação (Aitken et al., 1996; Misro et al., 2004).

A peroxidação lipídica proveniente da reação com as ERO, causa modificações nas características das membranas biológicas, criando fendas iônicas que alteram sua permeabilidade, favorecendo o trânsito indiscriminado de metabolitos e outros compostos, provocando a lise celular (Josephy, 1997). A primeira indicação de que o estresse oxidativo pode impactar a viabilidade e a função dos espermatozoides foi observada em humanos, uma vez que espermatozoides incubados em altas concentrações de O₂, perdiam rapidamente sua motilidade (Halliwell e Gutteridge, 1999). Para alguns autores, a formação excessiva de ERO pode ser consequência da infertilidade (Aitken, 1995).

Os danos provocados pelo processo afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, diminuindo a capacidade fecundante do espermatozoide (Aitken, 1995; De Lamirande e Cagnon, 1999; Irvine et al., 2000). Em humanos, a geração de malonaldeído (um dos produtos

da peroxidação lipídica), foi negativamente correlacionada com diversos parâmetros da motilidade espermática, como porcentagem de células rápidas, velocidade média de trajeto e a habilidade do espermatozoide de passar pela fusão esperma-ovócito (Engel et al., 1999).

4.4. Antioxidantes

Antioxidantes são quaisquer substâncias capazes de neutralizar e/ou reduzir a oxidação de um substrato. O processo ocorre por meio da conversão de ERO em moléculas de água (Andrade et al., 2010). O plasma seminal contém diversos antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, que desempenham um papel crucial na proteção contra o estresse oxidativo. Entre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase/glutathione reductase (GSH), enquanto os antioxidantes não enzimáticos incluem ascorbato, urato, vitamina E, piruvato, glutathione, albumina, vitamina A, ubiquinol, taurina e hipotaurina (Agarwal et al., 2008).

Esses compostos ajudam a mitigar os efeitos das ERO, porém apesar de sua presença, a capacidade antioxidante do sêmen pode ser insuficiente para prevenir completamente a formação excessiva e os danos causados por essas espécies, principalmente em condições maiores de estresse. A sobrecarga de EROs pode comprometer a motilidade, integridade das membranas e a funcionalidade do DNA espermático, impactando a fertilidade (Sharma et al., 2016). Além dos compostos plasmáticos, as enzimas antioxidantes presentes no espermatozoide, podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida (Aitken, 1995).

No contexto da criopreservação, antioxidantes são essenciais para preservar a viabilidade dos espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento, devido ao maior estresse que as células são submetidas (Amidi et al., 2016). Como resultado, diversos estudos são realizados com a adição de antioxidantes ao meio diluente, uma vez que os antioxidantes endógenos não são capazes de suportar a superprodução de ERO causada pela criopreservação (Liu e Zeng, 2000). Apesar de todos os fatores benéficos dos antioxidantes, o excesso deste

também causa importantes alterações na qualidade espermática, uma vez que diversos processos fisiológicos reprodutivos dependem de ERO em níveis controlados, por isso, o estresse oxidativo é definido pelo desequilíbrio de ambas (Kodama et al., 1996).

4.5. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis encontrados em plantas, fungos, bactérias e algas, estando presentes em diversos alimentos, como frutas, vegetais e peixes (El-Agamey et al., 2004; Tapiero et al., 2004). Existem mais de 600 tipos de carotenoides, os quais são divididos em três classes principais: carotenos, xantofilas e licopeno (Jomova e Valko, 2013). Os dois principais grupos são os carotenos, compostos apenas por carbono e hidrogênio, e as xantofilas, que apresentam átomos de oxigênio em sua estrutura, sob a forma de grupos hidroxila, carbonila ou ambos — como ocorre com a astaxantina (ASTX) (Higuera-Ciapura et al., 2006).

As xantofilas, classificadas como carotenoides secundários, contribuem para a proteção celular contra os danos causados por excesso de luz, atuando como uma barreira protetora sobre as células. Em situações de estresse ambiental, como alta luminosidade ou escassez de nutrientes, microalgas intensificam a síntese desses compostos secundários (Gong e Bassi, 2016; Rammuni et al., 2018). Dentre as diversas propriedades atribuídas aos carotenoides, destacam-se a inibição de citocinas inflamatórias, a regulação da resposta imune, a atividade anticancerígena e a ação antioxidante (Boon e Soon, 2004; Krinsky e Johnson, 2005; Hussein et al., 2006).

No conjunto dos mecanismos de defesa antioxidante, os carotenoides desempenham um papel fundamental na neutralização do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e dos radicais peroxil. Além disso, atuam eficientemente na desativação de moléculas sensibilizadoras em estados eletronicamente excitados, que contribuem para a formação de radicais livres e oxigênio singlete (Truscott, 1990; Young e Lowe, 2001). A energia do oxigênio singlete é transferida para a molécula de carotenoide, resultando na formação de oxigênio em seu estado fundamental e de um carotenoide

excitado no estado triplete. Em vez de promover reações secundárias indesejadas, o carotenoide retorna ao seu estado fundamental dissipando sua energia por meio da interação com o solvente ao redor (Foote e Denny, 1968; Baltschun et al., 1997).

4.6 Astaxantina

A astaxantina (ASTX) é um pigmento carotenoide vermelho, lipossolúvel, comumente encontrado em algas, peixes e fungos. Apresenta capacidade de promover fotoproteção das membranas celulares e prevenir a peroxidação lipídica (Lim et al., 1992). A ASTX é o único carotenoide conhecido por atravessar a barreira hematoencefálica, além de possuir a maior capacidade antioxidante entre todos os carotenoides (Igielska-Kalwat et al., 2015; Fanaee-Danesh et al., 2019). Além disso, pode prevenir de forma eficaz os danos oxidativos em tecidos, órgãos, células e DNA humanos (Sztretye et al., 2019).

O mecanismo antioxidante da ASTX ocorre por meio da quebra da cadeia de peroxidação de fosfolipídios e da degradação de ERO, devido à sua estrutura molecular altamente conjugada, composta por 13 ligações duplas e anéis β -ionona contendo grupos hidroxila terminais (Li et al., 2020). A astaxantina neutraliza o oxigênio singlete através de um processo de transferência de energia. Nesse mecanismo, a energia do oxigênio singlete é transferida para a molécula de ASTX, que atinge o estado triplete excitado. Em seguida, retorna ao estado fundamental, dissipando a energia absorvida na forma de calor, sem sofrer degradação. Esse ciclo permite que a ASTX atue continuamente como antioxidante (Nielsen et al., 1998; Edge et al., 1999).

A estrutura química da ASTX apresenta dois carbonos localizados nas posições 3 e 3' dos anéis β -ionona, com um grupo hidroxila (-OH) em cada extremidade da molécula, além de um grupo ceto (C=O), como ilustrado na Figura 2 (Brotosudarmo et al., 2020). O potencial antioxidante da ASTX é descrito como sendo até 6.000 vezes maior que o da vitamina C e 550 vezes maior que o da vitamina E na eliminação do oxigênio singlete. A presença simultânea dos grupos hidroxila e ceto confere maior polaridade à molécula, permitindo que ela se insira através da bicamada fosfolipídica e atue tanto na região interna (lipofílica) quanto externa (hidrofílica) da membrana

(Figura 3), aumentando sua eficácia antioxidante (Nishida et al., 2022). Além disso, a ASTX apresenta capacidade de empacotamento das membranas fosfolipídicas e reduz a mobilidade da cadeia alquil em fase fluida, contribuindo para a estabilização estrutural das membranas celulares (Widomska et al., 2016).

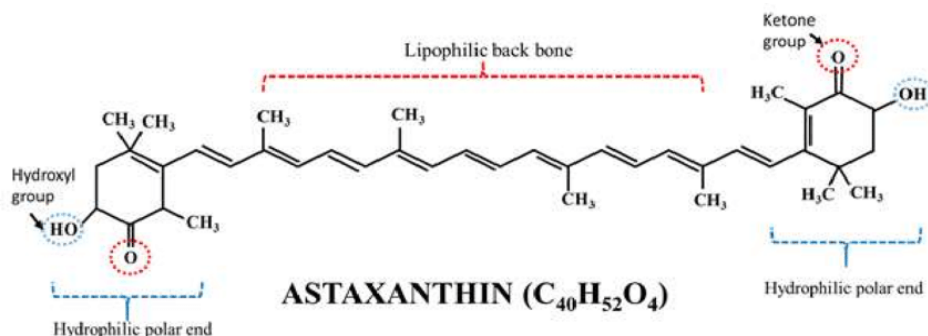


Figura 2. Estrutura química da Astaxantina, Fórmula molecular - $C_{40}H_{52}O_4$ (Higuera-Ciapara et al., 2006).

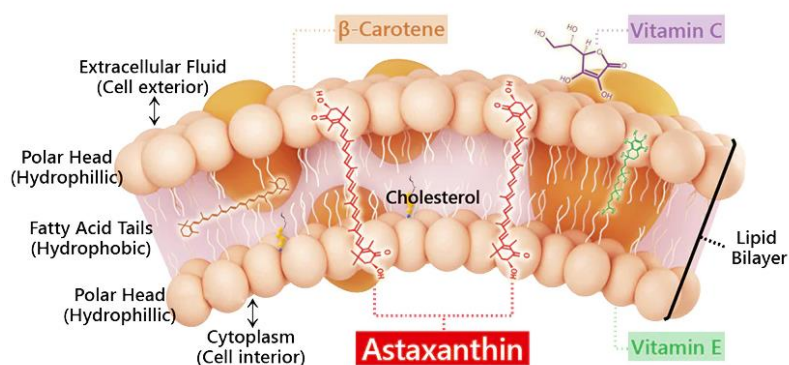


Figura 3. Mecanismo de ação da astaxantina na membrana interna (lipofílica) e externa (hidrofílica) (Patil et al., 2022).

4.6.1 Estudos com astaxantina na reprodução

Diversos estudos com suplementação dietética de ASTX em homens com problemas de fertilidade demonstraram efeitos benéficos da molécula, apontando melhorias significativas na motilidade total e progressiva dos espermatozoides, aumento na capacidade antioxidante total do fluido seminal e redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Aitken et al., 1996; Misro et al., 2004; Comhaire et al.,

2005; Salih et al., 2024). A suplementação de ASTX no diluente do sêmen de homens normozoospermicos também demonstrou efeitos positivos, como o aumento da motilidade espermática e a redução no número de espermatozoides descondensados (Dede e Saylan, 2022).

Em carneiros, Fang et al. (2015) demonstraram que o sêmen tratado com astaxantina em doses de 2 e 4 μM no diluidor para congelação apresentou maior integridade da membrana plasmática em comparação ao grupo controle. De forma semelhante, Abdi-Benemar et al. (2020), utilizando suplementação de ASTX no sêmen de carneiros, relataram aumento nas porcentagens de motilidade total e progressiva com doses de 2 e 4 μM , quando comparadas a doses menores e ao grupo controle. Para suínos, a concentração ideal identificada foi de 0,5 μM de ASTX, enquanto doses mais elevadas, como 15 μM , apresentaram efeito negativo sobre a cinética espermática (Basioura, 2020).

Em bovinos, até o momento, poucos estudos com ASTX adicionada ao diluidor de sêmen para criopreservação foram encontrados. Farzan et al. (2014), suplementando sêmen de touros da raça Holandesa com diluidor à base de lecitina, relataram maior motilidade progressiva com doses de 0,5 e 1 μM de ASTX. No entanto, os autores não realizaram análises relacionadas à integridade das membranas plasmática, acrossomal, mitocondrial, nem à peroxidação lipídica utilizando sondas fluorescentes. Em doses mais elevadas (2 μM), observaram que a ASTX não apenas deixou de apresentar efeitos benéficos às células, como também provocou danos espermáticos, demonstrando que seus efeitos são dependentes da concentração utilizada.

5. 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>.

AITKEN RJ, BUCKINGHAM DW, CARRERAS A, IRVINE DS. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radic Biol Med**, v.21, p.495504, 1996.

AITKEN RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.659-668, 1995.

AGARWAL A, DEEPINDER F, SHARMA RK, RANGA G, LI J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. **Fertil Steril**. 2008 Jan;89(1):124-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.01.166. Epub 2007 May 4. PMID: 17482179.

AMANN, PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion sperma-tozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145 -173, 1987

AMIDI, F., PAZHOHAN, A., SHABANI NASHTAEI. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank** 17, 745–756 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>

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.

BALTSCHUN, D., BEUTNER, S., BRIVIBA, K., MARTIN, H. D., PAUST, J., PETERS, M., STENHORST, F. (1997). Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids. **Liebigs Annalen**, 1997(9), 1887-1893.

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

BAUST JG, GAO D, BAUST JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. **Organogenesis**. 2009 Jul;5(3):90-6. doi: 10.4161/org.5.3.10021. PMID: 20046670; PMCID: PMC2781087.

BAYIR, H., & KAGAN, V. E. (2008). Peroxidation of lipids and the oxidative damage to cellular membranes. In **Free Radical Biology and Medicine** (pp. 387-409). Academic Press.

BOON P. CHEW, JEAN SOON PARK, Carotenoid Action on the Immune Response, **The Journal of Nutrition**, Volume 134, Issue 1, 2004, Pages 257S-261S, ISSN 0022-3166, <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.257S>.

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 jornal of animal reproduction** 35, 303-314.

BROTOSUDARMO, T. H. P.; LIMANTARA, L.; SETIYONO, E.; HERIYANTO. 2020. Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application. **International Journal of Food Science**, 2156582, 16 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2156582>

COMHAIRE FH, EL GAREM Y, MAHMOUD A, EERTMANS F, SCHOONJANS F. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. **Asian J Androl**. 2005 Sep;7(3):257-62. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00047.x. PMID: 16110353.

CURRY MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Methods Mol Biol**. 1995;38:189-97. doi: 10.1385/0-89603-296-5:189. PMID: 7647857.

DEDE, G., & SAYLAN, A. (2022). The effect of astaxanthin on human sperm parameters after cryopreservation. **Canadian Urological Association Journal**, 16(11), E552–7. <https://doi.org/10.5489/cuaj.7876>

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon C. **The male gamete**: from basic science to clinical application. Vienna, IL: Cache River Press. p.455- 467. 1999.

DE LEEUW FE, CHEN HC, COLENBRANDER B, VERKLEIJ AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**. 1990 Apr;27(2):171-83. doi: 10.1016/0011-2240(90)90009-s. PMID: 2331890.

EDGE R. AND GEORGE TRUSCOTT T., H. A. FRANK, A. J. YOUNG, G. BRITTON, AND R. J. COGDELL, Carotenoid Radicals and the Interaction of Carotenoids with Active Oxygen Species, The Photochemistry of Carotenoids, 1999, **Springer**, Dordrecht, 223–234, Advances in Photosynthesis and Respiration, https://doi.org/10.1007/0-306-48209-6_12.

EL-AGAMEY A, LOWE GM, MCGARVEY DJ, MORTENSEN A, PHILLIP DM, TRUSCOTT TG, YOUNG AJ. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch Biochem Biophys**. 2004 Oct 1;430(1):37-48. doi: 10.1016/j.abb.2004.03.007. PMID: 15325910.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.

FANAEE-DANESH, E.; GALI, C.C.; TADIC, J.; ZANDL-LANG, M.; CARMEN KOBER, A.; AGUJETAS, V.R.; DE DIOS, C.; TAM-AMERSDORFER, C.; STRACKE, A.; ALBRECHER, N.M.; et al. Astaxanthin exerts protective effects similar to bexarotene in Alzheimer's disease by modulating amyloid-beta and cholesterol homeostasis in blood-brain barrier endothelial cells. **Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis**. 2019, 1865, 2224–2245.

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.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FOOTE, C. S., & DENNY, R. W. (1968). Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by. beta.-carotene. **Journal of the American Chemical Society**, 90(22), 6233-6235.

GONG M, BASSI A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnol Adv.** 2016 Dec;34(8):1396-1412. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005. Epub 2016 Nov 2. PMID: 27816618.

GROTTER, 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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1989. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford, 22-85.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 936p.

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>.

HASANOGLU, E., ALTAN, N., SINDEL, S., ONGUN, C.O., BALI, M., ALTINTAS, E. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients. **General Pharmacology**, Oxford, v.25, n.1, p.107-110, 1994.

HIGUERA-CIAPARA, I. FÉLIX-VALENZUELA, L. GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Crit. **Rev. Food Sci Nutr.** 2006;46(2):185-96

HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, MATSUMOTO K, WATANABE H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **J Nat Prod.** 2006 Mar;69(3):443-9. doi: 10.1021/np050354+. PMID: 16562856.

IGIELSKA-KALWAT, J.; GOSCIANSKA, J.; NOWAK, I. Carotenoids as natural antioxidants. **Postepy Hig. Med. Dosw.** (Online) 2015, 69, 418–428

IRVINE DS, TWIGG JP, GORDON EL, FULTON N, MILNE PA, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **J Androl.** 2000 Jan-Feb;21(1):33-44. PMID: 10670517.

JOMOVA K, VALKO M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **Eur J Med Chem.** 2013;70:102-10. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.054. Epub 2013 Oct 6. PMID: 24141200.

JOSEPHY, P. D. 1997. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. **Molecular Toxicology.** Oxford University Press, New York, 1997.

KODAMA, H., KURIBAYASHI, Y., CAGNON, C., 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology** 17, 2.

KOKUBU D, Ooba R, ABE Y, ISHIZAKI H, YOSHIDA S, ASANO A, KASHIWABARA SI, MIYAZAKI H. Angelica keiskei (Ashitaba) powder and its functional compound xanthoangelol prevent heat stress-induced impairment in sperm density and quality in mouse testes. **J Reprod Dev.** 2019 Apr 12;65(2):139-146. doi: 10.1262/jrd.2018-141. Epub 2019 Jan 26. PMID: 30686791; PMCID: PMC6473112.

KRINSKY NI, JOHNSON EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol Aspects Med.** 2005 Dec;26(6):459-516. doi: 10.1016/j.mam.2005.10.001. Epub 2005 Nov 23. PMID: 16309738.

LANGLAIS L, ROBERTS KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrossome reaction of mammalian spermatozoa. **Gam Res**, v.12, p.183-224, 1985.

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.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. São Paulo: **Sarvier**, 2000. 552 – 557 p.

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., TERAOKA, 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).

LIU, J., & ZENG, S. M. (2000). "The role of antioxidants in cryopreservation of mammalian spermatozoa." **Theriogenology**, 53(7), 1423-1430.

LUSHCHAK, VLADIMIR I.; LUSHCHAK, TETYANA V. Oxidative stress concept updated: definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. **Biomolecules**, Basel, v. 11, n. 9, p. 1295, 2021.

MAXWELL, W. M. C., WATSON, P. F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. **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).

MISRO MM, CHOUDHURY L, UPRETI K, GAUTAM D, CHAKI SP, MAHAJAN AS, BABBAR R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. **Int J Androl**, v.27, p.82-87, 2004

NIELSEN B. R., JØRGENSEN K., AND SKIBSTED L. H., Triplet—triplet extinction coefficients, rate constants of triplet decay and rate constant of anthracene triplet sensitization by laser flash photolysis of astaxanthin, β -carotene, canthaxanthin and zeaxanthin in deaerated toluene at 298 K, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. (1998) 112, no. 2-3, 127–133, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(97\)00285-2](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(97)00285-2), 2-s2.0-0032583663.

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.

NORDBERG, J. & ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

PANINTINGJATI, LIMANTARA, LEENAWATY, SETIYONO, EDI, HERIYANTO, Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application, **International Journal of Food Science**, 2020, 2156582, 16 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2156582>

PATIL AD, KASABE PJ, DANDGE PB. Pharmaceutical and nutraceutical potential of natural bioactive pigment: astaxanthin. **Nat Prod Bioprospect**. 2022 Jul 7;12(1):25. doi: 10.1007/s13659-022-00347-y. PMID: 35794254; PMCID: PMC9259778.

PARKS JE, GRAHAM JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**. 1992 Aug;38(2):209-22. doi: 10.1016/0093-691x(92)90231-f. PMID: 16727131.

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

Rammuni MN, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Attalage RA. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. **Food Chem**. 2019 Mar 30;277:128-134. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.066. Epub 2018 Oct 13. PMID: 30502128.

RICHARD, M.J., ARNAUD, J., JURKOVITZ, C., HACHACHE, T., MEFTAH, H., LAPORTE, F., FORET, M., FAVIER, A., CORDONNIER, D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron*, Basel, v.57, n. 1, p.10-15, 1991.

SALIH AM, JABARPOUR M, SEDIGHI GILANI MA, SAJADI H, SAEDI MARGHMALEKI M, SHABANI NASHTAEI M, SALEM M, AMIDI F. The effect of astaxanthin after varicocele surgery on antioxidant status and semen quality in infertile men: A triple-blind randomized clinical trial. **Food Sci Nutr**. 2024 Aug 19;12(10):7977-7988. doi: 10.1002/fsn3.4365. PMID: 39479675; PMCID: PMC11521721.

SANOCCA, D., KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod Biol Endocrinol**, 2004 Mar 23;2:12. doi: 10.1186/1477-7827-2-12. PMID: 15038829; PMCID: PMC400757.

SCOTT TW. Lipid metabolism of spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.18, p.65-76, 1973.

SHARMA R, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, p.835-850,1996.

SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**. 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25588755; PMCID: PMC4309861.

SZTRETNYE, M.; DIENES, B.; GONCZI, M.; CZIRJAK, T.; CSERNOCH, L.; DUX, L.; SZENTESI, P.; KELLER-PINTER, A. Astaxanthin: A Potential Mitochondrial-Targeted Antioxidant Treatment in Diseases and with Aging. **Oxidative Med. Cell. Longev**. 2019, 2019, 3849692.

TAPIERO H, TOWNSEND DM, TEW KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomed Pharmacother**. 2004 Mar;58(2):100-10. doi: 10.1016/j.biopha.2003.12.006. PMID: 14992791; PMCID: PMC6361147.

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>.

TRUSCOTT, T. G. (1990). The photophysics and photochemistry of the carotenoids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 6(4), 359-371

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

WANG, A., ZHANG, H., IKEMOTO, I., ANDERSON, D., LOUGHLIN, K., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation, **Urology**, Volume 49, Issue 6, 921 - 925

WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci.** 2000 Jul 2;60-61:481-92. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3. PMID: 10844218.

WIDOMSKA J, ZAREBA M, SUBCZYNSKI WK. Can Xanthophyll-Membrane Interactions Explain Their Selective Presence in the Retina and Brain? **Foods.** 2016 Mar;5(1):7. doi: 10.3390/foods5010007. Epub 2016 Jan 12. PMID: 27030822; PMCID: PMC4809277.

WINTERBOURN, C. C. Toxicology of oxygen radicals. In: LUNEC, J. (Ed.). Toxicology of oxygen species. Dordrecht: **Springer**, 1995. p. 15-35.

YOUNG, A. J., & LOWE, G. L. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Biochemistry and Biophysics**, 385(1), 20-27.

Capítulo II – Artigo Científico

CAPÍTULO 2 – DILUENTE CONTENDO ASTAXANTINA MELHORA QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO EM TOUROS DE CORTE

Laura Fernanda Sechirolli Silva^a, Marcelo Sant’Ana Borges^a, Leticia Padovani Silva^a, Marina Oliveira Silva^a, Joice Maria Bazerla Andreta^a, Camila de Paula Freitas Dell’Aqua^b, Fabiana Ferreira de Souza^b, Frederico Ozanam Papa^b, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante^{a,c}, Lindsay Unno Gimenes^a, Fabio Morato Monterio^{a,c}

^aSão Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil (laura.fernanda@unesp.br), (ms.borges@unesp.br), (leticia.padovani@unesp.br), (marina-oliveira.silva@unesp.br), (joyce.andreta@unesp.br), (mez.mercadante@unesp.br), (lindsay.gimenes@unesp.br), (fabio.morato@unesp.br)

^bSão Paulo State University (Unesp), School of of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil (camila.freitas-dellaqua@unesp.br), (fabiana.f.souza@unesp.br), (frederico.papa@unesp.br).

^cInstitute of Animal Science – Advanced Beef Cattle Center (IZ CAPD), Sertãozinho, São Paulo, Brazil (fabio.monteiro@sp.gov.br)

RESUMO

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 μ mol (ASTX1) ou 2 μ mol (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

1. Introdução

A compreensão da fisiologia da célula espermática e dos princípios de criopreservação, são necessários para o sucesso da aplicação da biotécnica. A congelação das células leva a quiescência e redução metabólica, diminuindo o consumo energético e a produção de catabólitos (Hammerstedt; Graham; Nolan; 1990). A membrana plasmática dos espermatozoides, rica em lipídios, proteínas e colesterol, sofre transição da fase líquida para gel durante a congelação, aumentando sua rigidez e vulnerabilidade à peroxidação (Lehninger et al., 2000; Purdy; Graham, 2004; Borges et al., 2011).

Essa mudança também afeta a membrana mitocondrial, elevando a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (Wang et al., 1997), que em condições fisiológicas contribuem positivamente nos processos fisiológicos relacionados à fertilidade, como a fusão do espermatozoide e oócito, capacitação espermática e outros (Kodama; Kuribayashi; Cagnon, 1996; Leclerc; Lamirande; Cagnon, 1997;

Valença; Guerra, 2007), mas em excesso causam estresse oxidativo (Halliwell; Gutteridge, 1989; Sanocka; Kurpysz, 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; Matsubara, 1997). A peroxidação lipídica compromete a função celular ao modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Bayir; Kagan, 2008), além de causar alterações na morfologia espermática, perda da motilidade de forma irreversível, inibição da respiração, lesões ao DNA espermático, perda de enzimas intracelulares, interferindo na sua capacidade fecundante, e portando levando a perda da 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, em condições de estresse como na criopreservação, os antioxidantes endógenos não são suficientes, sendo necessária a suplementação no meio diluente (Liu; Zeng, 2000; Amidi et al., 2016). A astaxantina, presente em algas e peixes, possui a mais alta capacidade antioxidante entre os carotenoides e atravessa a barreira hematoencefálica (Igielska-Kalwat; Goscianska; Nowak, 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 contínua (Nielsen; Jorgensen; Skibsted, 1998). Sua estrutura química, com grupos hidroxila e ceto, permite interação tanto com a parte lipofílica quanto hidrofílica da membrana, aumentando sua eficácia (Brotosudarmo; Limantara; Heriyanto, 2020; Nishida et al., 2022).

Considerando o potencial antioxidante da ASTX, doses de 2 a 4 μM foram adicionadas ao diluidor do sêmen de carneiros, demonstrando aumento da 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 doses maiores prejudicaram a cinética dos espermatozoides (Basioura, 2020). A suplementação de ASTX no diluente do sêmen de homens normozoospermicos, demonstrou que o antioxidante afeta positivamente a motilidade do espermatozoide e reduz o número de espermatozoides descondensado (Dede; Saylan; 2022).

Em bovinos, até o momento apenas um estudo acrescentou a ASTX μmol ao diluente a base de lecitina para criopreservação de espermatozoides de bovinos de leite (Farzan et al., 2014). Os autores observaram melhora significativa na motilidade progressiva dos espermatozoides nas concentrações de 0,5 e 1 μmol de ASTX, em comparação com a concentração de 2 μmol e o grupo controle, sugerindo um efeito benéfico dependente da concentração.

Diante da escassez de trabalhos na literatura sobre a utilização da ASTX como antioxidante na reprodução de bovinos de corte e seu potencial para aumentar a qualidade espermática pós-descongelamento, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de duas concentrações de ASTX a um meio diluente comercial à base de gema de ovo na criopreservação do sêmen de bovinos de corte.

2. Material e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e obtidos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Merck KGaA® (Darmstadt,

Alemanha) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, São Paulo, Brasil), quando não foram citados.

2.2 Aspectos éticos

O estudo foi conduzido de acordo com os preceitos éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Zootecnia (Protocolo nº 387-2023 - CEUA/IZ).

2.3 Animais e coleta sêmen

O experimento foi conduzido na região sudeste do Brasil, situada a 21°10'37" de latitude sul e 48°05'40" de longitude oeste. Foram utilizados 12 touros da raça Nelore (*Bos indicus indicus*), com idade de $33,2 \pm 3,5$ meses e peso corporal de $741,5 \pm 33,75$ kg. Os animais foram mantidos durante o experimento em pastagem de capim *Brachiaria brizantha*, com acesso *ad libitum* a silagem, sal mineral e água. Todos os animais do estudo foram submetidos a controle rigoroso de endoparasitas e ectoparasitas, antes e durante o período experimental.

Foram obtidos quatro ejaculados de cada touro com o eletroejaculador (Autojac®, Neovet®, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) no modo manual, totalizando 48 ejaculados. Os intervalos entre as coletas foram de sete dias.

2.4 Avaliação do sêmen

2.4.1. Pré-criopreservação

Os ejaculados foram avaliados, previamente a criopreservação, quanto a cinética (IVOS, versão 14, Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, USA) e a concentração espermática (Fotômetro SDM 1, Minitube®, Tiefenbach, Alemanha). Para cinética espermática foi avaliado 10 µL na câmara de Makler (Makler Counting ChamberR, Sefi-Medical Instruments Ltda®, Haifa, Israel) e avaliada motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos cruzados (BCF, Hz), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e rapidez (RAP, %). O setup utilizado foi temperatura de 38 °C, número de quadros (30), contraste mínimo (60 pixels), tamanho mínimo da célula (6 pixels), retidão (70%), velocidade de corte média do trajeto (30 µm/s), velocidade do trajeto médio mínimo (40 µm/s), corte de velocidade em linha reta (20 µm/s), intensidade da cabeça não-móvel (90), tamanho da cabeça não-móvel (5 pixels) e ampliação (X 1,95). Foram avaliados 5 campos aleatórios e, no mínimo, 150 150 células por campo.

Uma alíquota foi fixada em formol-salina 4% previamente aquecido a 37°C para a avaliação da morfologia espermática em microscópio de contraste de interferência diferencial de fase (Eclipse Ni-U, Nikon®, Tóquio, Japão). Foram avaliadas 200 células e as alterações morfológicas foram agrupadas em defeitos maiores, menores e totais (CBRA, 2013).

2.4.2. Pós-criopreservação

Após a descongelação, as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática, utilizando o mesmo equipamento e *setup*, a integridade da membrana

plasmática e do acrossomo, potencial de membrana mitocondrial, peroxidação lipídica e estresse oxidativo pelo TBARS induzido - (espermatozoides) e espontâneo (plasma seminal). A integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo (peroxidação lipídica) foram também avaliadas após estresse induzido (teste de termorresistência rápido – TTR - 46°C por 30 minutos).

A análise das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e estresse oxidativo foram realizadas por citometria de fluxo, 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). A taxa de aquisição foi de 800 eventos por segundo e no mínimo 10.000 células foram analisadas por amostra. Os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1 (Becton Dickinson®, Mountain View, CA, USA).

Todas amostras foram diluídas em TALP-PVA, conforme protocolo de Parrish et al., (1988) modificado (100 mmol NaCl, 3,1 mmol KCl, 25,0 mmol NaHCO₃, 0,3 mmol NaH₂PO₄, 21,6 mmol DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mmol CaCl₂, 0,4 mmol MgCl₂, 10,0 mmol Hepes-livre de ácido, 1,0 mmol piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5 x 10⁶ espermatozoide/mL, acrescido de Hoescht 33342 (7 µmol; 145333, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) para identificação das células.

A integridade da membrana plasmática e do acrossomo foi avaliada utilizando uma associação de iodeto de propídio (P-4170, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e FITC-PSA (L-0770, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) de acordo com Freitas-Dell'Acqua et al. (2012). Uma alíquota de 200 µL de sêmen diluído com TALP-PVA foi acrescido de 1,5 µmol de iodeto de propídeo e 2 ng de FITC-PSA. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a 37 °C no escuro.

Para avaliar o potencial da membrana mitocondrial, a desestabilização da membrana plasmática e a produção de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de YOPRO (YP; Y3603; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), *MitoStatus Red* (MST; potencial mitocondrial) e *MitoSOX™ Red* (MSR; M36008; 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 µmol de MST e 2 µmol de MSR, seguido por incubação a 37°C por 20 min.

Para análise da 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 µmol de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes e centrifugadas a 300g por 5 min, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 µL de TALP-PVA. Os resultados foram expressos como percentagem de células coradas com C11-BODYPI.

Para o teste de termorresistência as amostras foram descongeladas nas palhetas a 37°C por 30 segundos incubadas a 46 °C por 30 minutos. Após o período

de incubação as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica.

O estresse oxidativo das células espermáticas foi avaliado pelo TBARS induzido. Após a descongelação das palhetas a 37°C por 30 segundos, uma alíquota de 200 µL foi acrescida de 1 mL de solução salina de fosfatos (PBS) pH 7,2 e centrifugada a 800xg por 10 minutos. O processo foi repetido duas vezes para retirada do diluente. Após a última lavagem, o pellet foi acrescido de 50 µL 4 mmol de sulfato de ferro e 50 µL 10 mmol de ascorbato. As amostras foram incubadas a 37°C por 90 minutos com as tampas dos tubos abertos. Após a incubação foi adicionado 600 µL de ácido tricloroacético TCA 10% gelado. As amostras foram centrifugadas a 15.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet acrescido de 800 µL de ácido tiobarbitúrico TBA 1% em 50 mmol de NaOH. As amostras foram incubadas a 95°C por 15 minutos com os tubos fechados e, então, colocadas em banho de gelo para interromper a reação. A leitura foi conduzida em espectrofotômetro usando cubetas de 750 µL (NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer; ThermoFisher Scientific; Waltham, Massachusetts) a 532 nm. Os resultados foram comparados a curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de malondialdeído.

Para análise do estresse oxidativo espontâneo do plasma seminal, uma alíquota do ejaculado foi centrifugada a 800xg por 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado e congelado a -80°C. Para análise, as amostras foram descongeladas e recentrifugadas a 10.000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi acrescido de 400 µL de TBA 1% e as amostras incubadas a 95 °C por 15 minutos.

Após a incubação, as amostras foram colocadas em banho de gelo para cessar a reação e então lidas, da mesma maneira, em espectrofotômetro.

2.5 Congelação do sêmen

Para a preparação dos diluentes, foi utilizado um meio comercial (BotuBov[®], Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) composto por açúcares, aminoácidos, tampões, surfactante (*Orvus Es Paste* – OEP), gema de ovo e 7% de glicerol.

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado no experimento como um solvente, em virtude da astaxantina apresentar característica lipossolúvel. Carrear (2022), demonstrou que o DMSO adicionado ao diluidor a base de gema ovo, não possui propriedades protetoras antioxidantes, realizando um grupo controle apenas com DMSO. As doses foram definidas com base em um estudo piloto.

Após a avaliação inicial, os ejaculados foram divididos em três grupos: controle (CONTR: diluente comercial sem suplementação de ASTX), ASTX1 (diluente suplementado com 1 μmol ASTX) e ASTX2 (diluente suplementado com 2 μmol ASTX). A concentração final utilizada foi de 50×10^6 espermatozoides/mL.

Após a suplementação dos grupos, as amostras foram mantidas em repouso por 10 minutos, permitindo a interação da astaxantina com o diluente. Em seguida, foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV[®] Technologies, Campinas, Brasil), identificadas e submetidas ao processo de criopreservação em uma máquina automática (TK 3000[®], TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil).

O período de equilíbrio (refrigeração) e congelação seguiram os recomendados por Campanholi et al. (2017). A máquina foi pré-ajustada para uma curva de refrigeração de $-0,25$ °C/minuto, de 25°C a 5 °C. Após atingir 5°C, as amostras foram

mantidas por 4 horas. Em seguida, foi programada uma curva de congelação de -15°C/minuto, partindo de 5°C até -80°C. Após atingir esta temperatura, a taxa foi ajustada para -20°C/min, até -140°C, quando então as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196 °C). As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos.

2.6 Análise estatística

As análises foram realizadas no software Statistical Analysis System – SAS (9.4 version, Inc., Cary, NC, USA). Foi utilizado o procedimento GLIMMIX para a análise de variância das características seminais. Para a análise das variáveis do sêmen *in natura* o modelo foi ajustado como efeitos fixos TRATAMENTO (CONTR, ASTX1, ASTX2), COLETA ($j = 1, \dots, 4$) e interação TRATAMENTO x COLETA. O efeito individual do touro foi analisado como efeito aleatório no modelo. Para as variáveis após a descongelação e pós-TTR, além do modelo descrito acima, foi considerado, o MOMENTO DA AVALIAÇÃO (descongelado, pós-TTR) e as possíveis interações. Os resultados submetidos à análise de variância foram considerados como medidas repetidas aninhadas. A variância residual foi modelada considerando a melhor estrutura de (co)variâncias de acordo com o critério de informação de Akaike. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos (“LSMEANS”) e comparadas, quando necessário, pela probabilidade da diferença (“PDIFF”). A significância estatística foi declarada quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Os resultados de motilidade total, espermatozoides rápidos, amplitude de deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimentos cruzados, progressividade e linearidade do sêmen pós-descongelação e TTR variaram entre os grupos. A cinética espermática foi superior, em ambos os momentos (pós-descongelação e TTR), no grupo ASTX2 para diversas variáveis ($P < 0,05$, Tabela 1).

As variáveis avaliadas pela citometria de fluxo (Tabela 2) apresentaram resultados similares entre os grupos CONTR, ASTX1 e ASTX2, com exceção da peroxidação lipídica.

O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzido (espermatozoides descongelados) e espontâneo (plasma seminal fresco) não apresentou diferença entre os tratamentos, coletas e a interação tratamento e coleta.

4. Discussão

Para minimizar as lesões decorrentes do processo de criopreservação, são necessárias estratégias visando alta qualidade e potencial para fertilização dos espermatozoides descongelados. Este estudo demonstrou que a suplementação de diferentes concentrações de ASTX ao meio diluente melhora a qualidade do sêmen bovino, principalmente ao melhorar as variáveis de cinética espermática e a redução da peroxidação lipídica.

A principal função do espermatozoide é transmitir o material genético masculino ao oócito durante a fertilização. Para que essa transferência seja bem-sucedida, o espermatozoide deve percorrer o trato reprodutor feminino até atingir o local da fecundação, necessitando de motilidade adequada, integridade da membrana celular e preservação do material genético (Zhou et. al., 2016). A criopreservação pode

causar alterações na fisiologia e morfologia da célula espermática pós-descongelada, inibindo ou diminuindo a motilidade dos espermatozoides pela redução das fontes de energia necessárias devido a peroxidação lipídica (Khan et. al., 2021).

A avaliação da cinética espermática do sêmen pós-descongelação suplementado com 1 μmol de ASTX, demonstrou melhora das características cinéticas do sêmen. A ASTX possui em sua fórmula química ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por seu alto potencial antioxidante, doando elétrons que reagem com radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis, bloqueando a produção excessiva de ROS. Acreditamos que devido a ação protetiva da ASTX, houve manutenção das fontes energéticas das células e consequente aumento da cinética espermática (Donoso et. al., 2021; Yamashita, 2015).

Concentrações menores de ASTX no diluente tem mostrado efeitos protetores para as células espermáticas, como em nosso estudo, já que em suínos concentrações de até 15 μmol reduziram a motilidade e viabilidade espermática (Basioura et al., 2020), indicando concentração-efeito dependente do produto. Apesar disso, 1 μmol de ASTX esteve associado à maior frequência de batimentos cruzados da cauda, além de aumentar a progressividade e a linearidade do sêmen descongelado, em comparação ao grupo controle. Desta maneira, acreditamos que a ASTX foi capaz de reduzir a produção excessiva de ROS, contudo a necessidade e a concentração de antioxidantes são variáveis e dependentes do nível de estresse que a célula precisará suportar (Miller et al., 1993).

A ASTX é capaz de capturar radicais livres tanto na superfície quanto no interior da membrana fosfolipídica, proporcionando uma proteção completa à célula. Para avaliar este mecanismo de ação, foi utilizado o TTR para induzir o estresse celular e

testar o potencial do antioxidante, já que esse teste é comumente empregado para prever, *in vitro*, a capacidade de sobrevivência e manutenção do potencial antioxidante no trato reprodutor feminino (Kumar 2014; Oliveira et. al., 2013; Marqui et. al., 2023). Após o estresse, a motilidade total foi superior nos tratamentos em comparação ao CONTR, sugerindo o efeito antioxidante da astaxantina como descrito em outros estudos (Donoso et. al., 2021; Lakey-Beitia et. al., 2019; Nguyen, 2013). A progressividade e linearidade, ao contrário do que foi observado no sêmen pós-descongelamento, não apresentaram diferenças entre o grupo controle e a concentração 1 μmol , o que indica que, sob maior estresse, o sêmen suplementado com 1 μmol ASTX manteve a linearidade e progressividade do grupo controle, porém com maior motilidade total. Por outro lado, a maior concentração de ASTX (2 μmol), apresentou porcentagens menores em relação ao grupo controle, o que demonstra que, embora a capacidade antioxidante das células serem reduzidas durante o processo de criopreservação, é necessário um equilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas ao oxigênio (Aitken, 2020; Pandey et. al., 2024).

O aumento na produção de radicais livres afeta o equilíbrio redox das células espermáticas, causando oxidação das biomoléculas, principalmente de lipídios (Halliwell & Whiteman, 2004; Pandey et. al., 2024). A menor peroxidação lipídica encontrada na citometria de fluxo na concentração de 1 μmol ASTX, pode justificar a maior motilidade total e rapidez encontrada na cinética espermática, uma vez que os lipídeos das células espermáticas são importantes para motilidade e fluidez celular. Além disso, estudos demonstraram que a peroxidação lipídica é negativamente correlacionada com a fertilidade touros (Borges et al., 2011; Kasimanickan et. al., 2007; Tran et. al., 2017).

Embora ERO sejam geradas por várias organelas, a principal fonte de produção nos mamíferos são as mitocôndrias (Di Meo et. al., 2016). A avaliação da lesão das membranas plasmática e acrossomal, como o potencial mitocondrial não foram diferentes entre os tratamentos no sêmen de bovinos. Para ovinos a suplementação de ASTX no diluente demonstrou maior integridade de membrana plasmática, porém não teve diferença com a integridade de membrana acrossomal (Fang et al., 2015). Os autores ainda demonstram que para ovinos, a ASTX não apresentou diferença na cinética espermática, diferente do encontrado para bovinos neste estudo

O TBARS é um método utilizado para avaliar a peroxidação lipídica, quantificando indiretamente o ânion hidróxido a partir da reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de peroxidação (Ohkawa; Ohishi; Yagi; 1979). A forma mais reativa do oxigênio ao organismo é o oxigênio singlete (1O_2), no qual os carotenoides exercem sua ação antioxidante ao neutralizar o oxigênio e eliminar radicais livres, interrompendo as reações em cadeia, (Barreiros; David; David, 2006). Neste estudo, a peroxidação lipídica, avaliada por TBARS, não apresentou diferenças entre os grupos, provavelmente porque o método avalia o ânion hidróxido, enquanto a principal atividade antioxidante da ASTX é direcionada ao oxigênio singlete.

Também a avaliação do plasma seminal no TBARS não apresentou diferença entre os touros. Assim como alguns componentes do plasma seminal influenciam positivamente a criotolerância da célula espermática, outros influenciam negativamente. A composição do plasma é afetada pela genética e alimentação dos animais (Pessoa et. al., 2023). Neste experimento, todos os touros possuíam a mesma linhagem e manejos alimentares, justificando quantidades semelhantes na peroxidação lipídica do plasma seminal.

A suplementação de ASTX no diluente de sêmen bovino foi mencionada em um estudo que observou maior motilidade progressiva nas amostras tratadas com 0,5 e 1 μmol , embora o diluente tenha sido composto por lecitina de soja e touros estudados fossem da raça holandeses (Farzan et. al., 2014). Estudos sugerem que as necessidades nutricionais e a resposta ao estresse oxidativo podem variar significativamente entre as raças de corte e leite (Abeyta et. al., 2023).

Concluimos que os efeitos da adição de ASTX ao diluente comercial à base de gema de ovo são dependentes da concentração. Em concentrações mais baixas, a ASTX exerce efeitos antioxidantes, promovendo maior motilidade total e rapidez das células espermáticas. No entanto, em concentrações mais altas, foi observado um efeito paradoxal. Neste estudo, a concentração de 1 μmol ASTX apresenta os melhores resultados para criopreservação de sêmen bovino.

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: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: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 tom ice by reaulating 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 activiy 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>.

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 sêmen. **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.

Table 1. Mean $\pm$ standard error of the thawed sperm kinetic variables and rapid thermal resistance test (TRT) of the CONTR, ASTX1 and ASTX2 groups.

Variables	Thawed sperm			TRT			P value				
	CONTR	ASTX1	ASTX2	CONTR	ASTX1	ASTX2	TREATME NT	COLLECTI ON	MOMENT	TREAT *MOM	TREAT*COL
TM (%)	52.2 $\pm$ 3.3 ^B	58.3 $\pm$ 3.3 ^A	57.9 $\pm$ 3.3 ^{AB}	42.6 $\pm$ 3.3 ^B	48.3 $\pm$ 3.3 ^A	48.0 $\pm$ 3.3 ^{AB}	0.0041	0.735	0.0015	0.9940	0.4895
PM (%)	38.7 $\pm$ 2.6	42.1 $\pm$ 2.3	41.4 $\pm$ 2.2	33.5 $\pm$ 2.7	36.7 $\pm$ 2.2	36.6 $\pm$ 3.0	0.0654	0.9376	0.0004	0.9713	0.9026
RAP (%)	42.4 $\pm$ 3.0 ^B	46.8 $\pm$ 2.7 ^A	45.9 $\pm$ 2.5 ^A	35.9 $\pm$ 2.9 ^B	39.7 $\pm$ 2.8 ^A	40.2 $\pm$ 3.4 ^A	0.0308	0.8961	<0.0001	0.9139	0.8029
VAP (μ m/s)	71.7 $\pm$ 1.5	73.4 $\pm$ 1.6	71.8 $\pm$ 1.6	67.5 $\pm$ 1.5	68.5 $\pm$ 1.5	67.8 $\pm$ 1.6	0.1119	0.7911	0.0028	0.8371	0.2288
VSL (μ m/s)	62.0 $\pm$ 1.3	62.5 $\pm$ 1.3	61.0 $\pm$ 1.4	59.3 $\pm$ 1.2	59.8 $\pm$ 1.2	58.6 $\pm$ 1.4	0.1334	0.439	0.0429	0.9805	0.3432
VCL (μ m/s)	109.6 $\pm$ 2.7	114.31 $\pm$ 2.9	111.9 $\pm$ 2.8	101.7 $\pm$ 2.7	103.3 $\pm$ 2.9	103.11 $\pm$ 2.6	0.0599	0.9232	<0.0001	0.4065	0.3969
ALH (μ m)	4.6 $\pm$ 0.1 ^B	4.9 $\pm$ 0.1 ^A	4.9 $\pm$ 0.1 ^A	4.3 $\pm$ 0.1 ^B	4.4 $\pm$ 0.1 ^B	4.5 $\pm$ 0.1 ^A	0.001	0.8178	<0.0001	0.0582	0.4025
BCF (Hz)	30.5 $\pm$ 0.6 ^A	30.3 $\pm$ 0.5 ^A	29.3 $\pm$ 0.5 ^B	29.8 $\pm$ 0.6 ^A	30.29 $\pm$ 0.6 ^A	28.9 $\pm$ 0.6 ^B	0.0073	0.6703	0.2079	0.6589	0.3129
STR (%)	84.7 $\pm$ 0.6 ^A	83.5 $\pm$ 0.6 ^{AB}	83.4 $\pm$ 0.6 ^B	86.6 $\pm$ 0.6 ^A	85.6 $\pm$ 0.6 ^{AB}	84.7 $\pm$ 0.6 ^B	0.0034	0.0325	0.0042	0.5913	0.6002
LIN (%)	58.4 $\pm$ 0.7 ^A	56.2 $\pm$ 0.9 ^B	56.5 $\pm$ 0.8 ^B	60.2 $\pm$ 0.8 ^A	59.6 $\pm$ 0.8 ^{AB}	58.1 $\pm$ 1.0 ^B	0.0046	0.2163	0.0002	0.2734	0.9111

^{AB}Different letters indicate significative differences ($P < 0.05$, highlighted in bold) among the treatment groups (CONTR, ASTX1, ASTX2) of the thawed samples and rapid thermal resistance test (TRT). Total motility (TM), Progressive motility (PM), Rapid sperm (RAP), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), head displacement frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN).

Table 2. Mean $\pm$ standard error of the post-thawed sperm characteristics of the CONTR, ASTX1 and ASTX2 groups assessed by flow cytometry.

Variables	Thawed sperm			TRT			P value				
	CONTR	ASTX1	ASTX2	CONTR	ASTX1	ASTX2	TREATME	COLLECTI	MOME	TREAT*MO	TREAT*
							NT	ON	NT	ME	COLLE
IPAM (%)	14.9 $\pm$ 1.3	15.8 $\pm$ 1.3	15.3 $\pm$ 1.3	18.7 $\pm$ 1.3	15.9 $\pm$ 1.3	16.7 $\pm$ 1.3	0.5704	0.5830	0.0153	0.1210	0.3373
MPE (%)	40.7 $\pm$ 2.0	40.1 $\pm$ 2.1	38.3 $\pm$ 2.1	34.2 $\pm$ 2.0	34.6 $\pm$ 2.1	33.4 $\pm$ 2.1	0.2653	0.9148	<0.0001	0.7511	0.3601
HMP (%)	52.3 $\pm$ 1.9	51.6 $\pm$ 1.9	50.3 $\pm$ 1.9	44.5 $\pm$ 1.9	45.3 $\pm$ 1.9	44.2 $\pm$ 1.9	0.5477	0.9679	<0.0001	0.7507	0.8356
ASM (%)	52.9 $\pm$ 2.2	54.1 $\pm$ 2.2	55.1 $\pm$ 2.2	62.4 $\pm$ 2.2	62.0 $\pm$ 2.2	62.8 $\pm$ 2.2	0.5797	0.9415	<0.0001	0.7329	0.7922
CELLS_SO	293.9 $\pm$ 45.7	316.8 $\pm$ 46.2	318.3 $\pm$ 46.2	372.9 $\pm$ 45.7	305.8 $\pm$ 46.2	296.4 $\pm$ 46.2	0.7657	0.4864	0.6237	0.3514	0.8384
HPM_SO	286.3 $\pm$ 33.5	305.5 $\pm$ 33.8	286.8 $\pm$ 33.8	222.2 $\pm$ 33.5	292.2 $\pm$ 33.8	267.7 $\pm$ 33.8	0.2941	0.1713	0.1664	0.6169	0.7454
SO	262.0 $\pm$ 48.3	321.4 $\pm$ 48.7	245.6 $\pm$ 48.7	194.2 $\pm$ 48.3	127.5 $\pm$ 48.7	159.6 $\pm$ 48.7	0.7786	0.1003	0.0003	0.2167	0.5015
STABLE_HPM	22.5 $\pm$ 4.9	10.0 $\pm$ 4.9	10.1 $\pm$ 4.9	9.0 $\pm$ 4.9	9.0 $\pm$ 4.9	9.6 $\pm$ 4.9	0.3571	0.4961	0.2134	0.3131	0.4284
Quality HPM	24.5 $\pm$ 5.4	10.8 $\pm$ 5.4	10.8 $\pm$ 5.4	9.9 $\pm$ 5.4	10.0 $\pm$ 5.4	10.4 $\pm$ 5.4	0.3542	0.521	0.2302	0.3254	0.4407
LP	315.7 $\pm$ 19.6 ^A B	300.8 $\pm$ 19.6 ^B	353.1 $\pm$ 19.6 ^A	328.5 $\pm$ 19.6 ^A B	302.8 $\pm$ 19.6 ^B	337.3 $\pm$ 19.6 ^A	0.0417	0.5811	0.9801	0.7024	0.2463

^{AB}Different letters indicate significative differences ($P < 0.05$, highlighted in bold) among the treatment groups (CONTR, ASTX1, ASTX2) of the thawed samples and rapid thermal resistance test (TRT). IPAM – injured plasma and acrosome membranes (%); MPE – % membrana plasmática estável; ASM – % de células com alta geração de ânion superóxido mitocondrial; CELL_SO – concentração de ânion superóxido na população total; HPM_SO – concentração de ânion superóxido com alto potencial mitocondrial; SO – concentração de superóxido nas células com alta geração de superóxido; STABLE_HPM – qualidade do potencial mitocondrial das células estáveis; Quality HPM – qualidade do potencial mitocondrial das células com alto potencial mitocondrial; LP – Lipid peroxidation