



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**



**EFEITO ANTIOXIDANTE DA CÚRCUMA ADICIONADA AO
SÊMEN EQUINO REFRIGERADO**

Bruno Milan

CAMPO GRANDE, MS
2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA CÚRCUMA ADICIONADA AO
SÊMEN EQUINO REFRIGERADO**

ANTIOXIDANT EFFECT OF CURCUMIN ADDED TO COOLED EQUINE
SEMEN

BRUNO MILAN

Orientador: Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Vianna da Costa e Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção animal.

CAMPO GRANDE, MS 2020

Certificado de aprovação

Bruno Milan

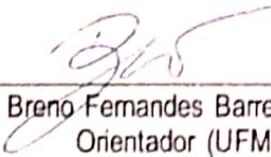
Efeito antioxidante da cúrcuma adicionada ao sêmen equino refrigerado

Antioxidant effect of curcumin added to chilled equine semen

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 24-01-2020

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio
Orientador (UFMS)

Dr. Bruno Gomes Nogueira
(UEMS)

Dr. Gelson dos Santos Difante
(UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, meu pai Paulo Tadeu Milan e minha mãe Cristina Maria B.de O. Milan que abdicaram da minha presença e, mesmo de longe, sempre me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui. Em especial ao meu avô, Lazico Milan, meu grande exemplo de vida, representação mais genuína do amor, humildade e positividade e a minha avó Maria Alves Barcellos de Oliveira, que apesar de não ter conhecido sei que sempre está ao meu lado. Onde estiverem, espero que estejam orgulhosos.

Não podia deixar de dedicar ao meu orientador e amigo prof. Breno, que sempre teve paciência para passar o seu conhecimento, tornando assim esse trabalho realidade. Meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre iluminar meu caminho e nunca me deixar cair, me dando saúde e sabedoria para continuar em frente.

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Ciência Animal.

À Fundação de Apoio e Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do MS, FUNDECT/MS, Brasil pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio, que mais que orientar, se tornou um amigo, que sempre confiou no meu trabalho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva, que se tornou coorientadora a pouco tempo, porém me forneceu toda ajuda necessária.

Ao Prof. Dr. Gumercindo Franco e ao Prof. Dr. Gelson Difante por aceitarem participar da minha banca e contribuir para o trabalho.

Ao meu amigo médico veterinário Dr. Bruno Gomes Nogueira por aceitar participar da minha banca e sempre me ajudar quando havia dúvidas.

Ao médico veterinário Dr. Gediendson Ribeiro de Araujo que se disponibilizou para ser suplente mesmo estando viajando.

À toda equipe do Laboratório Multiuso de Reprodução Animal da FAMEZ, principalmente aos médicos veterinários Willian Vaniel, Mozart, Raiza Pereira e à farmacêutica Bianca Rodriguez, pela ajuda na parte prática do trabalho.

Aos colegas de profissão Daniela Brandão, Gustavo Ferro e Fábio Andrey (Fabão), pela ajuda na parte prática.

À minha família, em especial ao meu pai e à minha mãe, que sempre me apoiaram e não me deixaram desistir. E aos meus amigos que estiveram sempre ao meu lado.

Comece fazendo o que é
necessário, depois o que é
possível, e de repente você
estará fazendo o
impossível

(São Francisco de Assís)

Resumo

MILAN, B. Efeito antioxidante da cúrcuma adicionada ao sêmen equino refrigerado. 2020. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

A refrigeração do sêmen equino é uma técnica que tem sido bastante utilizada pelos criadores, pois acelera o melhoramento genético independente da distância do garanhão. A refrigeração do sêmen tem como objetivo reduzir o metabolismo espermático, e preservar o máximo de células, porém uma das consequências desse armazenamento é o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS). Os antioxidantes são substâncias responsáveis pela proteção das células contra os efeitos deletérios causados pelas ROS. Quando há perda de equilíbrio entre ROS e antioxidante ocorre o estresse oxidativo, que resulta em lesões na membrana plasmática e até no DNA. A adição de antioxidante ao diluidor de refrigeração, pode promover proteção às células, diminuindo os danos causados pelas ROS. Sendo assim, o objetivo foi avaliar o efeito da adição da cúrcuma ao diluidor de refrigeração, sob diferentes variáveis cinéticas espermática, tais como, motilidade total e motilidade progressiva e eficácia na prevenção contra danos causados pelas (ROS), frente a membrana plasmática e acrossomal, fluidez da membrana e peroxidação lipídica, no espermatozoide equino quando submetido à refrigeração por 72 horas. Foram utilizados quatro ejaculados, de cinco garanhões adultos de fertilidade comprovada, submetendo-os aos seguintes tratamentos: controle (diluinte de refrigeração), cúrcuma 0,0005 mM (CUR1), cúrcuma 0,005 mM (CUR2) e cúrcuma 0,05 mM (CUR3). Nas análises de motilidade total e motilidade progressiva o grupo CUR1 apresentou $39,7 \pm 3,6\%$ e $27,2 \pm 2,9\%$ após 48 horas de refrigeração e $28,7 \pm 3,1\%$ e $19,5 \pm 1,6\%$ após 72 horas de refrigeração, sendo significativamente superior quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Quanto a integridade da membrana plasmática e acrossomal, a CUR1 apresentou valores superiores ao controle e CUR3, não diferindo da CUR2, em todos os momentos de refrigeração ($p < 0,05$). Foi possível concluir que adição de cúrcuma na concentração de 0,0005 mM (CUR1) ao diluinte de refrigeração é capaz de preservar a motilidade total, a motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide equino submetido à refrigeração.

Palavras-Chave: açafrão, espermatozoide, garanhão, motilidade

ABSTRACT

MILAN, B. Antioxidant effect of curcumin added to cooled equine semen. 2020. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

The cooling of equine semen is a technique that has been widely used by breeders, accelerating genetic improvement regardless of the distance of the stallion. Cooling of equine semen aims to reduce sperm metabolism, trying to preserve the maximum number of cells, but one of the consequences of this storage is the increase production of reactive oxygen species (ROS). Antioxidants are substances responsible for protecting cells against the harmful effects caused by ROS, when there is a loss of balance between ROS and antioxidant oxidative stress occurs, causing damage to the plasm membrane and even DNA. The addition of antioxidants to the cooling extender can promote cell protection, reducing the damage caused by ROS. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of adding curcumin to the cooling extender, under different kinematic sperm variables, such as total motility and progressive motility and effectiveness in damage prevention caused by (ROS), against the plasma membrane and acrosomal, membrane fluidity and lipid peroxidation, in equine sperm when subjected to refrigeration for 72 hours. Four ejaculates from five adult stallions and with proven fertility were used, subjecting them to the following treatments: control (cooling extender), curcumin 0,0005 mM (CUR1), curcumin 0,005 mM (CUR2) e curcumin 0,05 mM (CUR3). In the analysis of total motility and progressive motility, the CUR1 group presented $39,7 \pm 3,6\%$ e $27,2 \pm 2,9\%$ in 48 hours of cooled and $28,7 \pm 3,1\%$ e $19,5 \pm 1,6\%$ in 72 hours of cooled, being significantly higher when compared to the other groups ($p < 0,05$). As for the integrity of the plasma and acrosomal membrane, the CUR1 exhibits higher values than the control and CUR3, not differing from the CUR2, at all times of refrigeration. It was concluded that the addition of curcumin at a concentration of 0,0005 mM (CUR1) to the semen extender is able to preserve the total motility, progressive motility and the integrity of the plasma and acrosomal membrane of the equine sperm submitted to cooling.

Keywords: motility, spermatozoa, stallion, turmeric

Lista de Ilustrações

- Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria, mostrando a geração das ROS ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), produzindo no final, a água (H_2O). 17
- Figura 2 - Estrutura química da *Curcuma longa* Linn..... 23
- Figura 3. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C. 41
- Figura 4. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com membrana plasmática íntegra e não capacitados nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C. 42
- Figura 5. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com peroxidação lipídica nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C..... 42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão das variáveis espermáticas no momento pré-refrigeração do sêmen equino sem adição de antioxidante.39

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão das variáveis cinéticas espermáticas, do sêmen equino com adição de antioxidante, pós-refrigeração por 24, 48 e 72 horas a 5°C.40

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO.....	14
2.2 RADICAIS LIVRES	16
2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	17
2.3.1 Ânion superóxido	17
2.3.2 Peróxido de hidrogênio.....	18
2.3.3 Radical hidroxila	18
2.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	18
2.5 EFEITO DA REFRIGERAÇÃO	19
2.6 METABOLISMO ESPERMÁTICO.....	21
2.7 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	22
2.7.1 <i>Curcuma longa</i> Linn.....	22
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
4 REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	32
EFEITO DA ADIÇÃO DA CÚRCUMA AO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO POR 72 HORAS	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAIS E MÉTODOS	35
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro do mundo, somando aos muares e asininos são 8 milhões de cabeças, e a renda gerada pelo Complexo do Agronegócio do Cavalo no Brasil movimentava 16 bilhões de reais, além de empregar mais de 3 milhões de pessoas direta e indiretamente (MAPA, 2016).

Na equideocultura, a técnica de inseminação artificial (IA) com o sêmen refrigerado oferece inúmeras vantagens quando comparado a monta natural (MN), tal como, melhor aproveitamento de ganhos, diminuição de acidentes e transmissão de doenças (Brinsko et al., 2011). O Brasil é o segundo país do mundo que mais utiliza essa técnica, perdendo somente para os Estados Unidos (Papa et al., 2005; Loomis, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas resultantes do metabolismo oxidativo. Em condições normais do metabolismo aeróbico o oxigênio molecular sofre redução tetravalente, aceitando quatro elétrons e tendo como produto final a molécula de H₂O (Maia e Bicudo, 2009). Possuem funções deletérias ou fisiológicas, dependendo da sua concentração, e essa regulação ocorre através do sistema antioxidante presente principalmente no plasma seminal (Agarwal et al., 2006). Processos de manipulação, refrigeração e armazenamento do sêmen podem aumentar a produção de ROS (Aurich et al., 1997).

A peroxidação lipídica (LPO) nada mais é do que a degradação dos lipídios poli-insaturados (Nordberg e Arnér, 2001), que ocorre como consequência do estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio ROS e antioxidante (Barbosa et al., 2010).

Os antioxidantes são substâncias responsáveis pela proteção das células contra os efeitos deletérios causados pelas ROS, sendo encontrados em altas concentrações no plasma seminal. Realizam essa proteção convertendo essas moléculas em H₂O (Nordberg e Arnér, 2001; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010).

Estudos foram realizados para mostrar a melhoria na motilidade e na viabilidade dos espermatozoides bovinos e equinos quando adicionado antioxidante no seu diluidor (Bilodeau et al., 2002; Baumber et al., 2002; Jekins et al., 2011; Nogueira et al., 2015; Sampaio et al., 2018; Aparnak e Saberivand, 2019).

33 A presente revisão tem como objetivo abordar os fatores relacionados à refrigeração do
34 sêmen equino, os mecanismos que ocasionam a geração de ROS, seus efeitos e os
35 mecanismos de defesa com a adição de antioxidantes ao diluidor.

36

37

38 2 REVISÃO DE LITERATURA

39

40 2.1 Refrigeração do Sêmen Equino

41 A IA oferece grandes vantagens quando comparada com a MN. O fracionamento
42 do ejaculado em várias doses inseminantes permite utilizá-lo de forma mais eficiente,
43 além de possibilitar uma avaliação minuciosa da qualidade do sêmen antes da
44 inseminação, podendo ser detectados precocemente problemas relacionados a fertilidade.
45 Além de reduzir os riscos da transmissão de doenças entre animais. As desvantagens são
46 relacionadas as modificações que o sêmen pode sofrer, pois é sensível ao meio ambiente
47 (Brinsko et al., 2011).

48 A refrigeração de sêmen equino é uma técnica que tem sido utilizada há muitos
49 anos (Aurich, 2008), é uma biotecnologia capaz de armazenar o sêmen por horas ou até
50 mesmo dias, sem afetar significativamente a taxa de prenhez (Brinsko et al., 2011),
51 considerada uma ferramenta importante no mercado do cavalo, pois permite acesso a
52 garanhões superiores mesmo a longas distâncias (Brasileiro et al., 2019).

53 Para melhores índices reprodutivos, o sêmen refrigerado deve ser transportado por
54 um período de 24 a 48 horas, pois após esse período as taxas de prenhezes diminuem
55 drasticamente (Jasko et al., 1992). Cuidados com a refrigeração do sêmen devem ser
56 tomados, pois esse processo pode causar lesões celulares causadas na curva de
57 refrigeração rápida do espermatozoide “choque frio” (Graham, 2011).

58 Em experimento realizado por Moran et al. (1992) foi observado que a
59 temperatura em que o espermatozoide equino é mais susceptível ao “choque frio”
60 induzido pelo rápido resfriamento é entre 19 a 8°C. Kayser et al. (1992) observaram que
61 o espermatozoide equino pode ser resfriado rapidamente na faixa de 37 a 20°C, porém
62 deve ser resfriado numa taxa de $\leq -0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ de preferência $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ de 20 a
63 5°C para manter o máximo de espermatozoides vivos a 5°C. Essa mesma taxa de
64 refrigeração foi encontrada por Moran et al. (1992) onde observaram que o
65 espermatozoide pode ser resfriado rapidamente ($-0,7^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) de 37 a 19°C sem sofrer

66 lesões, porém, durante o período sensível ao “choque frio” deve-se ter uma curva lenta (-
67 $0,05^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) para prevenir a motilidade do espermatozoide, após 8°C pode voltar para
68 curva rápida até temperatura final de armazenamento. Province et al. (1985) também
69 analisaram a taxa de refrigeração $-1,0$, $-0,5$, e $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, e observaram que imergir
70 diretamente em água a 5°C causa redução significativa na motilidade espermática, tendo
71 que ser respeitada a taxa de refrigeração lenta. Douglas-Hamilton et al. (1984)
72 perceberam que taxas de refrigeração $> -1,0^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ aumentam os efeitos deletérios a
73 motilidade espermática e a integridade estrutural do espermatozoide quando comparada
74 a taxa de refrigeração $< -0,33^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

75 Em relação a temperatura de armazenamento Moran et al. (1992) observaram que
76 quando armazenado a uma temperatura de 4 a 6°C o sêmen obteve qualidade superior,
77 comparado aos submetidos a temperatura de 0 a 2°C , temperaturas iguais às encontradas
78 por Douglas-Hamilton et al. (1984) onde preservaram o sêmen a temperatura de 4 a 6°C
79 por mais de 36 horas. Kayser et al. (1992) perceberam melhor qualidade na motilidade
80 espermática no sêmen armazenado a 5°C que foi resfriado lentamente após 20°C , quando
81 comparado ao sêmen armazenado a 20°C . Porém alguns autores, como Batellier et al.
82 (2001), encontraram melhores resultados quando o sêmen foi armazenado a 15°C , assim
83 como Province et al. (1985) onde testaram temperaturas de armazenamento de 20 , 15 , 10
84 e 5°C e obteve-se melhor resultado na motilidade espermática no armazenamento em
85 temperaturas entre 20 e 15°C . Essa diferença entre melhor temperatura para
86 armazenamento pode ter relação com a taxa de refrigeração (Kayser et al., 1992).

87 Vários diluidores a base de leite foram desenvolvidos para manter o sêmen
88 refrigerado por um período de 24 a 48 horas. Esses diluidores são fundamentais para o
89 controle de pH e osmolaridade, assim como suplementação energética para o
90 espermatozoide (Aurich, 2005), além disso, fornecem tratamento com antibióticos,
91 diminuindo a chance de transmissão de patógenos, protegendo contra substâncias tóxicas
92 produzidas no armazenamento e atuando como estabilizador para preservação de
93 membrana plasmática (Pickett e Amann, 1987; Brinsko et al., 2011). A concentração
94 ideal para o transporte de sêmen refrigerado deve ser entre 25 a 50 milhões spz/mL
95 (Rigby et al., 2001). Varner et al. (1987) encontraram que a melhor concentração para
96 manter a motilidade do sêmen é de 25 milhões spz/mL, e observaram que excesso de
97 diluidor pode reduzir a viabilidade do espermatozoide. Porém, segundo Hayden et al.
98 (2015) o sêmen diluído em $2,5$ milhões spz/mL apresentou menores valores de
99 movimento espermático e integridade da membrana plasmática inicialmente, mas não

100 apresentou declínio contínuo quando armazenado refrigerado, sugerindo que o “efeito de
101 diluição” não altera a qualidade espermática. Segundo Pickett et al. (1975), no processo
102 de armazenamento de sêmen refrigerado, uma alta concentração de plasma seminal pode
103 ser deletério ao espermatozoide.

104 Segundo Brinsko et al. (2000b) para os ganhões considerados “maus
105 refrigeradores” é recomendado a retirada do plasma seminal para o armazenamento. O
106 plasma seminal não é o meio ideal para preservação dos espermatozoides (Squires et al.,
107 1999). Jasko et al. (1992) mostraram que a quantidade de plasma seminal é importante
108 para manutenção da motilidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado, já que em
109 grandes concentrações ou sua total remoção é deletério para as células. Essa importância
110 do plasma seminal na manutenção da motilidade está por conta da constituição do mesmo,
111 onde encontra-se os antioxidantes, que são responsáveis pelo controle contra as ROS
112 (Aitken, 1995; Guasti et al., 2012).

113 Para a refrigeração do sêmen equino o método mais utilizado é a refrigeração
114 passiva realizada através de contêineres, sendo o Equitainer[®] o primeiro a ser fabricado
115 por Douglas-Hamilton et al. (1984). Os contêineres mais utilizados atualmente no Brasil
116 são o Max-Sêmen[®] e a Botu-Flex[®], onde pode-se armazenar o sêmen por 24 horas a 15°C
117 com um gelo reciclável, ou por 48 horas a 5°C com dois gelos reciclável (Papa et al.,
118 2011).

119

120 **2.2 Radicais Livres**

121 Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons
122 desemparelhados na última camada (Halliwell e Gutteridge, 1990), sendo assim são
123 altamente reativos, buscando sempre estabilidade ligando-se a outro elétron. Os radicais
124 livres são oriundos das reações de óxido-redução, ou cedem o elétron desemparelhado,
125 oxidando-se, ou recebem outro elétron, reduzindo-se (Ferreira e Matsubara, 1997).

126 Na maioria das vezes a origem dos radicais livres são derivadas do metabolismo
127 do oxigênio e receberam a denominação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio,
128 sendo mais utilizada como ROS (Ferreira e Matsubara, 1997).

129 A principal fonte da produção de radicais livres é a mitocôndria, através da cadeia
130 de transporte de elétrons (Green et al., 2004), essa produção pode ser favorecida na
131 presença de íons ferro e cobre (Koury e Donangelo, 2003; Maia e Bicudo, 2009).

132

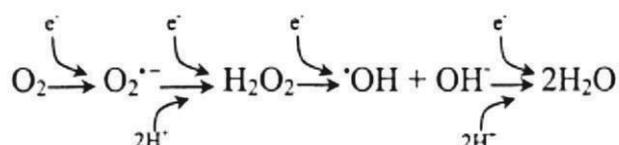
133 2.3 Espécies Reativas de Oxigênio

134 As espécies reativas do oxigênio (ROS), são todos os radicais e não radicais
 135 derivados do oxigênio (Ferreira e Matsubara, 1997; Andrade et al., 2010). As ROS
 136 possuem funções deletérias ou fisiológicas, dependendo da sua concentração, e essa
 137 regulação ocorre devido ao sistema antioxidante presente no plasma seminal (Agarwal et
 138 al., 2006). Em concentrações ideais algumas ROS como o ânion superóxido e o peróxido
 139 de hidrogênio são essenciais para que ocorra a hiperativação da motilidade, capacitação
 140 espermática, reação acrossomal e fusão espermio-oócitariano humano, bovino e equino
 141 (Villegas et al.; 2003; O'Flaherty et al., 2003; Baumber et al., 2003), porém em elevadas
 142 concentrações podem resultar na peroxidação lipídica, desnaturação do DNA e apoptose
 143 dos espermatozoides (Kothari et al., 2010).

144 Quando há perda do equilíbrio ROS-antioxidante, ocorre o estresse oxidativo
 145 (Barbosa et al., 2010) que pode ocorrer devido ao armazenamento seminal. Porém a
 146 suplementação *in vitro* de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento pode
 147 ajudar a proteger o espermatozoide contra essa ação (Maia & Bicudo, 2009).

148 As ROS são moléculas resultantes do metabolismo oxidativo. Em condições
 149 normais do metabolismo aeróbico o oxigênio molecular sofre redução tetravalente,
 150 aceitando quatro elétrons e tendo como produto final a molécula de H₂O (Figura 1; Maia
 151 e Bicudo, 2009).

152



153

154 Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria, mostrando a geração das
 155 ROS ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH[•]), produzindo no final,
 156 a água (H₂O). Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

157

158 Durante esse processo de redução são geradas as principais ROS dentre elas o
 159 ânion superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]), até
 160 a produção final da molécula de água (H₂O; Nordberg e Arnér, 2001).

161

162 2.3.1 Ânion superóxido

163 O ânion superóxido (O₂^{•-}) é um radical livre pouco reativo, formado a partir do
 164 oxigênio molecular. É formado pela cadeia respiratória na membrana mitocondrial, sendo

165 a primeira redução do oxigênio. Por ser pouco reativa essa ROS não possui a capacidade
166 de penetração pela membrana lipídica, agindo assim no lugar onde é produzida. Participa
167 na formação do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase
168 (Halliwell e Gutteridge, 1990; Nordberg e Arnér, 2001; Maia e Bicudo, 2009).

169

170 **2.3.2 Peróxido de hidrogênio**

171 O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre, pois não
172 possui nenhum elétron desemparelhado na última camada, porém é capaz de passar pelas
173 membranas biológicas sendo deletério para as células, sua toxicidade por ser muito
174 aumentada na presença de ferro. Participa da reação que dá origem ao radical hidroxila
175 ($OH\cdot$; Halliwell e Gutteridge, 1990; Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001;
176 Maia e Bicudo, 2009).

177

178 **2.3.3 Radical hidroxila**

179 O radical hidroxila ($OH\cdot$) é formado a partir do peróxido de hidrogênio pela reação
180 de Fenton, onde os íons ferro (Fe^{++}) ou cobre (Cu^+) são os catalisadores. É o radical livre
181 mais reativo, desencadeador da peroxidação lipídica. (Halliwell e Gutteridge, 1990;
182 Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001; Maia e Bicudo, 2009).

183

184 **2.4 Peroxidação Lipídica**

185 A peroxidação lipídica (LPO) nada mais é do que a degradação dos lipídios poli-
186 insaturados, ou seja, que possuem duas ou mais duplas ligações de carbonos. São alvos
187 fáceis ao ataque dos radicais livres, pois possuem altas concentrações de ácidos graxos
188 insaturados (Jones et al., 1979; Halliwell e Gutteridge, 1990; Nordberg e Arnér, 2001).

189 A cascata da peroxidação lipídica é iniciada quando as ROS atacam os ácidos
190 graxos poli-insaturados (PUFA) da membrana plasmática do espermatozoide, essas
191 células são sensíveis a esses ataques pois possuem altas concentrações de ácidos graxos
192 insaturados (Jones et al., 1979). Com todas as lesões causadas na membrana plasmática,
193 a peroxidação lipídica pode também afetar e causar danos ao DNA, reduzindo o potencial
194 fecundante (Baumber et al., 2003; Dobrakowski et al., 2017).

195 A LPO altera a estrutura e a permeabilidade da membrana plasmática (Mello Filho
196 et al., 1984), ocasionando a perda na seletividade na troca iônica, e a formação de
197 produtos citotóxicos, como por exemplo o malonaldeído (Hershko, 1989).

198 O processo de peroxidação lipídica é dividido em três etapas. Iniciação, o radical
199 hidroxila sequestra o hidrogênio do ácido graxo poli-insaturados formando um radical
200 lipídico. Propagação, o radical lipídico reage com oxigênio resultando o radical peroxila,
201 que rapidamente sequestra outro hidrogênio do ácido graxo poi-insaturado resultando em
202 radical lipídico. E por último a terminação, o radical lipídico e o radical peroxila se
203 propagam e destroem a si próprios (Ferreira e Matsubara, 1997; Agarwal et al., 2014).

204 O radical hidroxila é a ROS que inicia o processo de peroxidação lipídica, sendo
205 assim a mais importante. O íon de ferro, no entanto também pode ser fundamental para a
206 iniciação deste processo, já que pode ser um catalisador na peroxidação lipídica (Ferreira
207 e Matsubara, 1997; Benedet e Shibamoto, 2008; Agarwal et al., 2014).

208 Os métodos para avaliar a peroxidação lipídica são o TBARS, onde faz a detecção
209 de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, no caso o malonaldeído, ou através do
210 citômetro de fluxo com utilização do BODIPY[®], uma sonda fluorescente lipofílica, que é
211 um análogo dos ácidos graxos poli-insaturados (Maia e Bicudo, 2009; Domínguez-
212 Rebolledo et al., 2010).

213 **2.5 Efeito da refrigeração**

214 A função da refrigeração do sêmen equino é realizar a diminuição do metabolismo
215 espermático, preservando assim o sêmen por longos períodos. Logo após a coleta o
216 espermatozoide utiliza o máximo da sua atividade metabólica, e a não refrigeração faz
217 com que ocorra aumento da peroxidação lipídica reduzindo sua vida útil (Amann e
218 Graham, 2011).

219 Segundo Squires et al (1999) o metabolismo do espermatozoide é reduzido em
220 50% a cada 10°C de redução de temperatura. Então o sêmen armazenado a 15°C utiliza
221 em média 25% do seu metabolismo, enquanto que armazenado a 5°C tem uma redução
222 deste gasto para 10 a 8%.

223 Os espermatozoides são inteiramente cercados pela membrana plasmática, que
224 não tem a função somente de proteger as organelas, mas também desempenha papeis
225 vitais para a função espermática. Além de ser uma barreira física aos riscos ambientais, a
226 membrana plasmática é fundamental na ligação temporária do espermatozoide ao epitélio
227 do oviduto, na ligação com a zona pelúcida, responsável pela reação do acrossoma e fusão
228 com o oócito durante a fertilização (Colenbrander e Stout, 2011).

229 A membrana plasmática do espermatozoide equino é composta por uma bicamada
230 lipídica, onde possui uma parte hidrofóbica que é direcionada internamente e uma parte

231 hidrofílica, direcionado externamente, além disso faz parte da sua composição
232 carboidratos e proteínas (Amann e Graham, 2011).

233 Essa bicamada lipídica apresenta ser uma estrutura dotada de fluidez e, devido aos
234 seus componentes a membrana pode se movimentar lateralmente com liberdade. Alguns
235 fatores podem influenciar na sua organização (Quinn, 1989) a capacitação espermática,
236 reação do acrossomo (Flesch e Gadella, 2000), ou também devido ao estresse térmico que
237 pode resultar em ruptura da membrana, ou alteração da função (Squires et al., 1999). A
238 diminuição da temperatura faz com que os lipídeos da membrana plasmática passem pela
239 transição de fase do estado líquido para o estado gel (Graham, 2011).

240 Lesões ocorridas na membrana plasmática devido ao choque térmico no momento
241 da refrigeração apresenta certas características, como motilidade anormal, movimentos
242 circulares fechados (Pickett e Amann, 1987). A queda de motilidade pode estar também
243 associada a disfunção mitocondrial, já que a motilidade depende da produção de energia
244 que é feita através da mitocôndria (Aurich, 2005).

245 Outro fator que influencia diretamente na qualidade e características do sêmen
246 equino no processo de refrigeração é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS),
247 sendo ela uma produção fisiológica e patológica, onde nos processos de manipulação,
248 refrigeração e armazenamento do sêmen, podem ser aumentadas (Aurich et al., 1997).
249 Castro et al. (2016) verificaram um aumento significativo de ROS quando o
250 espermatozoide equino é exposto a temperaturas de refrigeração, devido ao fato de a
251 célula não possuir quantidade suficiente de antioxidante para manter o equilíbrio ROS e
252 antioxidante. O desequilíbrio dos mesmos desencadeia o estresse oxidativo (Barbosa et
253 al., 2010), podendo gerar a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, com isso
254 danificando a sua integridade, comprometendo a motilidade e até mesmo a fertilidade da
255 célula espermática (Graham, 2011).

256 Recentemente estudos realizados com a adição de antioxidantes não enzimáticos
257 no processo de refrigeração e criopreservação de sêmen equino, mostrou melhoras na
258 questão de motilidade total, motilidade progressiva, integridade de membrana e
259 diminuição dos níveis de peroxidação lipídica (Contreras et al., 2019; Aparnak e
260 Saberivand, 2019).

261

262 2.6 Metabolismo Espermático

263 Os espermatozoides são células específicas que possuem como objetivo a
264 fertilização do ovócito. Para tal função é necessário geração de energia por meio de ATP,
265 para que assim a célula tenha energia suficiente para sua motilidade (Squires et al., 1999).
266 A motilidade é de extrema importância para o espermatozoide, já que é com ela que ele
267 consegue percorrer o trato genital feminino e alcança o seu destino (Turner, 2003). Além
268 de necessitar de energia para sua motilidade os espermatozoides necessitam de energia
269 para alguns processos fisiológicos como a hiperativação, reação do acrossoma e fusão
270 com o ovócito (Flesch e Gadella, 2000).

271 As vias utilizadas pelo espermatozoide para a síntese de energia são as vias
272 glicolítica e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). A glicólise ocorre nas fibras externas
273 densas do flagelo, enquanto a OXPHOS ocorre exclusivamente na mitocôndria (Volpe et
274 al., 2009; Ferramosca e Zara, 2014), que estão localizadas somente na peça intermediária
275 do espermatozoide (Peña et al., 2009). O espermatozoide também consegue metabolizar
276 glicose e frutose, além disso alguns ácidos graxos e aminoácidos podem ser
277 metabolizados para gerar ATP (Amann e Graham, 2011).

278 O espermatozoide equino consegue realizar a produção de ATP tanto pela via
279 aeróbica, quanto pela via anaeróbica (Varner e Johnson, 2011), sendo que a fonte primária
280 de ATP é através da via aeróbica, por meio da OXPHOS (Gibb et al., 2014). Através da
281 via anaeróbica o espermatozoide utiliza a glicose, que deve sofrer fosforilação e ser
282 transformado em glicose 6 fosfato pela enzima fosfohexoisomerase. A glicose 6 fosfato
283 entra no metabolismo glicolítico resultando em dois piruvatos e quatro moléculas de ATP
284 (Peña et al., 2009; Amann e Graham, 2011). O piruvato resultante do metabolismo
285 anaeróbico pode ser transformado em lactato através de uma redução, realizada pela
286 enzima lactato desidrogenase (LDH), essa reação em condições anaeróbicas regenera o
287 NAD^+ necessário para a glicólise. Esses substratos (piruvato e lactato), são carregados
288 para dentro da mitocôndria, para sofrerem outras metabolizações. Pela presença dentro
289 da mitocôndria de uma nova forma de lactato desidrogenase é possível a conversão de
290 lactato em piruvato novamente (Ferramosca e Zara, 2014). O piruvato transportado para
291 dentro da mitocôndria ou transformado pelo lactato é convertido em acetil-CoA,
292 participando do ciclo de Krebs, que gera a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)
293 e flavina adenina dinucleotídeo (FADH_2) além de 36 moléculas de ATP, no processo de
294 OXPHOS essas moléculas (NADH e FADH_2) doam elétrons para a primeira proteína
295 mitocondrial, chamada de complexo I. Os elétrons percorrem toda a crista através dos

296 complexos II, III e IV sendo transferido para uma molécula de oxigênio (O_2), ocasionando
297 a formação da primeira ROS, o ânion superóxido (O_2^-), com oxidação da NADH é gerado
298 prótons de hidrogênio (H^+). O próton gerado é aproveitado pela enzima ATP sintase no
299 complexo V da mitocôndria, produzindo ATP (Green et al., 2004; Varner e Johnson,
300 2011; Ferramosca e Zara, 2014).

301

302 **2.7 Sistema de Defesa Antioxidante**

303 Os antioxidantes são substâncias responsáveis pela proteção das células contra os
304 efeitos deletérios causados pelas ROS. Realizam essa proteção convertendo essas
305 moléculas em H_2O (Nordberg e Arnér, 2001; Andrade et al., 2010).

306 O plasma seminal possui esse sistema de defesa para proteger o espermatozoide
307 contra a ação deletéria das ROS. Os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos,
308 conhecidos também como agentes naturais, onde são o primeiro grupo a agir tentando
309 neutralizar o efeito das ROS. Faz parte desse grupo a superóxido dismutase, a catalase e
310 a glutathione peroxidase. Possui também o grupo não enzimáticos, compostos com baixo
311 peso molecular, e faz parte desse grupo a vitamina C, vitamina A, alfa-tocoferol,
312 melatonina, bilirrubina, poliaminas, dentre outros. Essa defesa pode atuar tanto na
313 remoção dos agentes causadores de lesão antes dela ocorrer ou reparando a lesão já
314 causada. A cúrcuma tem sido estudada para avaliar seu potencial antioxidante (Halliwell
315 & Gutteridge, 1990; Andrade et al., 2010; Luz et al., 2011; Mirończuk-Chodakowska et
316 al., 2018; Borges et al., 2019).

317

318 **2.7.1 Curcuma longa Linn**

319 A *Curcuma longa L.* é originária da Índia, é considerada uma planta perene que
320 pertence à família das Zingiberaceae, do gênero *Curcuma L.* (Prabhakaran, 2013). É
321 conhecida no Brasil por diversos nomes, dentre eles o açafrão, açafrão da terra, gengibre
322 amarela, raiz de sol. Possui tonalidade amarela, e é utilizada na culinária e na medicina
323 popular (Marchi et al., 2016).

324 A cúrcuma é um composto polifenólico, que possui função antioxidante, anti-
325 inflamatória, antiapoptótica, anticancerígena e antitóxica (Goa et al., 2004). Vários
326 estudos vêm sendo realizados mostrando a ação da cúrcuma contra os danos produzidos
327 pelas ROS, sua elevada eficiência na criopreservação e sua atividade antioxidante,

328 prevenindo contra o choque térmico e o estresse oxidativo (Kunchandy & Rao, 1990;
329 Kanitkar e Bhonde, 2008; Bucak et al., 2012; Shah et al., 2016; Zhang et al., 2017).

330 O mecanismo antioxidante da cúrcuma ocorre devido a sua estrutura, composta
331 de dois fenóis metoxilados e uma forma enol de β -dicetona (Figura 2), que são
332 responsáveis pela captura dos radicais livres, inibindo assim a geração de ROS tanto *in*
333 *vitro* como *in vivo* (Masuda et al., 2001; Joe e Lokesh, 1994).

334



335

336 Figura 2 - Estrutura química da *Curcuma longa* Linn. Fonte : Antunes, M.G.L. (2010)

337 Bucak et al. (2010) demonstraram que a adição de cúrcuma em diluente de
338 congelamento de sêmen caprino apresentou uma maior motilidade e atividade da enzima
339 superóxido dismutase quando comparado com o grupo controle. Jayaprakasha et al.
340 (2006) mostraram que a cúrcuma foi oito vezes mais eficiente do que a vitamina E na
341 eliminação de radicais livres, inibindo assim a formação das ROS. Em outro experimento
342 foi demonstrado que a cúrcuma possui efeitos protetores contra o choque térmico e
343 estresse oxidativo, inibindo a peroxidação lipídica (Sreejayan e Rao, 1994).

344

345

346

347

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

348

349 Diante do exposto, pode-se perceber que as ROS possuem seu papel positivo nos
350 processos fisiológicos, como hiperativação da motilidade, capacitação espermática,
351 reação acrossomal e fusão espermato-ocitiano. Os antioxidantes são fundamentais para
352 manter o equilíbrio das ROS. Porém, quando esse sistema de defesa não consegue suprir
353 a necessidade ocorre o estresse oxidativo, que tem como consequência a peroxidação
354 lipídica na membrana plasmática, processo esse que é altamente deletério para os
355 espermatozoides. As técnicas de armazenamento de sêmen ainda causam muitos danos
356 para as células, pois esses processos aumentam a produção de ROS. Para minimizar esses

357 efeitos e melhorar a qualidade seminal nos processos de armazenamento de sêmen,
358 estudos estão sendo realizados com a adição de agentes antioxidantes no diluidor, para
359 avaliar os efeitos nos processos de refrigeração e criopreservação.

360

361

4 REFERÊNCIAS

362

363 AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in
364 reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.325-332, 2006.

365 AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; PLESSIS, S.S. Effect of oxidative stress on male
366 reproduction. **World Journal of Men's Health**, v.32, p.1-17, 2014.

367 AITKEN, R.Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction,**
368 **Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

369 AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.;
370 SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West
371 Sussex: Wiley-Blackwell, cap.102, v.1, p.1053-1084, 2011.

372 ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.
373 Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais
374 mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-
375 85, 2010.

376 APARNAK, P.; SABERIVAND, A. Effects of curcumin on canine sêmen parameters and
377 expression of NOX5 gene in cryopreserved spermatozoa. **Veterinary Research Forum**,
378 v.10, n.3, p.221-226, 2019.

379 AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion
380 spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

381 AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Anim Reprod Sci**, 107:268–
382 275, 2008.

383 AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on
384 motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48,
385 p.185-192, 1997.

386 BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM,
387 V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.
388 **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

- 389 BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.;
390 YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal**
391 **Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.
- 392 BAUMBER, J., VO, A., SABEUR, K., BALL, B.A. Generation of reactive oxygen
393 species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa.
394 **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.
- 395 BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species
396 and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of**
397 **Andrology**, v.24, n.4, p.621-628, 2003.
- 398 BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote
399 tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60,
400 p.1239-1247, 2003.
- 401 BENEDET, J.A.; SHIBAMOTO, T. Role of transitions metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and
402 Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v.107, p.165-168, 2008.
- 403 BILODEAU, J.F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N., SIRAD, M.A. Reactive oxygen
404 species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by
405 pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**,
406 v.57, p.1105-1122, 2002.
- 407 BORGES, J.C.A.; SATURNINO, K.C.; CRUZ, V.S.; ARAÚJO, E.G. Ação antioxidante
408 da curcumina (cúrcuma longa L.) na injúria de isquemia e reperfusão tecidual.
409 Enciclopédia Biosfera, v.16, n.29, p.48-62, 2019.
- 410 BRASILEIRO, L.S.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; MENEZES, E.; SALGUEIRO, C.C.;
411 NOVELLO, G.; SCHEEREN, V.F.C.; ALVARENGA, M.A.; NUNES, J.F. Coconut
412 water as an extender component for equine cooled sperm. **Journal of Equine Veterinary**
413 **Science**, <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.213>, 2019.
- 414 BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER J.; LOVE
415 C.C.; HINRICHS K.; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction**, 3. ed. MOSBY
416 Elsevier, cap.12, p.160-175, 2011.
- 417 BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial
418 removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage.
419 **Theriogenology**, v.54, p.129–136, 2000b.
- 420 BUCAK M.N.; BAŞPINAR N.; TUNCER P.B.; ÇOYAN K.; SARIÖZKAN S.;
421 AKALIN P.P.; BÜYÜKLEBLEBICI S.; KÜÇÜKGÜNAY S. Effects of curcumin and

- 422 dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. **International Journal of Andrology**,
423 44, 102-109, 2012.
- 424 BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; SAKIN, F.; ATESSAHIN, A.;
425 KULAKSIZ, R.; ÇEVİK, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat
426 (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities.
427 **Small Rumin Res**, 89:24–30, 2010.
- 428 CASTRO, L.; HAMILTON, T.; MENDES, C.; NICHI, M.; BARNABE, V.; VISINTIN,
429 J.; ASSUMPÇÃO, M. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow
430 cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of
431 cryopreservation. **Journal of animal Science and biotechnology**, 7(1), 17, 2016.
432 <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0076-x>.
- 433 COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Evaluation of the plasma membrane. In:
434 McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine**
435 **Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.153, v.1, p.1498-1505, 2011.
- 436 CONTRERAS, M. J.; TREULEN, F.; ARIAS, M. E.; SILVA, M.; FUENTES, F.;
437 CABRERA, P.; FELMER, R. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding
438 antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. **Reproduction in Domestic**
439 **Animals**. 2019. doi:10.1111/rda.13611.
- 440 DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; CHYRA-JACH, D.;
441 BIRKNER, E.; KASPERCZYK, A. Oxidative stress and motility impairment in the
442 semen of fertile males. **Andrologia**, 00:e12783, 2017. <https://doi.org/10.1111/and.12783>
- 443 DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-
444 SANTOS, M.R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARDE, J.J.
445 Comparison of the TBARS assay and BODIPY C₁₁ probes for assessing lipid
446 peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.360-
447 368, 2010.
- 448 DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A
449 field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304,
450 1984.
- 451 FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation.
452 **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.
- 453 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças
454 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica**
455 **Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

- 456 FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma 1061
457 membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, 1062
458 p.197-235, 2000.
- 459 FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane
460 in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, n.3, p.197-235,
461 2000.
- 462 GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.; AITKEN, R. The paradoxical relationship between stallion
463 fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, 91(3), 77, 2014.
- 464 GOA, X.; KUO, J.; JIANG, H.; DEEB, D.; LIU, Y.; DIVINE, G.; CHAPMAN, R.A.;
465 DULCHAVSKY, S.A.; GAUTAM, S.C. Immunomodulatory activity of curcumin:
466 suppression of lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity, and
467 cytokine production in vitro. **BiochemPharmacol**, 68:51–61, 2004.
- 468 GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L.,
469 VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-
470 Blackwell, cap.127, v.1. p.1308-1315, 2011.
- 471 GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative
472 damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, suppl.1, p.110-118, 2004.
- 473 GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua
474 influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos, **Veterinária**
475 **e Zootecnia**, v.19, n.2, p.169-180, 2012.
- 476 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions
477 in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 186: 1-85, 1990.
- 478 HAYDEN, S.S.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; HINRICHS,
479 K.; LOVE, C.C. The “dilution effect” in stallion sperm. **Theriogenology**, v.83, p.772-
480 777, 2015.
- 481 HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane
482 damage. **Semin Hematol** 26, p.277-285, 1989.
- 483 JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.;
484 SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of
485 cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 37:1241–1252, 1992.
- 486 JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activities of
487 curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Chemistry**, 98, 720–
488 724, 2006.

- 489 JENKINS, T.G.; KENNETH, B.S.; ASTON, I.; CARRELL, D.T. Supplementation of
490 cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw
491 motility. **Fertility and Sterility**, v.95, p.2001-2004, 2011.
- 492 JOE B.; LOKESH B.R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in
493 lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages.
494 **BiochemBiophysActa**, 1224: 255-263, 1994.
- 495 JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in
496 human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action
497 of seminal plasma. **Fertil Steril**, 31:531-537, 1979.
- 498 KANITKAR, M.; BHONDE, R.R. Curcumin treatment enhances islet recovery by
499 induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during
500 cryopreservation. **Life Sci**, 82:182-189, 2008.
- 501 KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on
502 motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.
- 503 KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their
504 beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental**
505 **Biology**, v.48, p.425-435, 2010.
- 506 KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista**
507 **de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
- 508 KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **Int**
509 **J Pharmaceutics**, 58:237-240, 1990.
- 510 LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen.
511 **VeterinaryClinics North American EquinePractice**, v. 22, n. 3, 663-676, 2006.
- 512 LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO,
513 J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células
514 germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956-969, 2011.
- 515 MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidante e função espermática em
516 mamíferos: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-
517 193, 2009.
- 518 MARCHI, J.P.; TEDESCO, L.; MELO, A.C.; FRASSON, A.C.; FRANÇA, V.F.; SATO,
519 S.W.; Wietzikoski, E.C. *Curcuma longa L.*, o acafrao da terra, e seus benefícios
520 medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 189-194, 2016.
- 521 MASUDA, T.; MAEKAWA, T.; HIDAKA, K.; BANDO, H.; TAKEDA, Y.;
522 YAMAGUCHI, H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of

- 523 oxidative coupling products from curcumin and linoleate. **J. Agric. Food Chem.**, 49,
524 2539–2547, 2001.
- 525 MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA
526 damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**
527 218, p.273-275, 1984.
- 528 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).
529 Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília, 2016.
- 530 MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E.
531 Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical**
532 **Sciences**. V.63, n.1, p.68-78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- 533 MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of
534 temperature and cooling rate which induced cold shock in stallion spermatozoa.
535 **Theriogenology**, 38:999-1012, 1992.
- 536 NOGUEIRA, B. G., SAMPAIO, B. F. B., SOUZA, M. I. L., COSTA E SILVA, E. V.,
537 ZÚCCARI, C. E. S. N. Coenzyme Q10 and α -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation
538 of Cooled Equine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, 50(6), p.1003–1010,
539 2015. <https://doi.org/10.1111/rda.12627>
- 540 NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the
541 mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11,
542 p.1287-1312, 2001.
- 543 O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T.; Participation of superoxide anion
544 in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **Int J Androl**, v.26, p.109-114, 2003.
- 545 PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR, J.A.; MONTEIRO, G.A. Manual
546 de andrologia e manipulação do sêmen equino. **Botupharma Biotecnologia Animal**,
547 2011.
- 548 PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.;
549 ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A.S.L. Methodological innovations in the
550 biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**,
551 suppl.1, v.33, p.19-27, 2005.
- 552 PEÑA, F.J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.;
553 GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian
554 sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44,
555 p.345-349, 2009.
- 556 PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review.
557 **Journal of Equine Veterinary Journal**, v.7, p.289-301, 1987.

- 558 PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENGA, E.E.
559 Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull
560 spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, n.2, p.167-174, 1975.
- 561 PRABHAKARAN, N. K. P. The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the
562 Invaluable **Medicinal Spice Crops**. London:Elsevier, p. 17-20, 2013.
- 563 PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates,
564 storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**,
565 v.23, p.925-934, 1985.
- 566 QUINN, P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme 1293
567 conditions. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.21, p.3-19, 1989.
- 568 RIGBY, S.L., BRINSKO, S.P., COCHRAN, M., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.C.,
569 VARNER, D.D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen
570 extender. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.171-180, 2001.
- 571 SAMPAIO, B. F. B., NOGUEIRA, B. G., SOUZA, M. I. L., COSTA E SILVA, E. V.,
572 ZÚCCARI, C. E. S. N. Effects of ascorbic acid 2-glucoside and alpha-tocopherol on the
573 characteristics of equine spermatozoa stored at 5°C. **Animal Science Journal**, 89(10),
574 p.1415–1423, 2018. <https://doi.org/10.1111/asj.12944>
- 575 SHAH, S.A.H.; ANDRABI, S.M.H.; QURESHI, I.Z. Freezability of water buffalo bull
576 (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl
577 methane) in semen extender. **International Journal of Andrology**, 10.1111/and.12713,
578 2016.
- 579 SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE,
580 P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and**
581 **Biotechnology Laboratory**. Fort Collins, Bulletin No 9, p.01-38, 1999.
- 582 SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation.
583 **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, 46, 1013–1016, 1994.
- 584 TURNER, R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?
585 **Journal of Andrology**, v.24, p.790-803, 2003.
- 586 VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.M.; KENNEY, R.M.
587 Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility
588 parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.
- 589 VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of
590 this intriguing cell. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER,

- 591 D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.97, v.1, p.909-
592 990, 2011.
- 593 VILLEGAS, J., KEHR, K., SOTO, L., HENKEL, R., MISKA, W., SÁNCHEZ, R.
594 Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa.
595 **Andrologia**, v.35, p.227-232, 2003.
- 596 VOLPE, S.; LEOCI, R.; AIUDI, G.; LACALANDRA, G.M. Relationship between
597 motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. **Reproduction in**
598 **Domestic Animals**, suppl.2, v.44, p. 275-278, 2009.
- 599 ZHANG, L.; DIAO, R.Y.; DUAN, Y.G.; YI, T.H.; CAI, Z.M. *In vitro* antioxidant effect
600 of curcumin on human sperm quality in leucocytospermia. **International Journal of**
601 **Andrology**, 10.1111/and.12760, 2017.
- 602

CAPÍTULO 2

EFEITO DA ADIÇÃO DA CÚRCUMA AO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO POR 72 HORAS

Bruno Milan¹, Breno Fernandes Barreto Sampaio²

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMES/UFMS. E-mail: bruno_milan@hotmail.com

²Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ/UFMS

Resumo: O objetivo foi avaliar a adição da cúrcuma ao diluente de refrigeração, para análise das variáveis cinéticas, motilidade total e progressiva e eficácia na prevenção contra danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), no espermatozoide equino, quando submetido à refrigeração por 72 horas a 5°C. Foram utilizados quatro ejaculados, de cinco garanhões adultos e com fertilidade comprovada, submetendo-os aos seguintes tratamentos: controle (diluente de refrigeração), cúrcuma 0,0005 mM (CUR1), cúrcuma 0,005 mM (CUR2) e cúrcuma 0,05 mM (CUR3). Nas análises de motilidade total e motilidade progressiva o grupo CUR1 apresentou $39,7 \pm 3,6\%$ e $27,2 \pm 2,9\%$ em 48 horas de refrigeração e $28,7 \pm 3,1\%$ e $19,5 \pm 1,6\%$ em 72 horas de refrigeração, sendo significativamente superior quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Quanto a integridade da membrana plasmática e acrossomal, a CUR1 apresentou valores superiores ao controle e CUR3, não diferindo da CUR2, em todos os momentos de refrigeração ($p < 0,05$). A adição de cúrcuma na concentração de 0,0005 mM (CUR1) ao diluente de sêmen é capaz de preservar a motilidade total, motilidade progressiva, e a integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide equino submetido a refrigeração por 72 horas a 5°C.

Palavras-Chave: açafão, espermatozoide, garanhão, motilidade

635 **EFFECT OF CURCUMIN ADDITION TO COOLED EQUINE SEME FOR 72**
636 **HOURS**

637

638 **Abstract:** The objective was to evaluate the addition of curcumin to the cooling extender
639 to analyze of kinetic variables, total and progressive motility and effectiveness in damage
640 prevention caused by reactive oxygen species (ROS), in equine sperm when subjected to
641 refrigeration for 72 hours at 5°C. Four ejaculates from five adult stallions and with proven
642 fertility were used, subjecting them to the following treatments: control (cooling
643 extender), curcumin 0,0005 mM (CUR1), curcumin 0,005 mM (CUR2) e curcumin 0,05
644 mM (CUR3). In the analysis of total motility and progressive motility, the CUR1 group
645 presented $39,7 \pm 3,6\%$ e $27,2 \pm 2,9\%$ in 48 hours of cooled and $28,7 \pm 3,1\%$ e $19,5 \pm 1,6\%$
646 in 72 hours of cooled, being significantly higher when compared to the other groups
647 ($p < 0,05$). As for the integrity of the plasma and acrosomal membrane, CUR1 exhibits
648 higher values than the control and CUR3, not differing from the CUR2, at all times of
649 refrigeration ($p < 0,05$). The addition of curcumin at a concentration of 0,0005 mM
650 (CUR1) to the semen extender is able to preserve the total motility, progressive motility,
651 as well as the integrity of the plasma and acrosomal membrane of the equine sperm
652 submitted to refrigeration for 72 hours at 5°C.

653

654 **Keywords:** motility, spermatozoa, stallion, turmeric

655

656

657 **INTRODUÇÃO**

658

659 A inseminação artificial é uma biotécnica praticada em todo o mundo, e o método
660 mais utilizado na espécie equina é o sêmen resfriado. O país que mais realiza essa técnica
661 são os Estados Unidos, seguido do Brasil (Loomis, 2006). A utilização da inseminação
662 consegue acelerar o melhoramento genético, conseguindo obter produtos de reprodutores
663 alojados em outros países ou até mesmo que já morreram, como no caso de sêmen

664 congelado, além de diminuir a transmissão de doenças venéreas e possibilitar que
665 garanhões subfêrteis consigam deixar descendentes. (Mies Filho, 1987).

666 As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas resultantes do metabolismo
667 oxidativo mitocondrial. Quando há perda do equilíbrio ROS e antioxidante, ocorre o
668 estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010) que pode ocorrer devido ao armazenamento
669 seminal, porém a suplementação *in vitro* de antioxidantes aos meios de refrigeração e
670 congelação pode ajudar a proteger o espermatozoide contra essa ação (Maia & Bicudo,
671 2009).

672 Vários estudos foram realizados para avaliara motilidade e a viabilidade dos
673 espermatozóides bovinos e equinos quando foi adicionado um antioxidante não
674 enzimático no seu diluidor (Bilodeau et al., 2002; Baumber et al., 2002; Nogueira et al.,
675 2015; Sampaio et al., 2018; Aparnak e Saberivand, 2019).

676 Neste contexto, a *Curcuma longa Linn.* é considerado um composto polifenólico,
677 que possui função antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica, anticancerígena e
678 antitóxica (Goa et al., 2004). Vários estudos vêm sendo realizados mostrando a ação da
679 cúrcuma contra os danos produzidos pelas ROS e sua atividade antioxidante, prevenindo
680 contra o choque térmico e o estresse oxidativo (Kunchandy & Rao, 1990; Kanitkar e
681 Bhonde, 2008).

682 Assim, diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a adição da
683 cúrcuma ao diluente de refrigeração, para análise das variáveis cinéticas, motilidade total
684 e progressiva e eficácia na prevenção contra danos causados pelas espécies reativas de
685 oxigênio (ROS), no espermatozoide equino, quando submetido à refrigeração por 72
686 horas a 5°C.

687

MATERIAIS E MÉTODOS

688
689

690 O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Reprodução Animal
691 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de
692 Mato Grosso do Sul. Aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o
693 número 913/2017. Foram utilizados quatro ejaculados de cinco garanhões adultos, todos
694 com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos, pesando 400 a 500 Kg,
695 alojados em propriedades próximas a Campo Grande/MS.

696 As concentrações de antioxidantes utilizadas foram baseadas em outras espécies,
697 já que não foram relatados trabalhos com esse antioxidante em equinos. Foi realizado um
698 teste piloto com ejaculado de quatro animais, onde foram escolhidas as melhores
699 concentrações para execução do trabalho.

700 A cúrcuma (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi diluída em dimetilsulfóxido
701 (DMSO) nas concentrações de 0; CUR1=0,0005; CUR2=0,005 e CUR3=0,05 mM, de
702 forma que a concentração máxima de DMSO fosse de 0,1%, e adicionadas ao diluente de
703 refrigeração (Botusêmen[®], Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Um grupo controle
704 para esta concentração de DMSO puro também foi testado.

705

706 COLHEITA DO SÊMEN

707 Foram realizadas quatro colheitas de sêmen por garanhão (n=20), utilizando
708 vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida
709 a uma temperatura entre 42 e 45°C. As colheitas foram realizadas com o auxílio de uma
710 fêmea em cio. As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria a 37°C e
711 submetidas às análises das variáveis macroscópicas (volume, aspecto e cor) e
712 microscópicas (motilidade subjetiva: 0-100%, vigor: 0-5 e concentração). Somente
713 ejaculados com motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 foram utilizados no experimento. Após as

714 análises diluiu-se uma alíquota contendo 800×10^6 espermatozoide em Botusêmen[®]
715 (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) para alcançar uma concentração de 50×10^6
716 espermatozoides/mL. O sêmen foi transportado para o laboratório em uma Botu-Flex[®] a
717 15°C (caixa de transporte, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) utilizando apenas
718 um gelo reciclável, em intervalo ≤ 1 hora.

719

720 **PROCESSAMENTO DO SÊMEN**

721 O sêmen foi submetido à centrifugação a $600\times g$ por 10 minutos para a remoção
722 do plasma seminal. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspensionado com diluente de
723 refrigeração Botusêmen[®] (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), a uma concentração
724 de 50×10^6 espermatozoides/mL. O volume final foi dividido em quatro alíquotas contendo
725 200×10^6 de espermatozoides, onde foram adicionados os tratamentos.

726 As amostras foram estocadas na Botu-Flex[®] com dois gelos recicláveis para
727 estabilização da temperatura a 5°C . O sêmen foi mantido sob a refrigeração por 72 horas.
728 Em intervalos de 24 horas os gelos recicláveis foram substituídos e as amostras de sêmen
729 retiradas para as análises laboratoriais.

730

731 **ANÁLISE DO SÊMEN**

732 As análises seminais foram realizadas em quatro momentos pré-refrigeração (M-
733 0), após 24 (M-24), 48 (M-48) e 72 (M-72) horas de refrigeração. Foram retirados 600
734 μL de cada tratamento e mantidos em banho-maria por 10 minutos a 37°C . A seguir cada
735 grupo experimental foi submetido às seguintes análises: cinética espermática (Sperm
736 Class Analyzer, SCA[®], Microptic, Barcelona, Espanha), integridade de membrana
737 plasmática e acrossomal, capacitação espermática e susceptibilidade à lipoperoxidação,

738 por citometria de fluxo (CitoFLEX[®], Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA), fazendo
739 a contagem de pelo menos 10.000 eventos.

740

741 **CINÉTICA ESPERMÁTICA**

742 A cinética espermática foi avaliada de forma objetiva pelo sistema
743 computadorizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA[®], Microptic, Barcelona, Espanha).
744 Para a avaliação da mesma, 5,0 µL de sêmen foram colocados na câmara de Makler[®]
745 (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C. O aparelho foi
746 calibrado conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen equino. Foram
747 avaliados, aleatoriamente, no mínimo cinco campos por amostra. As variáveis de cinética
748 espermática avaliados foram: motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP).

749

750 **CITOMETRIA DE FLUXO**

751 Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento
752 CytoFLEX[®] (Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, EUA) equipado com laser: Violeta
753 405 nm, azul 488 nm e vermelho 638 nm e 12 canais de detecção de fluorescência. Após
754 a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante CytExpert
755 Acquisition software.

756

757 **MEMBRANA PLASMÁTICA E ACROSSOMAL**

758 Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizada
759 a associação das sondas fluorescentes, Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e
760 FITC-PNA (aglutinina de Peanut conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo
761 Freitas-Dell'Aqua et al. (2012).

762 Em uma amostra de 200 μ L de sêmen diluído em TALP-PVA, na concentração
763 de 5×10^6 espermatozoides/mL adicionou-se 7μ M de H342, $1,5 \mu$ M de PI e 2ng de FITC-
764 PNA, incubou-se durante 20 min à 37°C ao abrigo da luz. Ao término deste período, a
765 amostra prosseguiu para avaliação em citometria de fluxo.

766

767 **FLUIDEZ DA MEMBRANA (CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA)**

768 Os estágios iniciais da capacitação espermática podem ser medidos pela sonda
769 Merocianina 540, especialmente quando associados com a sonda YO-PRO e Hoechst
770 33342. Este corante tem característica hidrofóbica, que pode monitorar o grau de
771 estabilidade da membrana pelo padrão dos fosfolipídeos apresentados em sua superfície.
772 No processo de capacitação espermática ocorre a inversão dos folhetos internos e externos
773 da membrana plasmática; desta forma, quanto maior a intensidade da fluorescência, maior
774 o grau de desestabilização da membrana.

775 As amostras de sêmen foram diluídas em TALP-PVA na concentração de 5×10^6
776 espermatozoides/mL. Retirou-se 200μ L dessa solução e acrescentou-se 7μ M de Hoechst
777 33342, $7,5 \mu$ M de Merocianina (M24571 – Life Technologies) e 25nM de Yopro (Y3603
778 – Life Technologies) levou para incubação por 20 minutos a 37°C ao abrigo da luz e
779 posteriormente para análise no citômetro de fluxo (Freitas-Dell'Aqua et al., 2012).

780

781 **PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA OU LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)**

782 Para a peroxidação lipídica, utilizou-se protocolo de acordo com Guasti et al.
783 (2012), utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). É um análogo de
784 ácidos graxos poli-insaturados e se incorpora na membrana celular, possui alta
785 sensibilidade de fluorescência. Quando se encontra intacto apresenta fluorescência
786 vermelha, com sua peroxidação muda-se a fluorescência para verde.

787 Diluiu-se 500 µL de sêmen em TALP-PVA e foram adicionados 5 µM de C11-
 788 BODIPY^{581/591}, seguido por incubação durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação,
 789 foram realizadas duas lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com
 790 TALP-PVA ressuspendeu-se o pellet em 500 µl de TALP-PVA e análises foram
 791 realizadas em citometria de fluxo.

792

793 ANÁLISE ESTATÍSTICA

794 O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a
 795 adição de cúrcuma, como tratamento, e os momentos de avaliação como sub-parcelas.
 796 Para comparar as variáveis dependentes (motilidade, integridade da membrana
 797 plasmática, acrossomal, capacitação espermática, atividade mitocondrial e
 798 lipoperoxidação) utilizou-se a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa
 799 Estatístico SAS (2001), considerando-se os efeitos fixos de tratamento e momentos de
 800 avaliação seminal. Compararam-se as médias pelo teste de *Duncan*, em nível de 5% de
 801 significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno
 802 (x/100), de acordo como sugerido por Sampaio (2007).

803

803 RESULTADOS

804

805 Os valores médios encontrados das variáveis seminais pré-refrigeração, antes da
 806 aplicação dos tratamentos, estão apresentados na Tabela 1.

807 Tabela 1. Valores médios ± desvio padrão das variáveis espermáticas no momento pré-
 808 refrigeração do sêmen equino sem adição de antioxidante.

Pré-refrigeração M-0	
Variável	Média ± DP
MT (%)	68,5 ± 3,1
MP (%)	55,7 ± 3,2

MIAI (%)	63,9 ± 4,4
MI/Não-CAP (%)	37,0 ± 7,0
LPO	5133,6 ± 343,3

809 MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma
 810 íntegro; Não-CAP – não capacitado; LPO – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de
 811 fluorescência (unidades arbitrárias).

812

813 Tabela 2. Valores médios ± desvio padrão das variáveis cinéticas espermáticas, do sêmen
 814 equino com adição de antioxidante, pós-refrigeração por 24, 48 e 72 horas a 5°C.

Pós-refrigeração				
	Controle	CUR1	CUR2	CUR3
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
M-24				
MT (%)	36,6 ± 3,6 ^b	46,7 ± 2,5 ^a	38,5 ± 3,2 ^{ab}	17,8 ± 2,3 ^c
MP (%)	20,9 ± 3,9 ^b	30,3 ± 2,5 ^a	20,2 ± 3,0 ^b	4,6 ± 1,1 ^c
M-48				
MT (%)	25,0 ± 3,9 ^b	39,7 ± 3,6 ^a	25,7 ± 3,1 ^b	6,3 ± 1,5 ^c
MP (%)	14,3 ± 3,1 ^b	27,2 ± 2,9 ^a	11,9 ± 2,2 ^b	1,6 ± 0,4 ^c
M-72				
MT (%)	13,5 ± 3,3 ^b	28,7 ± 3,1 ^a	12,9 ± 2,8 ^b	1,7 ± 1,7 ^c
MP (%)	6,6 ± 2,4 ^b	19,5 ± 1,6 ^a	4,9 ± 1,4 ^b	0,3 ± 0,1 ^c

815 ^{a,b,c} Letras diferentes na linha indicam diferenças entre médias pelo teste de Duncan (P<0,05)

816 M-24 – 24 horas de refrigeração; M-48 – 48 horas de refrigeração; M-72 – 72 horas de
 817 refrigeração; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; CUR 1 – Cúrcuma 0,0005 mM; CUR 2
 818 – Cúrcuma 0,005mM; CUR 3 – Cúrcuma 0,05 mM

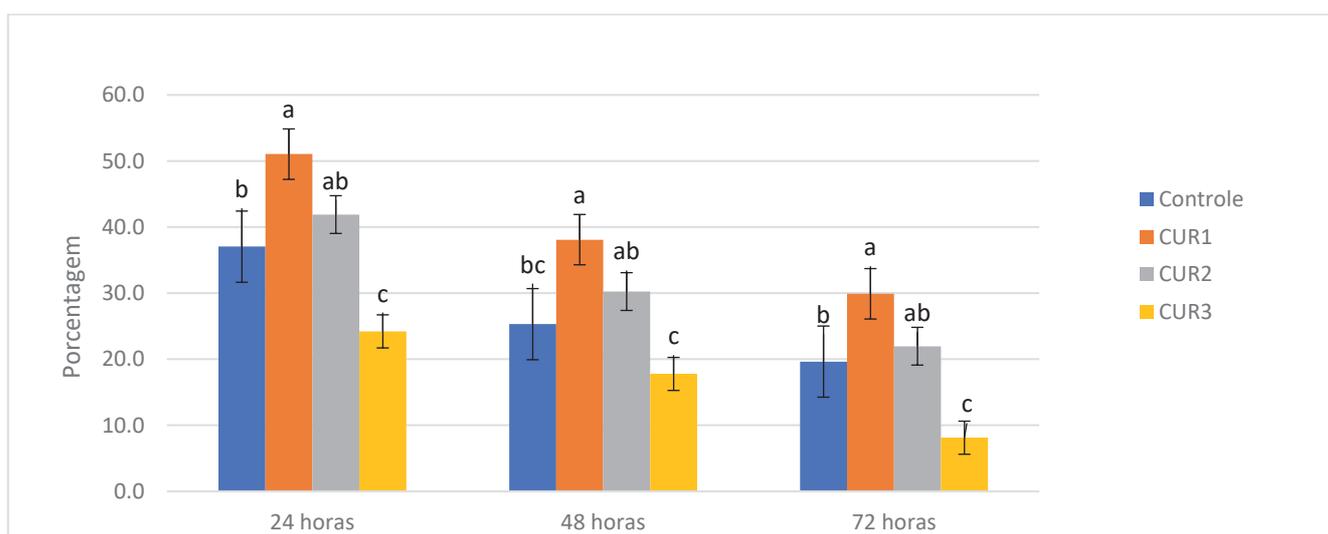
819 Na Tabela 2 observou-se que o grupo CUR1 e CUR2 apresentaram maior
 820 percentual de células com motilidade total após 24 horas de refrigeração, sendo este
 821 significativamente superior (p<0,05) aos grupos controle e CUR3, sem diferirem entre si.
 822 Quanto a motilidade progressiva neste mesmo tempo a CUR1 obteve melhores resultados,
 823 sendo superior aos demais grupos (p<0,05). Não houve diferença entre o grupo controle
 824 e CUR2 (p<0,05).

825 Em relação a motilidade total e motilidade progressiva nos demais tempos de
 826 refrigeração, 48 e 72 horas, a CUR1 apresentou maior percentual de células com
 827 motilidade total e progressiva quando comparado com os grupos controle, CUR2 e CUR3
 828 ($p < 0,05$). Nestes períodos de refrigeração o grupo controle e a CUR2 não apresentaram
 829 diferenças significativas, e o grupo CUR3 foi o que apresentou a pior resposta quanto a
 830 motilidade ($p < 0,05$).

831 Os resultados encontrados para integridade de membrana plasmática e acrossomal
 832 ao longo do tempo de refrigeração encontram-se na Figura 3, assim como a fluidez da
 833 membrana (capacitação espermática) na Figura 4 e peroxidação lipídica na Figura 5.

834 Quanto ao percentual de membranas plasmática e acrossomal íntegras (Figura 3)
 835 a CUR1 teve resultado superior ($p < 0,05$) aos grupos controle e CUR3, contudo sem
 836 diferir do grupo CUR2. Não houve diferença entre o controle e o tratado com CUR2
 837 ($p < 0,05$).

838



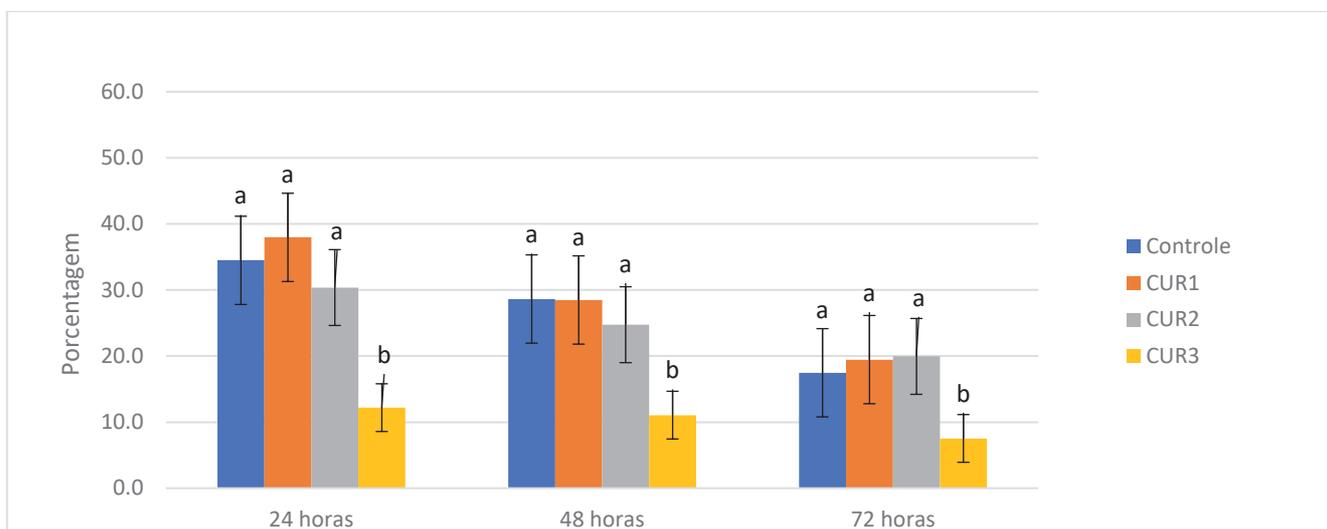
839
 840 Figura 3. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com membrana plasmática
 841 íntegra e acrossoma íntegro nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C.

842 CUR 1 – Cúrcuma 0,0005 mM; CUR 2 – Cúrcuma 0,005mM; CUR 3 – Cúrcuma 0,05 mM

843 ^{a,b,c} Letras diferentes na linha indicam diferenças entre médias pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)

844

845 Em relação a capacitação espermática (Figura 4) os grupos controle, CUR1 e
 846 CUR2 não diferiram entre si, porém, foram superiores ao grupo CUR3 em todos os
 847 tempos de refrigeração.



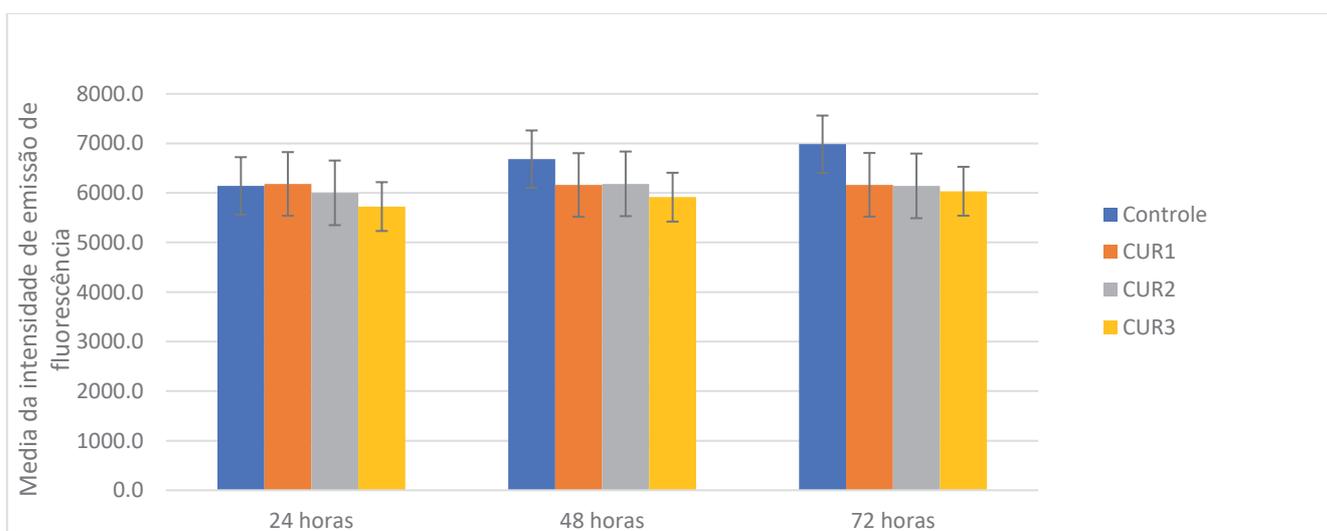
848
 849 Figura 4. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com membrana plasmática
 850 íntegra e não capacitadas nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C.

851 CUR 1 – Cúrcuma 0,0005 mM; CUR 2 – Cúrcuma 0,005mM; CUR 3 – Cúrcuma 0,05 mM

852 *a,b,c* Letras diferentes na linha indicam diferenças entre médias pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)

853

854 A cúrcuma nas concentrações testadas não apresentou redução significativa na
 855 LPO em nenhum grupo e nenhum momento de refrigeração (Figura 5), não apresentando,
 856 portanto, diferença entre os grupos tratados e o controle ($p < 0,05$).



857
 858 Figura 5. Valores médios \pm desvio padrão do percentual de células espermáticas com peroxidação lipídica
 859 nos momentos pós-refrigeração 24, 48 e 72 horas a 5°C.

860 CUR 1 – Cúrcuma 0,0005 mM; CUR 2 – Cúrcuma 0,005mM; CUR 3 – Cúrcuma 0,05 mM

DISCUSSÃO

861
862

863 No presente trabalho, a cúrcuma foi adicionada no diluente de refrigeração, com
864 o intuito de reduzir os danos causados pelas ROS no período de armazenamento e avaliar
865 o efeito antioxidante no sêmen equino, visto que não foi encontrado trabalhos relatando
866 adição de cúrcuma ao sêmen equino.

867 A adição de cúrcuma na concentração de 0,0005 mM (CUR1) ao diluente de
868 refrigeração preservou a motilidade total e motilidade progressiva do espermatozoide
869 equino, em todos os períodos de armazenamento, quando comparado aos demais grupos
870 não diferindo apenas em relação a motilidade total do grupo CUR2 em 24 horas de
871 refrigeração (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho realizado
872 em humanos diagnosticados com leucocitospermia, onde a cúrcuma reduziu os níveis de
873 peróxido de hidrogênio, melhorando assim a motilidade espermática desses pacientes
874 (Zhang et al., 2017).

875 A cúrcuma também apresentou efeitos benéficos na preservação da motilidade
876 progressiva em sêmen de búfalos, suínos e ovinos quando submetidos a testes de
877 congelação (Bucak et al., 2010; Chanapiwat e Kaeoket, 2015; Shah et al., 2016). Tal
878 resultado pode ser explicado pelo efeito antioxidante da cúrcuma, que devido a sua
879 estrutura consegue inibir a formação das ROS (Chanapiwat e Kaeoket, 2015). Baixas
880 concentrações de ROS são necessárias para motilidade e capacitação espermática, porém
881 devem ser controladas devido ao fato de desencadearem a peroxidação lipídica causando
882 diminuição na motilidade e aumentando a mortalidade das células espermáticas. As ROS
883 afetam o espermatozoide logo após a ejaculação, devido a isso pode-se observar que a
884 cúrcuma auxilia na melhora da motilidade (Głombik et al., 2014). A concentração ideal
885 para o efeito positivo da cúrcuma deve ser estudada para cada espécie.

886 Os efeitos tóxicos da cúrcuma foram observados com uma concentração de 0,05
887 mM (CUR3), onde houve diminuição da motilidade e integridade de membrana e
888 acrossoma. Esse mecanismo pode ser explicado pela acidificação intracelular e
889 hiperpolarização da membrana plasmática do espermatozoide, quando aumenta a
890 concentração de cúrcuma adicionada ao sêmen (Naz, 2014). Em camundongos foi testado
891 a concentração de 100 μ M por Głombik et al. (2014) e observado que essa concentração
892 apresentou efeitos tóxicos para as células. Já em búfalos a concentração de 2 mM
893 apresentou efeito tóxico (Naz, 2011).

894 Avaliando-se a integridade da membrana plasmática e acrossomal (Figura 3), foi
895 observado que a concentração de 0,0005 mM de cúrcuma (CUR1) adicionada ao diluente
896 de sêmen obteve resultado significativamente maior ao grupo controle e CUR3 ($p < 0,05$),
897 não apresentando diferença quando comparado ao grupo de CUR2. Resultados
898 semelhantes foram apresentados na adição de 0,5 mM de cúrcuma no diluente de
899 congelamento de sêmen bovino, onde foi observado um ótimo efeito protetor na integridade
900 da membrana plasmática (Bucak et al., 2012). Em trabalho realizado com sêmen
901 congelado de camundongos foi observado que a adição de 2,5 mM obteve resultados
902 semelhantes, preservando a integridade das membranas plasmática e acrossomal, além de
903 observarem um aumento na capacidade antioxidante do grupo tratado (Soleimanzadeh e
904 Saberivand, 2013). Tal efeito protetor pode estar relacionado com a capacidade da
905 cúrcuma de acumular-se na membrana plasmática, isso devido as suas características
906 lipofílicas (Jaruga et al., 1998).

907 Sabe-se que a concentração de ROS em níveis ideais são fundamentais para certos
908 processos fisiológicos, dentre eles a capacitação espermática (Baumber et al., 2003),
909 porém em diferentes níveis pode acarretar em diversos danos a células espermáticas
910 (Kothari et al., 2010). O presente estudo não apresentou melhoras significativas quanto a

911 estabilização da membrana plasmática (Figura 4) quando comparado o grupo controle
912 com os grupos tratados. Foi observado que na concentração 0,05 mM (CUR3) de cúrcuma
913 apresentou uma piora na estabilização da membrana quando comparado com os demais
914 tratamentos, o que está de acordo com o dito anteriormente, onde concentrações de
915 antioxidantes devem ser estudadas, pois o excesso pode ter efeito tóxico as células (Naz,
916 2011; Głombik et al., 2014).

917 A cascata da peroxidação lipídica inicia-se com o ataque das ROS aos ácidos
918 graxos poli-insaturados da membrana plasmática (Baumber et al., 2003). Sendo assim, o
919 sêmen dos mamíferos é mais sensível ao estresse oxidativo, devido a sua alta
920 concentração de ácidos graxos poli-insaturados e sua limitação em reparar os danos
921 causados (Shah et al., 2016). Esse estresse oxidativo é considerado a principal causa de
922 infertilidade masculina (Agarwal e Majzoub, 2017). As biotécnicas utilizadas no
923 processamento do sêmen para o seu armazenamento são responsáveis pelo aumento da
924 produção das ROS, através da exposição à luz, manipulação, choque térmico (Sampaio
925 et al., 2018). A cúrcuma inibe a geração de ânion superóxido e radical hidroxila
926 impedindo a oxidação de ferro através da reação de Fenton (Aparnak e Saberivand, 2019).
927 No processo de peroxidação lipídica faz o papel de limpeza, aprisionando os radicais
928 livres, além de aprimorar a atividade de enzimas antioxidantes como a enzima superóxido
929 dismutase (Chanapiwat e Kaeoket, 2015; Zhang et al., 2017), além disso, a cúrcuma é
930 capaz de acumular-se na membrana plasmática, e com isso promover a proteção contra
931 peroxidação lipídica (Jaruga et al., 1998).

932 No presente trabalho não foi encontrada diferença significativa em relação a
933 peroxidação lipídica (Figura 5) entre os grupos tratados e controle em nenhum período de
934 armazenamento do sêmen. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de não se conhecer
935 a fórmula completa do diluente de sêmen, que pode possuir na sua apresentação alguma

936 substância antioxidante capaz de controlar a peroxidação lipídica. Outra questão, pode
937 ser o fato de que o processo de refrigeração não foi suficiente para geração do estresse
938 oxidativo total, e conseqüentemente não apresentar diferença na peroxidação lipídica.

939 A prevenção contra a peroxidação lipídica com a utilização da cúrcuma possui
940 resultados variáveis. Trabalhos mostraram resultados favoráveis da cúrcuma frente a
941 peroxidação lipídica, onde encontraram diminuição na peroxidação lipídica em sêmen
942 congelado de búfalos adicionando 1,5 mM ao diluidor (Shah et al., 2016). Tvrdá et al.
943 (2016), verificaram que a adição da cúrcuma ao sêmen de bovino induzido ao estresse
944 oxidativo resultou em diminuição da peroxidação lipídica. Trabalhos apresentaram que a
945 adição da cúrcuma não teve diminuição da peroxidação lipídica, como nos trabalhos
946 realizados em sêmen congelado de pequenos ruminantes (Bucak et al., 2008; Bucak et
947 al., 2010) e com sêmen congelado de bovino, onde criaram a hipótese de que o
948 antioxidante mantém a estabilidade da membrana plasmática contra o estresse oxidativo
949 sem eliminar a produção da peroxidação lipídica, visto que não demonstrou influência no
950 fator qualidade espermática (Bucak et al., 2012), porém com sêmen equino não foram
951 encontrados relatos até o momento

952 De acordo com os resultados observados (Tabela 2 e Figuras 3, 4 e 5) a cúrcuma
953 pode ser uma alternativa para preservação da motilidade e integridade de membrana
954 plasmática e acrossomal no espermatozoide equino após 72 horas de refrigeração a 5°C.
955 Porém mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos da cúrcuma no sêmen
956 equino. Acredita-se que esse antioxidante possa ser uma ferramenta interessante também
957 no processo de criopreservação do sêmen equino.

958 Diante do estudado, conclui-se que a cúrcuma na concentração de 0,0005 mM
959 (CUR1) adicionada ao diluente de refrigeração, foi eficaz na preservação dos parâmetros
960 cinéticos, motilidade total e progressiva e aumentando a integridade da membrana

961 plasmática e acrossomal durante o tempo de armazenamento do sêmen equino por 24, 48
962 e 72 horas a 5°C.

963

964

AGRADECIMENTOS

965

966 À Fundação de Apoio e Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do
967 MS, FUNDECT/MS, Brasil.

968

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

969

970 Agarwal, A., & Majzoub, A. (2017). Antioxidant therapy in idiopathic
971 oligoasthenoteratozoospermia. *Indian Journal of Urology*, 33(3), 207–214
972 <https://doi.org/10.4103/iju.IJU>

973 Aparnak, P., & Saberivand, A. (2019). Effects of curcumin on canine sêmen parameters and
974 expression of NOX5 gene in cryopreserved spermatozoa. *Veterinary Research Forum*,
975 10(3),221-226.

976 Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., Oliveira de Paula, S., Minim, V.P.R.,
977 Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.
978 *Revista de Nutrição*, v.23, n.4, 629-643.

979 Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and
980 cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of*
981 *Andrology*, 24, 621–628.

982 Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A. (2003). Reactive oxygen species promote
983 tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.60,
984 1239-1247.

985 Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, B.A. (2002) Generation of reactive oxygen species by
986 equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*,
987 v.57, 1025-1033.

988 Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., Sirad, M.A. (2002). Reactive oxygen species-
989 mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate,
990 metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, 1105-
991 1122.

- 992 Bucak M.N., Başpınar N., Tuncer P.B., Çoyan K., Sariözkan S., Akalin P.P., Büyükleblebici
993 S., Küçükğünay S. (2012). Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed
994 bovine semen. *International Journal of Andrology*, 44, 102-109.
- 995 Bucak Mn, Ates, S, Ahin A, Yu`Ce A (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative stress
996 parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res* 75:128–
997 134.
- 998 Bucak, M.N., Sariözkan, S., Tuncer, P.B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksiz, R., Çevik, M.
999 (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus*
1000 *ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidante activities. *Small*
1001 *Rumin Res*, 89, 24-30.
- 1002 Chanapiwat P., & Kaeoket K. (2015). The effect of *Curcuma longa* extracted (curcumin) on
1003 the quality of cryopreserved boar semen. *Animal Science Journal*, 86, 863-868.
- 1004 Freitas-Dell'aqua, C.P.; Guasti, P.N.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R.D., Dell'aqua Jr, J.A.,
1005 Papa, F.O. (2012). Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion
1006 spermatozoa. *Anim Reprod*, v.9, 941.
- 1007 Głombik K., Basta-Kaim A., Sikora-Polaczek M., Kubera M., Starowicz G., Styrna J.
1008 (2014). Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-
1009 ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacological*
1010 *Reports*, 66, 782-787.
- 1011 Goa X., Kuo J., Jiang H., Deeb D., Liu Y., Divine G., Chapman R.A., Dulchavsky S.A.,
1012 Gautam S.C. (2004). Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of
1013 lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity, and cytokine
1014 production in vitro. *BiochemPharmacol*, 68:51–61.
- 1015 Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S.; Bandorowicz-Pikuła, J.; Sikora, E.;
1016 Franceschi, C.; Cossarizza, A.; Bartosz, G. (1998). Apoptosis-like, reversible changes in
1017 plasma membrane asymmetry and permeability, and transiente modifications in
1018 mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS*, 433,
1019 287-293.
- 1020 Kanitkar M., & Bhonde R.R. (2008). Curcumin treatment enhances islet recovery by
1021 induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during
1022 cryopreservation. *Life Sci*, 82:182–189.
- 1023 Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., Plesses, S.S. (2010). Free radicals: Their beneficial
1024 and detrimental effects on sperm functions. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.48,
1025 425-435.

- 1026 Kunchandy E., & Rao M.N.A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. Int
1027 J Pharmaceutics, 58:237–240.
- 1028 Loomis, P. R. (2006). Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen.
1029 Veterinary Clinics North American Equine Practice, v. 22, n. 3, 663-676.
- 1030 Maia, M.S., & Bicudo, S.D. (2009). Radicais livres, antioxidante e função espermática em
1031 mamíferos: uma revisão. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.33, n.4, 183-193.
- 1032 Marchi, J.P., Tedesco, L., Melo, A.C., Frasson, A.C., França, V.F., Sato, S.W., Wietzikoski,
1033 E.C. (2016). *Curcuma longa* L., o acafrao da terra, e seus benefícios medicinais. Arquivos
1034 de Ciências da Saúde UNIPAR, v. 20, n. 3, 189-194.
- 1035 Mies Filho, A. (1987). Inseminação Artificial, 6 a edição. Porto Alegre: Sulina, 750.
- 1036 Naz, R. K. (2011). Can curcumin provide an ideal contraceptive? Molecular Reproduction
1037 and Development, 78, 116–123.
- 1038 Naz, R. K. (2014). The effect of curcumin on intracellular pH (pHi), membrane
1039 hyperpolarization and sperm motility. Journal of Reproduction and Infertility, 15, 62–70.
- 1040 Nogueira, B. G., Sampaio, B. F. B., Souza, M. I. L., Costa E Silva, E. V., Zúccari, C. E. S.
1041 N. (2015). Coenzyme Q10 and α -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled
1042 Equine Semen. Reproduction in Domestic Animals, 50(6), 1003–1010.
1043 <https://doi.org/10.1111/rda.12627>.
- 1044 O’Flaherty, C., Beorlegui, N., Beconi, M.T. (2003). Participation of superoxide anion in the
1045 capacitation of cryopreserved bovine sperm. Int J Androl, v.26, 109-114.
- 1046 Prabhakaran, N. K. P. (2013). The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the
1047 Invaluable Medicinal Spice Crops. London:Elsevier, 17-20.
- 1048 Sampaio, B. F. B., Nogueira, B. G., Souza, M. I. L., Silva, E. V. Da C. E., Zúccari, C. E. S.
1049 N. (2018). Effects of ascorbic acid 2-glucoside and alpha-tocopherol on the
1050 characteristics of equine spermatozoa stored at 5°C. Animal Science Journal, 89(10),
1051 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/asj.12944>
- 1052 Sampaio, I.B.M. (2007). Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª ed. FEPMVZ, Belo
1053 Horizonte. 264.
- 1054 Shah S.A.H., Andrabi S.M.H., Qureshi I.Z. (2016). Freezability of water buffalo bull
1055 (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyal
1056 methane) in semen extender. International Journal of Andrology, 10.1111/and.12713.
- 1057 Soleimanzadeh A., & Saberivand A. (2013). Effect of curcuma on rat sperm morphology
1058 after the freeze-thawing process. Veterinary Research Forum, 4 (3), 185-189.

- 1059 Villegas, J., Kehr, K., Soto, L., Henkel, R., Miska, W., Sánchez, R. (2003). Reactive oxygen
1060 species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*, v.35, 227-232.
- 1061 Zhang L., Diao R.Y., Duan Y.G., Yi T.H., Cai Z.M. (2017). *In vitro* antioxidant effect of
1062 curcumin on human sperm quality in leucocytospermia. *International Journal of*
1063 *Andrology*, 10.1111/and.12760.