



Nutracêuticos e antioxidantes na qualidade seminal de garanhões – resultados obtidos na última década

Nutraceuticals and antioxidants on the stallion semen quality – results obtained over the last decade

Rodrigo Arruda de Oliveira¹

¹Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB), Brasília, DF

Resumo

Alguns anos se passaram desde o nascimento do primeiro potro com sêmen congelado. Entretanto, sabe-se que a refrigeração e a criopreservação dos espermatozoides podem induzir danos celulares, que estão associados ao rompimento de membranas lipídicas, resultando em danos às mitocôndrias e perda da integridade de membrana plasmática e acrossomal. Devido a isso, novos diluentes, protocolos de refrigeração e criopreservação de sêmen e vários suplementos nutricionais têm sido utilizados nos últimos anos com o objetivo de melhorar a fertilidade de garanhões. O termo nutracêutico vem se tornando comum na reprodução animal e descreve produtos derivados dos alimentos, que podem fornecer benefícios adicionais a saúde, além dos valores básicos encontrados na dieta. Entre os vários nutracêuticos utilizados na reprodução, temos o ômega-3, ômega-6, vitaminas do complexo B, L-carnitina, β -caroteno e antioxidantes. Portanto, objetivou-se apresentar as principais substâncias utilizadas como nutracêuticos e antioxidantes, seja utilizado de forma oral ou incorporado a diluentes de sêmen, com a finalidade de melhorar a qualidade seminal de garanhões, e consequentemente incrementar taxas de prenhez.

Palavras-chave: espermatozoide, fertilidade, peroxidação lipídica, radicais livres, sêmen

Abstract

It has been many years since the foaling of the first foal with frozen semen. However, it is known that cooling and freezing semen can induce damage to the cells, which are associated to injuries to spermatic membranes. For this reason, new extenders, cooling and frozen semen protocols and several nutritional supplements have been used in recent years with the aim of improving the stallions' fertility. Nutraceuticals have become remarkably popular in animal reproduction and describe products derived from foods, which may provide additional health benefits, beyond the basic value found in diets. Among the main nutraceuticals used in male reproduction, there are omega-3 and 6, B-complex vitamins, L-carnitine, β -carotene, and antioxidants. The aim of this review is to present the main substances used as nutraceuticals and antioxidants, either used orally or in combination with semen extenders, focusing on the improvement of seminal quality, and pregnancy rates.

Keywords: fertility, lipidic peroxidation, reactive oxygen species, semen, spermatozoa

Introdução

Sessenta e quatro anos se passaram desde o nascimento do primeiro potro com a utilização de sêmen criopreservado (Barker e Gandier, 1957). Desde então avanços significativos foram observados com a utilização dessa biotécnica, entretanto os índices de prenhez continuam inconstantes e sujeitos a inúmeras variáveis. A utilização do sêmen congelado gerou uma perspectiva de expansão para a criação de equinos por possibilitar a preservação por tempo indeterminado desse material e permitir a distribuição mundial, o que maximiza a utilização de garanhões com mérito genético superior e reduz custos com transporte dos animais, assim como doenças. Barreiras geográficas podem ser abolidas, além disso, há possibilidade de se utilizar sêmen criopreservado de garanhões que estão em competição ou se recuperam de patologias que os impedem de cobrir, ou até mesmo de reprodutores que já morreram (Miller, 2008).

Devido às limitações com o uso do sêmen congelado de parte dos garanhões, o sêmen refrigerado é mais utilizado nos criatórios brasileiros e está em ampla expansão. O tempo de utilização do

¹Correspondência: rodrigoarruda@unb.br

Recebido: 19 de outubro de 2021

Aceito: 16 de novembro de 2021



sêmen refrigerado é superior ao do sêmen fresco, pois em temperaturas reduzidas o metabolismo celular é mais baixo. Estudos demonstraram que a cada 10°C reduzidos na temperatura das células, o metabolismo celular é reduzido em 50%. No entanto, a refrigeração apenas reduz o metabolismo celular, mas não o cessa completamente. A atividade metabólica leva à formação de radicais livres que prejudicam os espermatozoides, reduzindo a motilidade (Ball, 2008; Oliveira et al., 2015a, 2015b).

A refrigeração e a criopreservação dos espermatozoides podem induzir injúrias celulares, que estão associadas ao rompimento de membranas lipídicas, resultando em danos às mitocôndrias e perda da integridade de membrana plasmática e acrossomal (Heckenbichler et al., 2011; Oliveira et al., 2017). A manipulação do sêmen equino durante esses processos reduz a viabilidade e fertilidade espermática em consequência, entre outros problemas, da peroxidação de lipídios da membrana, devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados que tornam as células altamente susceptíveis à ação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) (Cocchia et al., 2011; Oliveira et al., 2013). O efeito oxidativo causado pela geração das EROS pode ser diminuído pela adição de antioxidantes ao plasma seminal ou aos diluentes utilizados no congelamento e refrigeração de sêmen (Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Oliveira et al., 2015a, 2015b; Francisco Júnior et al., 2015).

Além de novos diluentes e protocolos de refrigeração e criopreservação de sêmen, vários suplementos nutricionais têm sido utilizados nos últimos anos com o objetivo de melhorar a fertilidade de garanhões por meio do uso de nutrientes em diferentes vias metabólicas (Freitas et al., 2016). Há uma evidência crescente que nutracêuticos influenciam a capacidade reprodutiva de machos de diferentes maneiras por meio da interação de componentes como ácidos graxos poliinsaturados, L-carnitina, antioxidantes e vitaminas (Arruda et al., 2010; Freitas et al., 2016; Freitas e Oliveira, 2018). Nutracêuticos são suplementos alimentares que fornecem uma forma concentrada de um respectivo agente bioativo, obtido a partir de um alimento, porém apresentado em uma matriz não-alimentar, e usado em doses que excedem às encontradas normalmente na dieta, com a finalidade de melhorar a saúde (Dharti et al., 2010; Freitas e Oliveira, 2018). Dessa forma, o nutracêutico situa-se entre os alimentos e os produtos farmacêuticos, sendo usado, como um termo abrangente, incluindo alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, minerais e vitaminas (Ko e Sabanegh, 2014). Entre os principais nutracêuticos citados na literatura que são utilizados na reprodução do macho estão: o ômega-3 e 6, as vitaminas do complexo B, a L-carnitina, o β -caroteno e os antioxidantes.

Portanto, objetivou-se com essa revisão abordar a utilização de nutracêuticos orais e antioxidantes incorporados a diluentes, com relação a qualidade seminal de garanhões.

Ácidos graxos poliinsaturados

O sêmen dos garanhões contém altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), em particular o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3, um ácido graxo ômega 3) e o ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-6, um ácido graxo ômega 6). Esses ácidos graxos são essenciais para a estrutura, função e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Os fosfolipídeos são os principais componentes lipídicos do espermatozoide e são, em grande parte compostos por ácidos graxos poliinsaturados (Aurich., 2005).

Uma vez que os animais não são capazes de sintetizar os PUFAs a partir de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, devem adquiri-los a partir de PUFAs precursoras na sua dieta. Estudos em garanhões, demonstraram que uma alta proporção de DHA em relação ao DPA resulta em uma maior fertilidade, enquanto altos níveis de DPA em relação ao DHA resulta em uma menor fertilidade (Brinsko et al., 2005).

Grady et al. (2009) observaram que a suplementação de ácido docosahexaenóico na dieta de garanhões, pode aumentar a produção diária de espermatozoides, a qualidade de sêmen refrigerado e criopreservado. Possivelmente devido a um aumento de conteúdo de DHA na membrana plasmática do espermatozoide. O efeito foi ampliado nos garanhões inicialmente com ejaculados de baixa qualidade.

Schmid-Lausigk e Aurich (2014) investigaram o efeito da suplementação com produto comercial composto com óleo de linhaça (ômega-3 e ômega-6), por um período de 84 dias, na dieta de garanhões de esporte. Avaliou-se o efeito na motilidade e integridade de membrana plasmática para sêmen refrigerado e criopreservado. O tratamento atenuou a queda da motilidade e da integridade de membrana plasmática para o sêmen refrigerado. Porém, não evitou a queda da qualidade seminal para o sêmen criopreservado.

Rodrigues et al. (2017) também avaliaram o efeito da suplementação com óleo de linhaça por 60 dias, na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado de garanhões da raça Mangalarga



Marchador. Os autores encontraram melhoras na motilidade total e progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática do sêmen criopreservado para os animais suplementados. Não houve diferença para o sêmen fresco e refrigerado.

L-carnitina

A capacidade de produção da L-carnitina através da conversão de dois aminoácidos essenciais (lisina e metionina) pode ser um fator limitante em garanhões. Por essa razão é frequentemente considerada um nutriente essencial (Bazzano et al., 2021). A L-carnitina desempenha um papel vital no metabolismo do espermatozoide, fornecendo energia prontamente disponível para o espermatozoide, o que afeta de forma positiva a motilidade espermática, a maturação dos espermatozoides e a espermatogênese. Esse efeito positivo é mediado pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa, através da membrana mitocondrial interna, para a utilização no metabolismo através da β -oxidação (Jeulin e Lewin, 1996; Palmero et al., 2000).

Gibb et al. (2015) avaliaram um diluente específico, contendo diferentes concentrações de L-carnitina e piruvato, isolados ou em combinação, para manter o sêmen de pôneis a temperatura ambiente por 72h. O diluente contendo L-carnitina ou a combinação de L-carnitina e piruvato foram superiores em relação ao controle após 24h de armazenamento a temperatura ambiente, com relação a motilidade total, progressiva e combate de radicais livres.

Nery et al. (2020) realizaram dois experimentos para avaliar os efeitos da L-carnitina (LC). No experimento 1 avaliaram a correlação da L-carnitina no plasma sanguíneo e seminal com a qualidade espermática de garanhões da raça Quarto-de-Milha. Houve uma correlação positiva entre os níveis de LC no plasma seminal com a concentração espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal. No segundo experimento avaliaram o efeito de 4 diferentes concentrações de LC incorporados ao diluente na qualidade seminal no momento 0h, 24h, 48 e 72h de refrigeração a 5°C. Os autores observaram que a adição de 1 a 2mM de LC preservou a motilidade espermática até 48h.

Antioxidantes e vitaminas

Como todas as células que vivem em condições aeróbias, os espermatozoides produzem espécies reativas ao oxigênio (EROs), como resultado do metabolismo normal do oxigênio. Em condições normais, a maioria das espécies reativas ao oxigênio são continuamente neutralizadas por enzimas escaneadoras, contidas nos espermatozoides e no plasma seminal. O estresse oxidativo surge como uma consequência da excessiva produção de EROs, que resulta em uma diminuição dos níveis de ATP intracelular, levando a peroxidação lipídica da membrana plasmática do espermatozoide. A partir da peroxidação lipídica pode ocorrer a diminuição da integridade da membrana plasmática, danos ao DNA, diminuição da capacidade intrínseca do espermatozoide de reparar danos ao DNA, e diminuição da motilidade espermática (Aitken, 2017; Gibb et al., 2020).

Apesar dos efeitos negativos do excessivo estresse oxidativo, as espécies reativas ao oxigênio fisiológicas, são essenciais para determinadas funções dos espermatozoides, incluindo a capacitação espermática. Os espermatozoides de mamíferos possuem um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as EROs que consiste, principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase, catalase, glutatona transferase e glutatona peroxidase (GPx), bem como antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), e glutatona reduzida (Aitken, 2017; Griffin et al., 2019; Aitken e Drevet, 2020).

A vitamina A, na forma de retinol, retinal ou ácido retinóico somente é encontrada no organismo do animal e seus produtos. Porém, plantas produzem pigmentos amarelos chamados de carotenóides (provitamina A), que podem ser convertidos em vitamina A na mucosa intestinal e no fígado, sendo o beta-caroteno a provitamina A mais importante. Na reprodução, a vitamina A atua na síntese de hormônios esteroidais a partir do colesterol orgânico, nas gônadas, placenta e adrenais. Em caso de deficiência, ocorrem alterações histológicas dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas, tornando as glândulas atóxicas. Dessa forma, a vitamina A exerce uma influência marcante no complexo reprodutivo do macho, atuando como: protetora do epitélio testicular pela ação na gametogênese; estimuladora da libido e vigor sexual, conjuntamente com as vitaminas C e do complexo B; potencializando o volume e porcentagem de espermatozoides vivos no ejaculado (Ralston et al., 1986). A deficiência de vitamina A dá origem a vacuolização das células basófilas, chegando a degenerar e impedir a elaboração dos fatores



gonadotróficos e, como consequência, inibindo a produção espermática (Freitas e Oliveira, 2018).

A vitamina B₁₂ atua na estimulação do crescimento, na estimulação da síntese e maturação celular e ajuda a manter a estabilidade da cromatina do DNA. A deficiência da vitamina B₁₂ leva ao acúmulo do ácido metilmalônico, que afeta e interrompe o metabolismo mitocondrial, levando a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio. O ácido fólico (vitamina B₉), é outra vitamina hidrossolúvel do complexo B, desempenha um papel importante na síntese de DNA, através da síntese de purinas e timinas. A ingestão adequada de ácido fólico está associada a uma diminuição da frequência de alterações do DNA em espermatozoides (Freitas et al., 2016; Freitas e Oliveira, 2018). O ácido fólico está intimamente ligado à vitamina B₁₂, pois depende dela para cumprir a sua função. Devido a isso, a combinação do ácido fólico e das cobalaminas em programas de suplementação, beneficia e maximiza o impacto dessas vitaminas, levando em consideração que a vitamina B₁₂ torna o ácido fólico mais biodisponível, e que a deficiência da cobalamina torna o ácido fólico indisponível ao organismo (Banihani, 2017). Consequentemente, a deficiência desses dois fatores leva a anormalidades cromossômicas e ao aumento de EROs, gerando um risco de mutações genéticas.

O ácido ascórbico (vitamina C), é outro componente não enzimático que atua como antioxidante. A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel, que é conhecida por remover eficazmente os radicais hidroxila, superóxido e o peróxido de hidrogênio, além de desempenhar um importante papel na reciclagem da vitamina E oxidada (Deichsel et al., 2008; Contri et al., 2011; Freitas e Oliveira, 2018). Foi demonstrado que em adequadas concentrações, a vitamina C reduz a fragmentação e danos gerados ao DNA do espermatozoide. Concentrações de ácido ascórbico no plasma seminal humano estão correlacionadas, positivamente, com as porcentagens de espermatozoides morfológicamente normais e foi sugerido que esta vitamina é protetora do epidídimo, através da proteção das membranas celulares pelo seu efeito antioxidante (Mendiola et al., 2010).

A vitamina E (α -tocoferol), é uma vitamina lipossolúvel, que atua como um potente antioxidante, agindo nas membranas celulares. O α -tocoferol protege a membrana plasmática dos espermatozoides, inibindo danos induzidos por radicais livres, prevenindo a peroxidação lipídica, e melhorando a atividade de outros antioxidantes. É eficiente na remoção de radicais peróxil sendo, portanto, capaz de interromper a cadeia de reações envolvendo esse radical livre. Outras funções do α -tocoferol se relacionam à estabilização da membrana plasmática, por meio da formação de complexos envolvendo os produtos da hidrólise da vitamina E e os ácidos graxos livres da membrana plasmática (Freitas e Oliveira, 2018; Bazzano et al., 2021).

Franco et al. (2013) avaliaram os efeitos da vitamina C e vitamina E na congelabilidade do sêmen de garanhões lusitanos. Os autores incorporam 3 diferentes concentrações de vitamina C e E ao diluente de criopreservação. A vitamina E diminuiu a peroxidação dos lipídeos de membrana, enquanto vitamina C mostrou efeitos negativos. Não houve diferença para nenhum dos antioxidantes em relação a integridade da membrana mitocondrial e acrossomal. Entretanto, Cappai et al. (2021) não observaram nenhum efeito adicional na qualidade seminal de garanhões suplementados de forma oral com produto comercial contendo vitamina E, zinco e selênio.

Dentre os sistemas enzimáticos, destaca-se a glutatona peroxidase (GPx) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus álcoois correspondentes. Convertendo glutatona – forma reduzida (GSH) à glutatona – forma oxidada (GSSG), que contém duas moléculas ligadas por uma ligação dissulfeto. A GPx contém um átomo de selênio ligado, covalentemente, na forma de selenocisteína, que é essencial para que essa enzima exerça a sua função. O selênio desempenha um papel de grande importância na fertilidade masculina, não apenas por participar da regulação de várias funções fisiológicas, incluindo a proteção ao espermatozoide através da ação antioxidante, e a estabilização da membrana do espermatozoide, mas também por ser essencial na síntese da testosterona (Penã et al., 2019). O selênio é um componente da glutatona peroxidase e serve como um cofator para a redução de enzimas antioxidantes. Os efeitos negativos da deficiência de selênio incluem a diminuição da motilidade espermática, diminuição da estabilidade da peça intermediária do espermatozoide e o desenvolvimento anormal dos espermatozoides, resultando em uma taxa elevada de defeitos morfológicos (Freitas e Oliveira, 2018; Qazi et al., 2019).

Freitas et al. (2016) avaliaram o efeito da administração oral de produto comercial contendo antioxidantes (vitamina E e selênio), L-carnitina e ácidos graxos (ômega 3 e 6) na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado. O produto foi administrado por 60 dias em garanhões da raça Mangalarga Marchador, em delineamento experimental cruzado (*crossover*). Houve incremento significativo na qualidade espermática para o sêmen fresco, refrigerado e criopreservado com relação a



motilidade total e integridade de membranas plasmática e acrossomal, evidenciando o efeito sinérgico dos antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados na cinética espermática e proteção das membranas espermáticas.

A glutatona, é um tiol tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina) com inúmeras funções biológicas e encontrado amplamente no organismo animal, não só nas células somáticas como nos gametas. Esse tiol tem um papel importante na antioxição de compostos endógenos e exógenos, assim como na manutenção da condição redox intracelular. A glutatona é um reservatório natural de força redutora, que pode ser usada de forma rápida pelas células como defesa contra o estresse oxidativo. Oliveira et al. (2013) avaliaram os efeitos da glutatona em diferentes concentrações, incorporados ao diluente de criopreservação de sêmen de garanhões. A concentração de 2,5mM melhorou a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática em comparação ao grupo controle. Concentrações superiores foram deletérias aos espermatozoides.

Oliveira et al. (2014) também obtiveram resultados semelhantes com a incorporação de 2,5mM de glutatona ao diluente de criopreservação, após 24h de armazenamento sob refrigeração. Os autores observaram motilidade total, viabilidade e integridade de membrana plasmática superior em comparação ao grupo controle. Incorporando diferentes concentrações de glutatona ao diluente de refrigeração de sêmen equino, Oliveira et al. (2015b) observaram superioridade na concentração de 1,5mM de glutatona em manter a motilidade total, o vigor e a viabilidade espermática após 24h de refrigeração.

A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular contendo um grupamento tiol. É um antioxidante não enzimático que previne a peroxidação lipídica. Tanto a cisteína quanto a N-acetil-L-cisteína, são precursoras da biossíntese da glutatona e aumentam os níveis de glutatona reduzida (GSH). Resultados positivos já foram observados com a incorporação da cisteína em diluentes de refrigeração (Oliveira et al., 2015a) e criopreservação (Francisco Júnior et al., 2015) de sêmen equino.

Considerações finais

Os resultados obtidos nos últimos anos mostram que nutracêuticos e antioxidantes quando utilizados de maneira individual, sejam incorporados nos diluentes de sêmen ou de forma oral, apresentam resultados marginais ou não diferem do grupo controle, mas quando utilizados em combinação, essas substâncias podem apresentar efeito sinérgico, o que é evidenciado como melhoria na qualidade seminal, seja do sêmen fresco, refrigerado ou criopreservado.

Referências

- Aitken RJ.** Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*, v.84, p.1039-1052, 2017.
- Aitken RJ, Drevet JR.** The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword. *Antioxidants*, v.9, 111, 2020.
- Aurich C.** Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.65-75, 2005.
- Arruda RP, Silva DF, Alonso MA, Andrade AFC, Nascimento J, Gallego AM, Martins SMMK, Granato TM.** Nutraceuticals in reproduction of bull and stallions. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.393-400, 2010.
- Ball BA.** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.257-267, 2008.
- Banihani SA.** Vitamin B₁₂ and semen quality. *Biomolecules*, v.7, 42, 2017.
- Barker CAV, Gandier JCC.** Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Comp Med Vet Sci*, v.21, p.47-51, 1957.
- Bazzano M, Laus F, Spaterna A, Marchegiani A.** Use of nutraceuticals in the stallion: Effects on semen quality and preservation. *Reprod Dom Anim*, v.56, p.951-957, 2021.
- Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day B, Wilson ME.** Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v.63, p.1519-1527, 2005.
- Cappai MG, Taras A, Cossu I, Cherchi R, Dimauro C, Accioni F, Boatto G, Deroma M, Spanu E, Gatta D, Dall'Aglio C, Pinna W.** Effects of dietary Zn/Se and α -tocopherol supplementation on metabolic milieu, haemogram and semen traits of breeding stallions. *Biol Trace Elem Res*, v.199, p.3287-



3296, 2021.

Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, p.1201-1210, 2011.

Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, Carluccio A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, v.75, p.1319-1326, 2011.

Deichsel K, Palm F, Koblichke P, Budik S, Aurich C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, v.69, p.940-945, 2008.

Dharti TS, Gandhi S, Shah M. Nutraceutical – Portmanteau of science and nature. *Int J Pharm Sci Rev Res*, v.5, p.33-38, 2010.

Francisco Júnior A, Oliveira RA, Oliveira FJG, Filho BDO, Gambarini ML. Cisteína como antioxidante para a criopreservação de sêmen de garanhões considerado de baixa congelabilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.301-306, 2015.

Franco JSV, Chaveiro A, Góis A, Silva FM. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.787-793, 2013.

Freitas ML, Bouéres CS, Pignataro TA, Oliveira FJG, Viu MAO, Oliveira RA. Quality of fresh, cooled and frozen semen from stallions supplemented with antioxidants and fatty acids. *J Equine Vet Sci*, v.46, p.1-6, 2016.

Freitas ML, Oliveira RA. Nutraceutical in male reproduction. *Braz J Vet Med*, v.40, e220118, 2018.

Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J, Smith ND, Aitken RJ. L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biol Reprod*, v.93, p.1-9, 2015.

Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Iuliis GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Anim Reprod Sci*, v.220, 106456, 2020.

Grady ST, Cavinder CA, Brinkso SP, Forrest DW, Sawyer JE, Scott BD. Dietary supplementation of two varying sources of n-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. *Pro Anim Sci*, v.25, p.768-773, 2009.

Griffin RA, Baker M, Aitken RJ, Swegen A, Gibb Z. What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction*, v.158, p.125-137, 2019.

Heckenbichler S, Deichsel K, Aurich C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology*, v.75, p.849-856, 2011.

Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod*, v.2, p.87-102, 1996.

Ko EY, Sabanegh ES. The role of nutraceuticals in male fertility. *Urol Clin North Am*, v.41, p.181-193, 2014.

Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril*, v.21, p.217-219, 2010.

Miller CD. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, v.70, p.463-468, 2008.

Nery IHAV, Silva RAJA, Souza HM, Arruda LCP, Monteiro MM, Seal DCM, Silva GR, Silva TMS, Carneiro GF, Batista AM, Câmara DR, Guerra MMP. Effects of L-carnitine on equine semen quality during liquid storage. *Biopreserv Biobank*, v.18, p.403-409, 2020.

Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.1148-1152, 2013.

Oliveira RA, Piersanti RL, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Glutathione for the freezing of cooled equine semen, using different protocols. *Anim Reprod*, v.11, p.104-109, 2014.

Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Cooling of equine semen at 16°C for 36h with the addition of cysteine in different concentrations. *Pferdeheilkunde*, v.31, p.27-32, 2015a.

Oliveira RA, Viu MAO, Gambarini ML. Refrigeração do sêmen equino a 16°C por 36h com adição de glutatona em diferentes concentrações. *Semina*, v.36, p.3699-3704, 2015b.

Oliveira RA, Scarlet D, Ille N, Aurich C. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. *Theriogenology*, v.89, p.289-294, 2017.

Palmero S, Bottazi C, Costa M, Leone M, Fugassa E. Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Horm Metab Res*, v.32, p.87-90, 2000.

Peña FJ, O'Flaherty, Rodríguez JMO, Cano FEM, Gaitskell-Phillips GL, Gil MC, Ortega-Ferrusola C. Redox Regulation and Oxidative Stress: The Particular Case of the Stallion Spermatozoa.



Antioxidants, v.8, 567, 2019.

Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng CJ, Meng Q, Han H, Zhou G. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: A review of past and present evidences. *Antioxidants*, v.8, 268, 2019.

Ralston SL, Rich GA, Jackson S, Squires EL. The effect of vitamin A supplementation on seminal characteristics and vitamin A absorption in stallions. *J Equine Vet Sci*, v.6, p.203-207, 1986.

Rodrigues PG, Moura RS, Rocha LGP, Bottino MP, Nichi M, Maculan R, Bertechini AG, Souza JC. Dietary Polyunsaturated fatty acid supplementation improves the quality of stallion cryopreserved semen. *J Equine Vet Sci*, v.54, p.18-23, 2017.

Schmid-Lausigk Y, Aurich C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology*, v.81, p.966-973, 2014.
