

ISSN 1982-1263

https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n8a399.1-7

# Uso de peroxidação lipídica na avaliação da ação de antioxidante em sêmen criopreservado

Matheus Alves dos Santos<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>2</sup>, Jerfferson Hallison Lustosa da Silva<sup>3</sup>, Filipe Nunes Barros<sup>3</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>3</sup>, Deyse Naira Mascarenhas Costa<sup>4\*</sup>

Resumo. O processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática e a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelação de sêmen pode auxiliar na proteção dos espermatozoides contra o dano induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo perda da motilidade de forma irreversível, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA, interferindo na capacidade de fertilização do espermatozoide. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Hidroxi butiltolueno (BHT) e extrato etanólico da casca do caule do mufumbo (Cumbretum leprosum) ao diluidor Botucrio<sup>®</sup> para criopreservação de sêmen equino. Foram coletados quatro ejaculados de quatro garanhões da raça Quarto de Milha, por meio de vagina artificial. Após a descongelação das amostras em banho Maria a 37º C foi estimada a taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides pela medida do nível de malonaldeído. O delineamento experimental foi em bloco ao acaso. As variáveis de volume seminal, motilidade espermática, vigor espermático e HOST foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média foi utilizado o teste Tukey, na probabilidade de 5%. A quantificação malonaldeído foi submetida à análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. Não houve diferença, pois o acréscimo de BHT nas concentrações 5, 1,0 e 2,0 mM de BHT e de extrato de mufumbo nas doses de 30, 60 e 120 mg ao diluidor Botucrio não melhorou a qualidade espermática. Desta forma, os antioxidantes não foram determinantes em promover a diminuição formação de radicais livres e, consequentemente, não melhoraram a qualidade do sêmen após a crioinjúria provocando danos à membrana dos espermatozoides. A suplementação nas doses 0,5, 1,0 e 2,0 mM de BHT e de extrato de mufumbo nas doses de 30, 60 e 120 mg ao diluidor botucrio<sup>®</sup> não influenciou na qualidade seminal pós criopreservação.

Palavras chave: equino, espermatozoide, estresse oxidativo

# Use of lipid peroxidation in the evaluation of antioxidant action in cryopreserved semen

**Abstract.** The cryopreservation process causes oxidative stress to the sperm cell and the addition of antioxidants to the semen refrigeration and freezing media can help to protect the sperm against the damage induced by the reactive oxygen species (ROS), including

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Estudante do Curso de Engenharia Agronômica na Universidade Estadual do Tocantins – UNITINS. Palmas – TO, Brasil.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Professora adjunta na Universidade Federal do Sergipe, Campus do Sertão, Nossa Senhora da Glória- SE, Brasil.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal- LBRA- Universidade Federal do Piauí- UFPI. Teresina- PI, Brasil.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Professora adjunta na Universidade Estadual do Tocantins – UNITINS, Campus Palmas. Palmas – TO, Brasil.

<sup>\*</sup>Autor para correspondência, E-mail: deysevet2008@gmail.com

Santos et al. 2

irreversible loss of motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation, interfering in the sperm fertilization capacity. The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of the antioxidants Hydroxy butyltoluene (BHT) and ethanolic extract of the stem shell of the Cumbretum leprosum to the Botucrio<sup>®</sup> diluent for cryopreservation of equine semen. Four ejaculates of four Quarter Horse stallions were collected through artificial vagina. After thawing the samples in a water bath at 37°C, the lipid peroxidation rate of spermatozoa was estimated by measuring the level of malonaldehyde. The experimental design was a randomized block design. The variables of seminal volume, sperm motility, sperm vigor and HOST were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the procedure general linear models (Proc GLM) and for Tukey test, in the probability of 5%. The malonaldehyde quantification was submitted to Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey as post hoc test, in the probability of 5%. There was no difference, since the increase of BHT in concentrations 5, 1.0 and 2.0 mM of BHT and of Cumbretum leprosum extract in doses of 30, 60 and 120 mg to Botucrio diluent did not improve in sperm quality. In this way the antioxidants were not determined in promoting the decrease free radical formation and, consequently, did not improve the quality of the semen after the cryoinjury causing damage to the spermatozoa membrane. Supplementation at 0.5, 1.0 and 2.0 mM doses of BHT and Cumbretum leprosum extract at doses of 30, 60 and 120 mg to the botucrio diluent did not influence the seminal quality after cryopreservation.

**Keywords**: equine, spermatozoa, oxidative stress

# Uso de peroxidación lipídica en la evaluación de la acción de antioxidante en semen criopreservado

Resumen. El proceso de crio-preservación acarrea estrés oxidativo a la célula espermática y la adición de antioxidantes a los medios de refrigeración y congelación de semen puede auxiliar en la protección de los espermatozoides contra el daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo pérdida de la motilidad de forma irreversible, peroxidación lipídica y fragmentación del ADN, interfiriendo en la capacidad de fertilización del espermatozoide. Objetivos: Se objetivó con este trabajo evaluar el efecto de la adición de los antioxidantes Hidroxi butiltolueno (BHT) y extracto etanólico de la corteza Cumbretum leprosum al diluyente Botucrio® para crio-preservación de semen equino. Metodología: Se recogieron cuatro eyaculados de cuatro sementales de la raza Cuarto de Milla, por medio de vagina artificial. Después de la descongelación de las muestras en baño María a 37°C se estimó la tasa de peroxidación lipídica de los espermatozoides por la medida del nivel de malonaldehído. El delineamiento experimental fue en bloque al azar. Las variables de volumen seminal, motilidad espermática, vigor espermático y HOST fueron sometidas a análisis de varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento modelos lineales generales (Proc GLM) y para comparación de media se utilizó la prueba Tukey, en la probabilidad del 5%. La cuantificación malonaldehído fue sometida a análisis de varianza (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc test, en la probabilidad del 5%. Resultados y Discusión: No hubo diferencia, pues el aumento de BHT en las concentraciones 5, 1,0 y 2,0 mM de BHT y de extracto de Cumbretum leprosum en las dosis de 30, 60 y 120 mg al diluyente Botucrio no mejoró la calidad espermática. De esta forma los antioxidantes no fueron determinantes en promover la disminución formación de radicales libres y, consecuentemente, no mejoraron la calidad del semen después de la crioinjúria provocando daños a la membrana de los espermatozoides. Conclusión: La suplementación en las dosis 0,5, 1,0 y 2,0 mM de BHT y de extracto de Cumbretum leprosum en las dosis de 30, 60 y 120 mg al diluyente botucrio<sup>®</sup> no influenció en la calidad seminal post crio-preservación.

Palabras clave: equino, espermatozoide, estrés oxidativo

### Introdução

A criação de equinos é um importante segmento no agronegócio brasileiro. Sua contribuição inclui pecuária, cultura, esporte, lazer e ecoturismo. A equinocultura movimenta média de 7,5 bilhões de reais por ano na economia nacional (Lima & Cintra, 2016; Vieira, 2011).

As técnicas de reprodução assistida possuem o potencial de aperfeiçoar o melhoramento genético, tornando-o mais eficaz e seguro nos equinos, impulsionando pesquisas para aperfeiçoar a aplicabilidade destas técnicas, promovendo a melhoria dos índices reprodutivos a campo (Silva & Guerra, 2011). Em contrapartida, o processo de criopreservação constitui-se estressante sobre as células espermáticas promovendo a diminuição de espermatozoides viáveis por dose. Uma das injúrias é a peroxidação lipídica, promovida pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de metabólitos do oxigênio (ROS), os quais estão diretamente associados ao declínio da fertilidade (Estela et al., 2013).

A peroxidação lipídica inicia na presença de ROS, que tendo contato com o ácido decosa-hexanoíco da membrana espermática, retira um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que irá reagir com outro ácido decosa-hexanoíco, danificando a célula (Ferreira & Matsubara, 1997). Antioxidantes são substâncias que retardam a oxidação, por um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (Carocho et al., 2018; Lashkari et al., 2018; Salami et al., 2016). O Hidroxi Butil-Tolueno (BHT) tem sido utilizado e com algum sucesso para melhorar a qualidade pós-descongelação do sêmen de outros animais, como suínos (Neagu et al., 2010), búfalos (Ijaz et al., 2009) e touros (Shoae & Zamiri, 2008). Verifica-se eficaz redução da lesão ao choque frio e na sobrevivência do espermatozoide após descongelação (Estela et al., 2013). Demyda-Peyras et al. (2013) verificaram que adicionando BHT ao sêmen, melhorou a integridade da membrana espermática, motilidade e sobrevivência das células espermáticas.

Baseando-se no exposto, objetivou-se avaliar, via teste de peroxidação lipídica, a ação dos antioxidantes Hidroxi butiltolueno (BHT) e extrato etanólico da casca do caule do mufumbo (*Cumbretum leprosum*) acrescidos em diferentes concentrações ao diluidor Botucrio<sup>®</sup> para criopreservação de sêmen equino.

### Material e método

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Tocantins sob o protocolo de 03993/2017.1.

Foram utilizados quatro garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre cinco a dez anos, alojados individualmente em baias no Centro de Treinamento Haras Ouro Verde, localizado no município de José de Freitas, Piauí, Brasil. Todos os garanhões tiveram sua fertilidade comprovada, por meio de exame andrológico, realizado num período anterior às colheitas de sêmen. Quatro ejaculados por animal foram colhidos por meio de vagina artificial, usando uma fêmea em estro como manequim, com intervalo mínimo de 48 horas entre as colheitas, num total de 16 ejaculados.

Imediatamente após a colheita, foram analisados, visualmente, o volume, o aspecto e a cor e, sob microscopia convencional, a motilidade total e o vigor, segundo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal- CBRA. Uma alíquota de 10µL de sêmen de cada ejaculado foi diluído em 1 mL de citrato de sódio formalizado para a determinação da concentração espermática, utilizando-se a câmara de Neubauer (espermatozoide/mL) para a análise morfológica, por meio da técnica da câmara úmida. Após essas análises, os ejaculados com motilidade mínima de 60% e vigor três, foram diluidos no meio de resfriamento Botu-sêmen® (Biotech Botucatu, Botucatu-SP, Brasil) na razão de 1:1, perfazendo um total de 10 mL de solução sêmen:diluente.

As amostras foram centrifugadas a 650g por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e os "pellets" ressuspendidos com o meio de congelação Botu-crio® (Biotech Botucatu, Botucatu- SP, Brasil) (gema de ovo, glicerol, metilformamida) de acordo com os grupos experimentais, previamente estabelecidos: Experimento I: T1= Botucrio (controle); T2 = Botucrio+ extrato 30 mg; T3 = Botucrio+ extrato 60mg; T4 = Botucrio + extrato 120 mg) e Experimento II T1= Botucrio (controle); T2 = Botucrio + BHT 0,5 mM; T3 = Botucrio + BHT 1,0 mM; T4 = Botucrio + BHT 2,0mM), obedecendo à concentração de 100 x 106 espermatozoides/ ml por palheta de 0,5 mL, previamente identificadas.

Santos et al. 4

As palhetas foram armazenadas em recipiente plástico e mergulhadas em béquer contendo água. O recipiente foi acondicionado em geladeira, com temperatura interna de 4 a 5° C, durante 20 minutos (Fürst et al., 2005). Após o resfriamento em geladeira, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido, colocando- as sobre um suporte de aço inox, a uma altura de 3 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido de 5 cm de altura, acondicionado em uma caixa de isopor de 37 L.

As amostras foram descongeladas em Banho-Maria a 37° C por 30 segundos e o sêmen avaliado quanto à motilidade e ao vigor, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos (Teste de Termoresistência), e submetidas ao teste de peroxidação lipídica que foi realizado no Laboratório Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí.

A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do nível de malonaldeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito por Buege & Aust (1978). Os níveis de malonaldeído foram medidos após a suplementação de 500 μL de sêmen pós-criopreservado, maisTampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de 59 ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada em água fervente (100° C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas a 1.200g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer – Lambda). A concentração de MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20 mmol. O MDA produzido foi expresso em μmol de TBARS/mL de diluidor.

O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro blocos (animais) e quatro repetições (coletas). As variáveis de volume seminal, motilidade espermática, vigor espermático e HOST foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média foi utilizado o teste Tukey, na probabilidade de 5%. A quantificação malonaldeído foi submetida à Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas pelo programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2004).

#### Resultados e discussão

Os valores para a motilidade e vigor do sêmen fresco observados no presente estudo mostram que o perfil seminal dos garanhões está de acordo com os valores preconizados pelo CBRA, (2013). Os animais 1 e 2 apresentaram características seminais superiores às características dos animais 3 e 4 nos valores referentes ao vigor espermático. O garanhão 4 apresentou menor valor de motilidade espermática e o menor volume. Não houve diferença significativa (P > 0,05) quanto ao percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico entre os grupos testados (Tabela 1).

| Garanhão | Volume (ml)          | Motilidade (%)             | Vigor (0-5)        | HOST (%)          |
|----------|----------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|
| 1        | $27,25 \pm 3,20^{a}$ | $81,25 \pm 6,29a$          | $3,75 \pm 0,50$ a  | $40,13 \pm 3,17a$ |
| 2        | $27,00 \pm 2,45a$    | $77,50 \pm 5,00a$          | $3,25 \pm 0,50$ ab | $39,00 \pm 4,43a$ |
| 3        | $27,25 \pm 2,22a$    | $75,00 \pm 4,08a$          | $3,00 \pm 0,00b$   | $38,50 \pm 2,74a$ |
| 4        | $19,00 \pm 3,37$ b   | $61,25 \pm 2,50 \text{ b}$ | $3,00 \pm 0,00b$   | $39,00 \pm 3,09a$ |
| P-valor  | <0,001               | 0,035                      | 0,003              | 0,918             |

**Tabela 1.** Médias e desvios-padrão das características do sêmen fresco de garanhões da Raca Quarto de Milha

Médias com letras minúsculas diferentes na coluna apresenta diferença estatisticamente significativa (p-valor < 0,05).

Em relação aos constituintes das membranas celulares, os espermatozoides equinos contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídios, 13,0% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Dentre os lipídios neutros, o colesterol é o que apresenta o teor mais variável entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, variando de 13 a 37% do total de lipídeos. A composição da membrana está intimamente relacionada às injúrias causadas pelos processos de refrigeração e criopreservação (CBRA, 2013). Os ácidos graxos insaturados em concentração mais elevada são: ácido araquidônico (18%), ácido docosapentanóico (17%), ácido oleico (5%) e ácido docosahexanóico (8%). A proporção de ácidos graxos insaturados para ácidos graxos saturados nos

fosfolipídios dos espermatozoides de garanhão é de 0,90 (Chow et al., 1986). Essa alta proporção de ácidos graxos insaturados é outro ponto de vulnerabilidade dos espermatozoides aos efeitos de ROS.

Essas características podem não favorecer a ação dos antioxidantes, inibindo-os e anulando o potencial oxidativo (Watson, 2000). A alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana espermática equina corroborou para que os antioxidantes não melhorasse a qualidade espermática pós criopreservação, pois a torna mais suscetível a peroxidação (Tremellen, 2008).

Segundo pesquisa realizada por Betancur et al. (2012), a maior suscetibilidade da membrana plasmática das células espermáticas de alguns indivíduos ou espécies para os danos peroxidativos é atribuída ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e pela ineficiente disponibilidade de enzimas citoplasmáticas, que promovem a diminuição dos danos oxidativos, pois foram perdidas durante a espermatogênese e a trajetória do ejaculado pelo trato reprodutor masculino. O tipo de fosfolipídios e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática também influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que possuem maior proporção de fosfatidilcolina: fosfatidil etanolamina são mais resistentes, enquanto espécies que possuem maior conteúdo de proteína são menos resistentes (Morrell et al., 2013). Certamente a menor razão fosfatidilcolina:fosfatidil etanolamina presente na membrana espermática de cavalos foi determinante para a mínima ação dos antioxidantes em estudo.

O estudo realizado por Morillo-Rodríguez et al. (2012) concluiu que o efeito do BHT na concentração 1,0 mM acrescido ao diluidor para sêmen equino, não encontrou diferença significativa nos percentuais de membrana integra entre a população de espermatozoides em comparação ao grupo controle (não suplementado) corroborando com nossos resultados. A avaliação da concentração ideal de BHT para a refrigeração de sêmen equino é fundamental, uma vez que a geração controlada de ROS está associada com eventos de sinalização e regulação de funções fisiológicas normais, como capacitação, hiperativação espermática e reação acrossomal, interferindo diretamente nos resultados de fertilidade (García et al., 2011). Sendo assim, a adição excessiva de antioxidantes nos diluentes pode neutralizar o estresse oxidativo, mas também pode interferir no papel fisiológico das ROS, resultando em baixos índices reprodutivos.

**Tabela 2**. Quantificação de MDA em sêmen pós-criopreservado de garanhões diluído em Botucrio e acrescidos de doses de BHT 0,5; 1,0; e 2,0mM e Extrato de mufumbo (*Combretum leprosum*) 30,60 e 120 mg analisados por Teste de Peroxidação Lipídica.

| Tratamentos | MDA               |
|-------------|-------------------|
| BHT 0,5     | $0.071 \pm 0.067$ |
| BHT 1,0     | $0.070 \pm 0.006$ |
| BHT 2,0     | $0.070 \pm 0.002$ |
| Extrato 30  | $0.072 \pm 0.005$ |
| Extrato 60  | $0.074 \pm 0.006$ |
| Extrato 120 | $0.004 \pm 0.074$ |
| Controle    | $0.076 \pm 0.018$ |

Médias com letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatisticamente significativa (p-valor < 0,05). MDA: Malonaldeído.

O BHT foi testado em espermatozoides de búfalos (Ijaz et al., 2009), touros (Ansari et al., 2011; Shoae & Zamiri, 2008), bodes (Memon et al., 2011; Naijian et al., 2013), cães (Neagu et al., 2010) e suínos (Roca et al., 2004; Trzcińska et al., 2015), demonstrando aumento na motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Todavia, há poucos estudos avaliando a influência do BHT sobre espermatozoides equinos e as avaliações, tanto em sêmen refrigerado quanto congelado, não demonstraram melhora na cinética e viabilidade espermática em relação ao grupo controle (Ball et al., 2001; Morillo-Rodríguez et al., 2012).

O sêmen equino quando submetido à criopreservação tem sua viabilidade e fertilidade reduzida devido ao estresse oxidativo, resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e antioxidantes (Andrade et al., 2010; Watson, 2000). Não houve diferença, pois os antioxidantes que foram utilizados na diluição do sêmen, não diminuíram a quantidade de radicais livres formados, e consequentemente, não melhoraram a qualidade do sêmen. Avaliando-se a capacidade do BHT e do

Santos et al. 6

extrato de mufumbo em conter a peroxidação lipídica e produção de radicais livres após teste de indução da geração de ROS, observou-se diferença significativa entre os grupos controle.

O resultado insatisfatório do extrato de mufumbo pode justificar-se pela ausência de interação deste com a gema de ovo presente na composição do diluente não sendo capaz de protegê-la das crioinjúrias. Esta hipótese é embasada nos resultados de Khalifa et al. (2008) que, ao criopreservar sêmen de caprinos, obtiveram os melhores resultados com diluente a base de gema de ovo acrescidos de cisteina.

A suplementação nas doses 0,5, 1,0 e 2,0 mM de BHT ou nas doses de 30, 60 e 120 mg de extrato de mufumbo ao diluidor Botucrio não influencia na qualidade seminal pós criopreservação, uma vez que não diferiu estatisticamente do controle.

### Referências bibliográficas

- Andrade, E. R., Melo-Sterza, F. A., Seneda, M. M. & Alfieri, A. A. (2010). Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34(2):79-85.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A. & Akhter, S. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene supplementation in extender on motility, plasmalemma and viability of Sahiwal bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(2):311-314.
- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G. & Baumber, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, 56(4):577-589.
- Betancur, G. R., López, E. P. & Rojano, B. A. (2012). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1):128-136.
- Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52302-310.
- Carocho, M., Morales, P. & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71107-120. doi: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008.
- CBRA. (2013). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (pp. 127): Colégio Brasileiro de Reprodução.
- Chow, P. Y. W., White, I. G. & Pickett, B. W. (1986). Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal Reproduction Science*, 11207-213.
- Demyda-Peyras, S., Membrillo, A., Bugno-Poniewierska, M., Pawlina, K., Anaya, G. & Moreno-Millán, M. (2013). The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: a case of sex chromosome chimerism in a Spanish purebred colt. *Cytogenetic and genome research*, 141(4):277-283.
- Estela, F., Silva, T. F., Georgia, C., Vitória, G. G., Silva, J. F., Varela Júnior, A. S., . . . Corcini, C. D. (2013). Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 108103-112.
- Ferreira, A. L. A. & Matsubara, L. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1):61-68.
- Fürst, R., Carvalho, G. R., Fürst, M. C. O., Ruas, J. R. M., Borges, A. M. & Mafilli, V. (2005). Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(5):599-607.
- García, B. M., Fernández, L. G., Ferrusola, C. O., Salazar-Sandoval, C., Rodríguez, A. M., Martinez, H. R., . . . Pena, F. J. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1):141-148.
- Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M. S. & Rehman, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 71(8):1326-1329.
- Khalifa, T. A. A., Lymberopoulos, A. G. & El-Saidy, B. E. (2008). Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(5):525-530.

- Lashkari, S., Habibian, M. & Jensen, S. K. (2018). A Review on the role of chromium supplementation in ruminant nutrition Effects on productive performance, blood metabolites, antioxidant status, and immunocompetence. *Biological Trace Element Research*, 186(2):305-321. doi: https://doi.org/10.1007/s12011-018-1310-5.
- Lima, R. A. S. & Cintra, A. G. (2016). Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília, Brasil: MAPA.
- Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y. M., Ebrahimi, M., Nadia, F. M. & Audrey, G. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science*, 129(1–2):44-49.
- Morillo-Rodríguez, A., Macías-García, B., Tapia, J. A., Ortega-Ferrusola, C. & Pena, F. J. (2012). Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. *Andrologia*, 44688-695.
- Morrell, J. M., Winblad, C., Georgakas, A., Stuhtmann, G., Humblot, P. & Johannisson, A. (2013). Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, 140(1-2):62-69.
- Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., Sharafi, M. & Bucak, M. N. (2013). Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze—thaw process. *Cryobiology*, 66(2):151-155.
- Neagu, V. R., García, B. M., Sandoval, C. S., Rodríguez, A. M., Ferrusola, C. O., Fernández, L. G., . . . Peña, F. (2010). Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 73(5):645-650.
- Roca, J., Gil, M. A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J. M. & Martinez, E. A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 25(3):397-405.
- Salami, S. A., Guinguina, A., Agboola, J. O., Omede, A. A., Agbonlahor, E. M. & Tayyab, U. (2016). Review: *In vivo* and *postmortem* effects of feed antioxidants in livestock: a review of the implications on authorization of antioxidant feed additives. *Animal* 1375-1390.
- SAS. (2004). SAS/STAT User guide, Version 9.1.2. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Shoae, A. & Zamiri, M. J. (2008). Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4):414-418.
- Silva, S. V. & Guerra, M. M. P. (2011). Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(4):370-384.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3):243-258.
- Trzcińska, M., Bryła, M., Gajda, B. & Gogol, P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83(3):307-313.
- Vieira, E. R. (2011). Aspectos econômicos e sociais do complexo agronegócio cavalo no estado de Minas Gerais. (1). Minas Gerais.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60481-492.

Recebido: 19 de junho, 2019. Aprovado: 19 de julho, 2019. Publicado: 30 de setembro, 2019.

**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.