

## Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias *Cryopreservation effects on sperm cells and alternatives for crioinjury reduction*

S.V. Silva<sup>1</sup>, M.M.P. Guerra<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD/CAPES), Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [mpguerra@dmv.ufrpe.br](mailto:mpguerra@dmv.ufrpe.br)

### Resumo

A introdução de biotecnologias na reprodução animal teve como objetivo aumentar a propagação de material genético de alto valor em menor espaço de tempo. Em contrapartida, a manipulação de gametas masculinos com o intuito de preservá-los e utilizá-los por longos períodos ocasiona danos à estrutura espermática, que podem comprometer a sua função biológica. Desta forma, objetivou-se com esta revisão estudar a interferência da criopreservação sobre a célula espermática, avaliando quais os fatores que reduzem a viabilidade do espermatozoide, quando submetido a baixas temperaturas, assim como destacar possíveis agentes que diminuam os efeitos deletérios da criopreservação.

**Palavras-chave:** antioxidantes, crioprotetores, espermatozoide.

### Abstract

*Introduction of biotechnology in animal breeding aimed to increase the spread of genetic material of high value in a shorter time. In contrast, the manipulation of male gametes in order to preserve them and use them for long periods cause damage to sperm structure, which can compromise their biological function. Thus, the aim with this review study the influence of cryopreservation on the sperm cell, evaluating factors that reduced viability of sperm, when subjected to low temperatures, as well as possible agents that reduce the deleterious effects of cryopreservation.*

**Keywords:** antioxidants, cryoprotectants, spermatozoon.

### Introdução

Segundo Castelo et al. (2008), os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm maior quantidade de espermatozoides do que o necessário para a fecundação. Desta forma, o processo de diluição do sêmen pode contribuir para o aproveitamento de um ejaculado para um maior número de fêmeas. De acordo com as utilizações, o sêmen pode ser classificado em fresco ou *in natura*, o qual é colhido, analisado e fracionado sem utilização de artificios para preservar o material fecundante; *in natura* diluído, que compreende as amostras acrescidas de diluente específico com o objetivo de aumentar o volume, proporcionando uma concentração de espermatozoides homogênea (Bicudo et al., 2003).

Sêmen refrigerado é aquele colhido, analisado e diluído, com a finalidade de proteger os espermatozoides durante a redução da temperatura a 5°C, além de atuar como expensor do volume seminal, facilitando seu fracionamento (Bicudo et al., 2003). Sousa e Bicudo (2003) reportaram índices de prenhez para a espécie ovina similares após inseminação artificial (IA) realizada com sêmen *in natura* e/ou refrigerado. Milczwski e Kozicki (2000), ao utilizarem sêmen ovino refrigerado, obtiveram diferentes resultados em decorrência do local de deposição, sendo mais satisfatória a inseminação intrauterina, comparada à cervical. Estes achados também foram observados por Machado et al. (2006). Estes autores enfatizaram que é viável preservar por certo período a qualidade do sêmen refrigerado, sendo os resultados de prenhez mais influenciados pela via de inseminação e local de deposição do sêmen do que pelos diluentes adicionados.

Sêmen congelado é a amostra que foi colhida, analisada, conservada e estocada em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C, possibilitando sua conservação e utilização por tempo indeterminado (Carneiro et al., 2007). Na utilização do sêmen congelado, entretanto, o índice de prenhez obtido é inferior ao encontrado quando do uso de ejaculados *in natura* ou após processo de refrigeração. Luz et al. (2000), em trabalho de campo, observaram que a motilidade espermática pós-descongelamento estava relacionada com os índices de prenhez obtidos. Estes ressaltaram que, após a descongelamento, o índice de motilidade espermática deve ser superior a 40% visando obter taxa de prenhez superior a 50%, enquanto motilidade espermática inferior a 40% reduz para 15% o percentual de fêmeas ovinas prenhes.

Analisando-se os trabalhos realizados com as diferentes apresentações de sêmen, em relação ao estado de conservação, foi observado que partidas congeladas apresentam índices de gestação inferiores, quando comparados aos obtidos utilizando-se ejaculados *in natura* diluídos e refrigerados (Carneiro et al., 2007). Desta forma, objetivou-se com esta revisão estudar a interferência da criopreservação sobre a célula espermática,

avaliando quais os fatores que reduzem a viabilidade do espermatozoide, quando submetido a baixas temperaturas, assim como destacar possíveis agentes que diminuam os efeitos deletérios da criopreservação.

### **Criopreservação**

Criobiologia é o ramo da biologia que estuda os efeitos de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos. Na prática, a criobiologia estuda compostos ou sistemas biológicos submetidos a temperaturas inferiores às fisiológicas para cada organismo. Com o resultado dos conhecimentos da criobiologia, desenvolveu-se a criopreservação, tecnologia por meio da qual células, tecidos ou embriões são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, tendo como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido (Pegg, 2002).

O processo de criopreservação requer que as amostras de espermatozoides sejam submetidas a refrigeração moderada e controlada, visando preservar a sua função, que é a fecundação do oócito (Holt, 2000). Segundo Kumar et al. (2003), o controle na redução da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, por diminuir a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula. Diversos estudos sugerem que espermatozoides de diferentes espécies possuem propriedades criobiológicas específicas e graus de sensibilidade variados para manipulação experimental, choque térmico (transições da fase lipídica), congelação e tolerância osmótica (Ladha, 1998; Watson, 2000; Purdy, 2006).

Além de diferenças espécies-específicas, são observadas variações entre indivíduos, ejaculados de um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo ejaculado, variações entre subpopulações espermáticas (Rodríguez-Martínez, 2003), o que explica as respostas diversificadas à criopreservação de sêmen de um mesmo reprodutor (Petrunkina, 2007).

### **Efeitos da criopreservação**

O processo de criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelação), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (Castelo et al., 2008). Todavia, a criopreservação de sêmen é um processo que promove grande estresse celular e impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (Purdy, 2006).

O termo choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos submetida à refrigeração rápida da temperatura corpórea ( $\pm 38^{\circ}\text{C}$ ) a temperaturas próximas a  $5^{\circ}\text{C}$ , resultando no decréscimo irreversível da motilidade espermática, assim como em mudanças na bioquímica e no funcionamento destes gametas, incluindo: redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (Watson, 2000).

Outro ponto crítico da criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e conseqüente alteração na função do espermatozoide (Fahy, 1980). Segundo Watson (1995), quando a célula espermática é submetida a congelação lenta, há tempo suficiente para que grande quantidade de água intracelular migre para o ambiente extracelular, estabelecendo o equilíbrio entre solvente e soluto. Desta forma, torna-se estritamente necessária a descongelação na mesma intensidade, ou seja, de forma lenta, para que a célula, ao ser reidratada, não sofra rompimentos das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular.

O processo de congelação rápida, aliado à descongelação lenta, implicará danos causados pela formação de pequenos cristais de gelo, os quais podem se agrupar formando cristais grandes, que rompem a membrana (Watson, 2000). Importante salientar que a curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (Snoeck, 2003).

Segundo Ladha (1998), a membrana plasmática de espermatozoides é rica em fosfolipídeos e fisiologicamente assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomiéline localizadas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina encontram-se situadas no folheto interno. Durante a criopreservação, a membrana plasmática sofre modificações para se adequar às mudanças de temperatura, como o movimento de translocação de fosfolipídeos, com externalização da fosfatidilserina. Transformações ocorridas nas membranas espermáticas durante o procedimento de congelação/dcongelação assemelham-se às alterações fisiológicas da capacitação (Silva et al., 2009a).

No entanto, os mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos entre os folhetos interno e externo da membrana plasmática, como a fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol, observados nos espermatozoides criopreservados (Silva e Gadella, 2006), diferem daqueles observados no processo fisiológico da capacitação. Segundo Thomas et al. (2006), semelhante à capacitação, a criopreservação provoca na membrana plasmática estado de maior fluidez e exposição a sítios de ligação a moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar.

Os efeitos tóxicos do oxigênio são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis,

cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, mediada por ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS; Gille e Singler, 1995). A reação destas espécies com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, desencadeia o processo denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (Williams e Ford, 2005).

Segundo Jones e Mann (1977), o espermatozoide ovino é altamente susceptível à peroxidação dos fosfolipídeos presentes na membrana plasmática, ocasionando extensas alterações estruturais, especialmente na região acrossomal, perda rápida e irreversível da motilidade espermática, modificações no metabolismo da célula e do conteúdo intracelular. Neid et al. (2002) observaram que a célula espermática de equinos, quando congelada/descongelada, sofre maior ação da peroxidação lipídica do que a célula refrigerada, ou não exposta à criopreservação. Estes resultados também foram encontrados no sêmen de bubalinos (Kadirvel et al., 2009). Sabe-se que a presença das duplas ligações nas moléculas da membrana plasmática faz com que haja vulnerabilidade da célula espermática à ação das ROS, iniciando a cascata da lipoperoxidação, com o objetivo de estabilizar os elétrons desemparelhados destes radicais (Irvine, 1996).

### Redução das crioinjúrias

Crioprotetor é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (Purdy, 2006). Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se bons crioprotetores. Os crioprotetores utilizados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (Medeiros et al., 2002).

Os componentes do diluente de criopreservação são classificados como extracelulares ou não-penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose, trealose), lipoproteínas da gema do ovo, água de coco (Nunes, 2002), proteínas do leite e alguns aminoácidos, que atuam por meio de efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular (Amann e Pickett, 1987); e intracelulares ou penetrantes, os quais foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos: alcoólicos e amidas (Alvarenga et al., 2005). Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a preservação espermática, destacam-se, especialmente, o glicerol, o etilenoglicol e o DMSO (Fickel et al., 2007); entre as amidas, citam-se a acetamida, a lactamida (Kashiwazaki et al., 2006), a dimetilformamida (Oliveira et al., 2006) e a dimetilacetamida (Calderam et al., 2008).

#### *Crioprotetores não penetrantes*

A composição da gema do ovo é bastante variável, uma vez que é um composto de origem animal e que pode ter diferentes composições de acordo com as práticas de manejo alimentar utilizadas na criação das aves (Braga et al., 2005; Ribeiro et al., 2007). Segundo Barreto et al. (2006), a gema do ovo apresenta a seguinte composição: 49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais, sendo que, destes, 30,9% são lipídeos totais. Todavia, a gema de ovo não é inteiramente definida, sendo um composto biológico que contém proteínas, vitaminas, fosfolipídeos, glicose, componentes bactericidas e antioxidantes (Houpalathi et al., 2007). A gema do ovo começou a ser estudada na criopreservação de sêmen da espécie bovina (Phillips e Lardy, 1940), apresentando resultados satisfatórios, quando comparados aos meios suplementados apenas com glicose, com aumento considerável da viabilidade espermática.

Segundo Holt (2000), a principal função protetora da gema de ovo é estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico. Entretanto, o mecanismo de ação que confere tal proteção durante a criopreservação ainda não está totalmente elucidado, sendo levantadas várias hipóteses sobre a atuação da gema de ovo na célula espermática.

Watson (1976), avaliando o comportamento das células espermáticas criopreservadas de carneiros e bovinos, sugeriu que uma parte da gema de ovo, chamada de fração de baixa densidade (LDF), era responsável pela proteção dos espermatozoides destas espécies. Posteriormente, Watson (1981) concluiu que estes fosfolipídeos fornecem proteção à membrana da célula espermática, uma vez que a proteína da LDF serviria para solubilizar os lipídeos e incorporá-los à membrana celular. No entanto, Ricker et al. (2006), avaliando a criopreservação de sêmen equino, constataram que, embora haja associação entre os lipídeos presentes nos diluidores, estes não foram integrados à membrana plasmática nesta espécie.

Segundo Farstad (2009), a utilização da gema de ovo na preparação de crioprotetores é questionada quanto à sua origem, que pode veicular possíveis micro-organismos, e não quanto ao seu efeito protetor.

Substitutos para este crioprotetor não penetrante vêm sendo testados, como lecitinas de soja (Hiwasa et al., 2009), visando preparar meios quimicamente definidos, o que não seria possível com o uso da gema de ovo, imprecisa quanto a sua composição (Houpalathi et al., 2007).

Bittencourt et al. (2008) testaram também alternativas aos diluentes convencionais de sêmen. Na espécie caprina, os diluentes à base de lecitina de soja apresentaram resultados abaixo do esperado para aprovação do sêmen congelado. Da mesma forma, Aboagla e Terada (2004) observaram que a integridade do acrossoma de espermatozoides caprinos congelados com gema de ovo foi menor do que aqueles obtidos com outros diluentes.

Valente et al. (2010) avaliaram a substituição parcial ou total da gema de ovo no diluidor de sêmen ovino e observaram que a adição de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, não foi capaz de compensar a ausência da gema de ovo. Segundo estes autores, melhores resultados de motilidade, termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelação foram obtidos após utilização da gema de ovo no meio diluidor.

Bergeron et al. (2007), na criopreservação de sêmen bovino com diluentes à base de gema de ovo ou leite, concluíram que, da mesma forma que a gema de ovo, as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, minimizando a perda de lipídeos da membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação/descongelação. Ao contrário da gema de ovo, o efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolve proteínas ao invés de lipídeos (Bergeron et al., 2007).

Segundo Purdy (2006), a escolha do açúcar a ser incluído no crioprotetor deve ser baseada na sua funcionalidade e propriedades químicas. Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não penetrantes na célula, como lactose, rafinose e trealose (Squires et al., 2004). A ação dos açúcares não penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com conseqüente redução da formação de gelo intracelular. Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolipídeos da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (Bucak et al., 2007).

#### *Crioprotetores penetrantes*

Os crioprotetores penetrantes são solutos que atuam tanto interna quanto externamente no espermatozoide, desidratando a célula espermática devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular. Esta categoria de crioprotetores penetra na membrana celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, atua na desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (Purdy, 2006).

O Glicerol ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool, apresenta-se líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso, sabor adocicado e massa molecular de 92 g/mol (Fernandes et al., 2002). Na década de 50, esta substância começou a ser utilizada na criopreservação de células e micro-organismos. Além do efeito osmótico, o glicerol atua diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga aos fosfolipídeos presentes na cabeça espermática, reduzindo a fluidez da membrana e interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana (Parks e Graham, 1992).

Em solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer a congelação, haverá mais água descongelada do que naquela que não contém glicerol, resultando no aumento do volume dos canais de solvente não congelado e na menor concentração de sais nesses canais (Baudot et al., 2002). Entretanto, segundo Alvarenga et al. (2000), o glicerol causa efeito tóxico à célula espermática, determinando desnaturação proteica; modificação nas interações de actina, que provavelmente interfere no deslizamento das fibras densas da cauda do espermatozoide; além de alterações no glicocálice e nas proteínas da superfície celular, que interferirá no reconhecimento dos receptores da zona pelúcida.

A adição do glicerol pode ser realizada de duas formas: no momento da diluição inicial, à temperatura ambiente, quando o crioprotetor está em concentração total no diluente utilizado, ou após a refrigeração do sêmen, na temperatura de 5°C, visando reduzir os efeitos tóxicos do glicerol. Entretanto, com o uso de métodos automatizados de refrigeração e congelação do sêmen (Kumar et al., 2003), é impossível a adição do crioprotetor após a curva de refrigeração. Em conseqüência deste efeito tóxico, vários trabalhos vêm sendo realizados visando substituir o glicerol por outro crioprotetor que seja tão eficaz e menos nocivo à célula espermática.

O Etilenoglicol (monoetileno glicol; etano-1, 2-diol) é um álcool com dois grupos-OH, um composto químico largamente utilizado como um anticongelante automotivo. Na sua forma pura é um composto inodoro, incolor, xaroposo líquido, de sabor doce e com massa molecular 62 g/mol (Fernandes et al., 2002). Segundo Moraes et al. (1998), o etilenoglicol tem sido apontado como alternativa, devido a sua capacidade crioprotetora, determinando maior proteção do acrossoma e das membranas espermáticas de espermatozoides ovinos, quando comparado ao glicerol. Entretanto, quando utilizado em elevadas concentrações, este álcool apresenta efeito deletério na conservação dos espermatozoides, observado após criopreservação de espermatozoides ovinos a 0,7 M (Moraes et al., 1998) e em espermatozoides caprinos com diluentes a 7% de etilenoglicol (Souza et al.,

2002). Estes estudos ressaltam a necessidade de menores concentrações deste álcool em relação às concentrações usuais de glicerol (5-7%) para obtenção de índices ideais de criopreservação para o sêmen ovino (Moraes et al., 1998), uma vez que elevadas concentrações deste crioprotetor determinam efeito tóxico sobre os espermatozoides (Bittencourt et al., 2004).

Em trabalho com criopreservação seminal de cães, Godim et al. (2009) obtiveram motilidade progressiva média de 50% utilizando o etilenoglicol nas concentrações de 5 e 6%, entretanto os resultados para a integridade de membrana plasmática foram consideravelmente inferiores em comparação à motilidade, não chegando a 25%, o que pode indicar que, embora os espermatozoides estejam vivos, eles tenham menores índices de fertilidade, uma vez que a integridade de membranas é substancial para a preservação do material genético do gameta masculino (Gadella, 2008).

O grupo amida, na química orgânica, é todo composto orgânico que possui o nitrogênio ligado diretamente a um grupo carbonila, ou seja, em que  $-NH_2$  substitui o  $-OH$  do grupo carboxila (Feltre, 2005). A formamida é uma amida derivada do ácido fórmico e apresenta massa molecular de 45 g/mol. A acetamida é a amida do ácido acético, com massa molecular de 59 g/mol (Fernandes et al., 2002). Dentre as amidas, vários compostos se destacam na criopreservação de células, por apresentarem menor peso molecular em comparação ao etilenoglicol e glicerol, supondo que possam induzir menores danos osmóticos (Melo et al., 2007).

Em experimentos realizados por Kashiwazaki et al. (2006), utilizando acetamida e lactamida a 1 M, e por Okuda et al. (2007), usando acetamida a 2%, foi observada a capacidade crioprotetora das amidas, superior em relação ao glicerol, para a criopreservação de espermatozoides de coelhos. Em contrapartida, quando adicionadas aos espermatozoides de equinos, amidas como a acetamida e a formamida apresentaram baixo efeito protetor, o que comprova a existência de diferenças espécies-específicas, bem como individuais, da ação das amidas como crioprotetores (Squires et al., 2004).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto químico orgânico de fórmula  $C_2H_6SO$  e peso molecular 78 g/mol (Fernandes et al., 2002), apresentando toxicidade reconhecidamente baixa (Stone, 1993). A principal ação deste composto deve-se à sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al., 1990), devido a sua rápida penetração celular, sendo um solvente penetrante (Stedman, 2003). Apesar de o mecanismo de ação não estar totalmente elucidado na célula espermática, é sabido que o DMSO interage com os fosfolipídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do  $0^\circ C$ , reduzindo a formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo de criopreservação (Thirumala et al., 2006).

Desta forma, a utilização de DMSO na tentativa de substituir o glicerol na criopreservação de sêmen vem demonstrando bons resultados, principalmente em espécies de peixes. Murgas et al. (2007) adicionaram o DMSO na concentração de 10% e obtiveram resultados satisfatórios na criopreservação do sêmen de peixe de água doce (Curimba; *Prochilodus lineatus*). Esta mesma concentração foi utilizada também na congelação de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*), relatando ainda a obtenção de altas taxas de motilidade pós-descongelação (Oliveira et al., 2007). Sanches et al. (2008) crioconservaram o sêmen de garoupas com a adição de 5% de DMSO e obtiveram resultados satisfatórios ao descongelar amostras de sêmen.

Fontgibell e Francesch (1998) testaram diferentes crioprotetores, entre eles o DMSO, na concentração de 4% para congelar espermatozoides de galos, obtendo para esta espécie resultados equivalentes ao uso do glicerol, sugerindo que este crioprotetor pode ser uma alternativa na adição ao diluente de criopreservação. Todavia, poucos trabalhos são realizados com a adição apenas de DMSO na criopreservação de espécies mamíferas. Há relatos de associação entre o glicerol e o DMSO para a espécie caprina, com resultados satisfatórios (Kundu et al., 2001). Desta forma, embora muitos estudos tenham sido realizados com diferentes crioprotetores penetrantes objetivando a substituição do glicerol, este ainda é o crioprotetor mais utilizado em pesquisas e trabalhos de campo para criopreservação de células espermáticas nas espécies domésticas.

### Antioxidantes

Com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen criopreservado, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração e congelação. Dentre tais pesquisas, evidencia-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo (Guerra et al., 2004). Segundo Halliwell (2000), a função destes antioxidantes, quando presentes em baixa concentração quando comparado à do substrato oxidável, é regenerar o substrato ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo.

A célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: uma como detoxificadora do agente oxirredutor antes que este cause a lesão celular, constituída por glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; outra como linha de defesa, com a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutatona-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural

da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes situa-se no meio intracelular (Ferreira e Matsubara, 1997).

Diferentemente da maioria das células, o espermatozoide perde a maior parte de seu citoplasma durante o período de maturação, sendo desta forma privado de uma fração dos antioxidantes endógenos, tornando-o vulnerável à ação das ROS (Carvalho et al., 2002). Consequentemente, os espermatozoides ejaculados dependem da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal, que se torna a forma de proteção mais importante utilizada pelos espermatozoides contra as ROS (Sikka, 2004), tanto que a concentração de antioxidantes no plasma é maior do que em outros líquidos biológicos (Taylor, 2001).

Com a prévia diluição do sêmen para os processos de criopreservação, a concentração de antioxidantes diminui, ocasionando desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, tendo como consequência o estresse celular (Bilodeau et al., 2000). Para a resolução deste possível desequilíbrio, a adição de antioxidantes aos diluidores de preparação, manutenção e criopreservação (Mortimer, 2000) passou a ser estudada em diferentes espécies e processos de criopreservação.

#### *Catalase (CAT)*

A CAT é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos nos peroxissomas, que são organelas esféricas, envolvidas por uma membrana vesicular presente no citoplasma, sobretudo em células animais. São as organelas responsáveis pelo armazenamento das enzimas diretamente relacionadas com o metabolismo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), substância altamente tóxica para a célula, uma vez que é o principal precursor da formação de radicais  $OH^\cdot$  (Ortega et al., 2003). A catalase pertence à subclasse das enzimas oxidorredutases, que usam o peróxido como receptor e doador de elétrons (Barreiros et al., 2006). Esta peroxidase decompõe o  $H_2O_2$  segundo a reação química:



Ball et al. (2000) identificaram a presença da CAT no plasma seminal, na fração oriunda principalmente da glândula prostática, e afirmaram que práticas como a remoção do plasma seminal podem diminuir consideravelmente a atividade da enzima (remoção do peróxido de hidrogênio), expondo a célula espermática a estresse oxidativo. Kankofer et al. (2005) avaliaram a atividade da CAT no sêmen refrigerado de equinos e observaram que esta enzima reduz a lipoperoxidação das células espermáticas submetidas à temperatura de 5°C, por um período de 24 horas. Em touros, Bilodeau et al. (2000) detectaram ausência de CAT na célula espermática, sendo sua presença identificada apenas no plasma seminal.

Paqualotto et al. (2006) realizaram estudos em humanos férteis e inférteis e identificaram concentração reduzida da atividade de CAT em doadores inférteis, quando comparados àqueles sem problemas de fertilidade. Em humanos sem histórico de infecção ou alterações no sistema circulatório que possam interferir na reprodução (varicocele), a atividade da CAT foi diminuída em decorrência de hábitos como fumo, que contém substâncias que atuam diretamente no sistema antioxidante. Esta observação foi comprovada quando a prática do fumo foi interrompida e as concentrações de CAT e outros antioxidantes voltaram aos valores normais na célula espermática e no plasma seminal (Elshal et al., 2009).

Kawakami et al. (2007) avaliaram cães com parâmetros reprodutivos normais e cães com astenozoospermia e identificaram que, nestes últimos, a CAT apresentava atividade reduzida. Após identificação dos cães com alteração na qualidade espermática, adicionaram 100 U/mL desta enzima ao diluente de manutenção dos espermatozoides destes animais, comprovadamente com baixa atividade da CAT, e observaram melhoria nos parâmetros seminais após a incubação por três horas. Estes achados permitiram concluir que a adição deste antioxidante pode melhorar os índices de motilidade em indivíduos com problemas de fertilidade (Kawakami et al., 2007).

Como observado anteriormente, a prévia diluição do sêmen e sua exposição a baixas temperaturas favorece a formação de ROS em decorrência do estresse oxidativo ao qual a célula espermática foi exposta. Maxwell e Stojanov (1996) adicionaram CAT ao crioprotetor de refrigeração do sêmen ovino em quatro diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800 U/mL) e observaram que concentrações acima de 200 U/mL foram tóxicas para o espermatozoide ovino. Entretanto, como não avaliaram o índice de lipoperoxidação, não conseguiram determinar o mecanismo que determinou tal efeito tóxico.

De Graaf et al. (2007) adicionaram 100 U/mL de CAT na preparação do sêmen ovino para a sexagem espermática e congelamento. A hipótese testada é que a enzima agiria minimizando a lipoperoxidação, uma vez que o procedimento utilizado para a seleção de espermatozoides sexados ocasiona várias lesões, como fragmentação do DNA, capacitação espermática prematura e interferência nos parâmetros de velocidade. Entretanto, não foram

identificadas alterações na motilidade após descongelamento e incubação por seis horas em relação ao grupo-controle. Interessante ressaltar que os valores observados no grupo-controle deste experimento foram considerados de boa qualidade. Neste caso, provavelmente, a atividade da CAT não foi requerida.

Relevante ainda são os achados de Upreti et al. (1997), que utilizaram diferentes antioxidantes na refrigeração (15°C/ 24 horas) de sêmen de carneiros, entre eles a CAT (45 µg/mL), onde não observaram interferência destas substâncias na melhora da viabilidade espermática, sugerindo que o diluente quimicamente definido utilizado para a criopreservação do sêmen pudesse conter atividade antioxidante. Em outro experimento, Upreti et al. (1998) detectaram a presença da enzima aromática aminoácido oxidase no sêmen de carneiros, com alto nível de atividade em comparação ao sêmen bovino. Esta enzima aumenta sua atividade na presença do piruvato, encontrado na composição do diluente quimicamente definido utilizado por estes autores, que justificaram, desta forma, que a adição de CAT não teve o efeito esperado por não haver produção do oxidante no qual a CAT atua.

O espermatozoide da espécie suína é reconhecidamente mais frágil aos processos de refrigeração a 5°C (Katzner et al., 2005) e congelamento (Ohata et al., 2001). Roca et al. (2005) testaram a adição de 200 e 400 U/mL de CAT ao diluente de congelamento do sêmen de suínos e observaram que em ambas as concentrações houve aumento na capacidade dos espermatozoides de produzirem embriões *in vitro*, identificando menor produção de ROS nos grupos tratados com a enzima.

#### Glutathione (GSH)

A GSH ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. A GSH é a forma reduzida da glutathione, sendo o grupo sulfidríla (SH) o responsável pela proteção da célula contra o estresse oxidativo (Luberda, 2005).

A GSH está presente na maioria das células em concentrações de 1 a 8 mM, geralmente, em sua maior quantidade no fígado. Na região extracelular, a concentração de glutathione é da ordem de 5-50 mM (Rover Júnior et al., 2001). Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), que é a forma dimerizada da GSH. A importância deste par é tal, que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox (espontaneidade ou tendência química para adquirir elétrons e, desse modo, ser reduzido) dos sistemas biológicos. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fração (menos de 10%) da glutathione total (Irvine, 1996). A distribuição da GSH no sistema reprodutor masculino é diferenciada de acordo com a espécie estudada. Geralmente a maior concentração de GSH está na célula espermática, com pouca quantidade no plasma seminal. Entretanto, há espécies que têm esta proporção inversa (Tab. 1). Segundo Raijmakers et al. (2003), a concentração da GSH no plasma seminal é determinante para a fertilidade, uma vez que a diminuição das concentrações deste tiol está associada à subfertilidade ou mesmo à infertilidade masculina.

O metabolismo da glutathione ocorre da seguinte forma (Fig. 1): duas moléculas de GSH, pela ação da GPx, atuam sobre o peróxido de hidrogênio, reduzindo-o em duas moléculas de água e uma de GSSG. Por sua vez, esta molécula de GSSG, juntamente com uma molécula de hidrogênio e presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada (NADPH), sob ação da glutathione redutase (GRd), é convertida a duas moléculas de GSH e NADP. Na verdade, tanto a GSH quanto a GSSG são substratos para a atividade enzimática antioxidante das GPx e GRd (Christophersen, 1968).

Tabela 1. Concentrações de GSH no espermatozoide e plasma seminal de diferentes espécies de mamíferos

Espécie	Espermatozoide	Referência	Plasma seminal	Referências
Humana	6,2 ± 0,6 nmol/10 <sup>8</sup> sptz	Griveau et al. (1995)	0,19 ± 0,11 µM	Daunter et al. (1989)
Suína	0,03 nmol/10 <sup>8</sup> sptz	Li (1975)	185,8 ± 46,7 µM	Strzezek et al. (2002)
Bovina	566 ± 72 pmol/mg protein	Bilodeau et al. (2000)	17 ± 7 pmol/mg protein	Bilodeau et al. (2000)
Canina	0,53 ± 0,11 nmol/10 <sup>8</sup>	Li (1975)	-	-
Ovina	0,45 ± 0,14 nmol/10 <sup>8</sup>	-	-	-
Equina	-	-	77,27 ± 48,0 mg/100cm <sup>3</sup>	Strzezek et al. (2002)
Cunícula	0,01 nmol/10 <sup>8</sup>	Li (1975)	-	-
Cricetídea	30-40 nmol/mg protein	Den Boer et al. (1989)	-	-
<i>M. musculus</i>	90 nmol/10 <sup>8</sup>	Alvarez e Storey (1989)	-	-

Fonte: Adaptado de Luberda (2005).

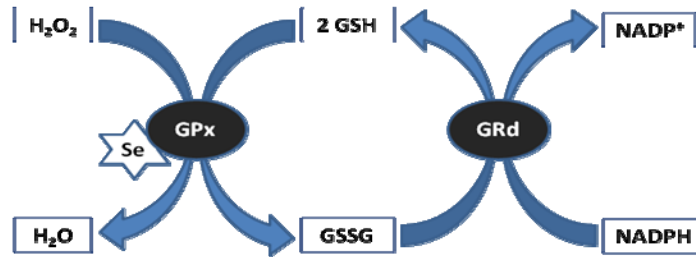


Figura 3. Ciclo redox da glutatona.  
Fonte: Adaptado de Bilodeau et al. (2001).

Sabe-se ainda que as concentrações das glutatonas enzimáticas expressam-se em grandes quantidades tanto no plasma seminal quanto na célula espermática. Marti et al. (2008) quantificaram as enzimas presentes em ejaculados de carneiros submetidos a criopreservação, evidenciando que as GPx e GRd estão em quantidade e atividade elevadas, mesmo em ejaculados que foram submetidos a criopreservação, em comparação ao sêmen *in natura*. Em contrapartida, Bilodeau et al. (2000) identificaram redução de até 78% nas concentrações de GSH no sêmen bovino pós-congelação. Com a diminuição da quantidade do substrato GSH, não há como reduzir os oxidantes formados, independente das concentrações das enzimas GPx e GRd. Assim, é interessante a adição de GSH ao diluente de criopreservação de células espermáticas.

Bilodeau et al. (2001) testaram a adição de GSH, GSSG e GPx ao diluente de congelação de sêmen bovino, concluindo que a adição apenas da GSSG não conseguiu regenerar eficientemente a GSH, assim como concentrações micromolares ( $\mu M$ ) da GSH não foram eficientes na preservação do espermatozoide bovino. Estes autores sugerem que a adição da GSH seja realizada em concentrações milimolares (mM) e da GPx em pequenas quantidades (5 U/mL). Sinha et al. (1996) testaram a adição de GSH na criopreservação de sêmen caprino, nas concentrações de 2 e 5 mM, e identificaram resultados satisfatórios na taxa de fertilização com a adição de 5mM da GSH, em comparação ao grupo-controle. Soares et al. (2009) testaram a adição de 2, 5 e 7 mM de GSH na criopreservação de sêmen caprino e, diferentemente dos resultados obtidos por Sinha et al. (1996), observaram que a melhor concentração de GSH foi a de 2 mM. Entretanto, em ambos os trabalhos, os resultados foram numericamente superiores, sem apresentar diferenças estatísticas.

Câmara et al. (2009) testaram a adição de diferentes concentrações de GSH (0,5; 1,0 e 2,0 mM) na criopreservação do sêmen de carneiros e observaram que à medida que aumentava a quantidade de GSH adicionada, aumentava a capacidade antioxidante total. Todavia, não foi evidenciada melhora na cinética espermática em relação ao grupo que não recebeu a adição de antioxidantes. Estes autores ainda ressaltaram que provavelmente estes efeitos não foram obtidos mediante as propriedades da gema de ovo, que têm atividade antioxidante difícil de ser estimada, por não se conhecer os componentes totais deste suplemento.

Foote et al. (2002) testaram diferentes concentrações de GSH (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM) na refrigeração de sêmen de touros e identificaram que o diluente utilizado interfere na capacidade de proteção do substrato adicionado, que, neste caso, foi o leite, ou melhor, as micelas de caseína também foram eficazes na proteção celular.

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e  $H_2O_2$  (Nishikimi e Machlin, 1975). Devido a esta função, participa de um importante sistema antioxidante nas células expostas ao oxigênio (Schneider e Oliveira, 2004). Segundo Barreiros et al. (2006), existem várias formas comuns de SOD, que são proteínas com cofatores minerais como o cobre, zinco, manganês, ferro ou níquel.

Na reprodução, a enzima SOD tanto foi encontrada na célula espermática quanto no plasma seminal de diferentes espécies mamíferas e tem a função de prevenir a peroxidação lipídica no espermatozoide (Storey, 1997). Kankofer et al. (2005) estudaram a atividade da enzima SOD no sêmen refrigerado de equinos a  $5^\circ C$  e identificaram que a ação da SOD foi diminuída no sêmen diluído, quando em comparação ao sêmen mantido com o plasma seminal. Segundo Pasqualotto et al. (2006), redução nas concentrações de SOD está relacionada à presença de células espermáticas danificadas e, conseqüentemente, está associada à infertilidade humana.

Na criopreservação, Bilodeau et al. (2000) identificaram a redução de até 50% na atividade da SOD após a criopreservação do sêmen de bovinos. Como a manipulação do sêmen para posterior criopreservação expõe a célula espermática ao oxigênio e à radiação de luz, a formação de ROS é favorecida, necessitando da ação do sistema antioxidante e diminuindo as concentrações desta enzima (Bilodeau et al., 2001).

Assim, a adição da SOD tem sido testada em diluentes de criopreservação. Stefanov et al. (2004) adicionaram três diferentes concentrações de SOD (30, 60 e 120 U/mL) na incubação de sêmen ovino por cinco horas, a  $39^\circ C$ , e observaram que as maiores doses de SOD foram mais eficazes, enquanto a dosagem mais baixa não teve efeito ou, se apresentou, foi temporário. Estes autores afirmaram que a administração exógena de SOD



suprimiu a formação de  $H_2O_2$ . Maxwell e Stojanov (1996) adicionaram 100, 200, 400 e 800 U/mL de SOD ao diluente de refrigeração de sêmen ovino e avaliaram a incubação nas temperaturas de 25 e 5°C, por 12 dias, identificando que todas as concentrações de SOD foram benéficas para a preservação espermática nas duas temperaturas de armazenamento. Entretanto, este efeito foi observado até o sexto dia de incubação, sendo ineficaz no período restante de incubação.

Footo et al. (2002) trabalharam com a adição de SOD nas concentrações de 100 e 250 U/mL, associada a dosagens de GSH, na congelamento de amostras de sêmen bovino, e não observaram diferenças significativas quando utilizaram o sêmen de touros na IA, em relação ao grupo-controle.

### *Vitamina E*

Vitamina E é a descrição genérica para um grupo vitamínico que engloba oito substâncias diferentes do grupo dos tocoferóis e dos tocotrienóis, dos quais os tocoferóis possuem quatro moléculas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) com capacidade antioxidante (Bianchi e Antunes, 1999).

Segundo Kagan et al. (1990), a vitamina E atua na proteção das lipoproteínas de baixa densidade presentes na membrana plasmática, sendo a oxidação desta fração lipídica suprimida até a depleção total desta vitamina e de seus análogos. Entretanto, Kagan et al. (1992) sugerem que a vitamina E não atua exclusivamente sobre os lipídeos, agindo também sobre as proteínas presentes na membrana, conferindo proteção estrutural à membrana plasmática da ação dos oxidantes. Considerando-se a localização do  $\alpha$ -tocoferol nas membranas subcelulares, acredita-se que esta vitamina remova principalmente o ânion superóxido, gerado por enzimas ligadoras de membrana que participam na oxidação biológica (Nishikimi e Machlin, 1975).

A adição da vitamina E na alimentação de humanos e animais tem sido realizada com diversificados objetivos, principalmente para melhorar os índices reprodutivos, e tem sido avaliada como positiva. Nos experimentos com a vitamina E na alimentação, Yousef et al. (2003) trabalharam com coelhos, adicionando 1,0 g/L na água de beber dos animais, e identificaram que a ingestão desta vitamina reduziu a produção de radicais livres e melhorou significativamente a qualidade seminal nesta espécie. Audet et al. (2004) adicionaram vitamina E (480 UI) na alimentação de suínos e observaram que o grupo suplementado obteve melhor qualidade espermática do que aqueles não suplementados durante sistema intensivo de colheita de sêmen. Yue et al. (2010) testaram diferentes concentrações de vitamina E (20, 200, 1000 e 2400 UI) na alimentação de carneiros durante o período de 12 meses e observaram que a dosagem de 200 UI melhorou a qualidade seminal, inclusive com aumento das enzimas do sistema antioxidante (SOD e GPx).

Jain et al. (2000) testaram a suplementação de 100 UI de vitamina E por dia na alimentação de humanos e observaram diminuição da peroxidação lipídica em eritrócitos e aumento das concentrações de glutatona. Este estudo foi direcionado para pacientes com diabetes, mas pode indicar também resultados efetivos na reprodução, visto que a glutatona é substrato para o complexo redox glutatona, com finalidade de reduzir as concentrações de  $H_2O_2$  (Knapen et al., 1999), assim como favorecer a proteção da célula espermática pela redução da peroxidação lipídica (Christova et al., 2004).

Mediante as funções e os resultados comprovadamente benéficos da vitamina E na suplementação alimentar, é despertado o interesse de adicionar tal composto ao diluente de criopreservação de espermatozoides. Entretanto, a natureza lipídica deste antioxidante dificultava sua dissolução em meios aquosos comumente utilizados. Assim, o ácido carboxílico 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- foi desenvolvido e classificado como permeante celular, hidrossolúvel, com propriedades antioxidantes, comercialmente conhecido como Trolox<sup>®</sup> (Scott et al., 1974). Ao ser testado, foi observado que o Trolox pode ser utilizado como um ágil transferidor de elétrons em reações, inclusive na transferência do hidrogênio, resultando em um radical fenoxil relativamente estável, similar à função da vitamina E (Davies et al., 1988). Bergmann et al. (1997) avaliaram a substituição do  $\alpha$ -tocoferol pelo Trolox<sup>®</sup> na preservação das lipoproteínas de baixa densidade e identificaram que o análogo da vitamina E desempenha efetivamente a atividade de aumentar o tempo de latência para a degradação das lipoproteínas de baixa densidade, tornando-se uma alternativa eficiente contra a peroxidação lipídica.

Almeida e Ball (2005) incubaram sêmen equino na temperatura de 38°C, por 120 minutos, em diferentes concentrações (5, 25, 100 e 500  $\mu$ M) de  $\alpha$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocoferol succinato, e observaram que o succinato foi mais eficaz na prevenção da peroxidação lipídica. Entretanto, esta substância antioxidante suprimiu a motilidade espermática. Os autores apontaram que o succinato pode ter sido desestirificado, formando o ânion succinato, que, provavelmente, reagiu com outras ROS, diminuindo o percentual de células móveis. Assim, a utilização de produtos mais purificados da vitamina E pode influenciar positivamente os resultados de preservação de sêmen em diferentes espécies. Resultados similares foram obtidos por Donnelly et al. (1999), que, ao adicionarem a vitamina E em amostras de sêmen humano, isolada ou concomitante à vitamina C, obtiveram redução da produção de oxidantes, porém não se constatou melhora na cinética espermática.

Upreti et al. (1997) utilizaram a vitamina E, diluída em etanol, na dosagem de 10 mM para a criopreservação de sêmen de carneiros a 15°C, por 24 horas, e observaram que a adição da vitamina interferiu negativamente sobre a motilidade espermática. Estes resultados foram igualmente observados por Sarlós et al.

(2002), que testaram diferentes concentrações da vitamina E (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 mg/mL) na refrigeração de sêmen de carneiros por um período de nove dias e classificaram a  $\alpha$ -tocoferol acetato como um fraco protetor contra a formação de ROS. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas da vitamina E, assim como a composição lipídica da membrana espermática de carneiros, podem ter determinado resultado diferenciado em comparação a outras espécies. Dalvit et al. (1998) testaram a adição de 1 mg/mL de  $\alpha$ -tocoferol ao meio de fertilização *in vitro* de oócitos bovinos e afirmaram que concentrações reduzidas de vitamina E permitem que as ROS atuem na desestabilização das membranas, etapas fisiológicas para a fertilização. Em contrapartida, doses elevadas desta vitamina afetam a fluidez da membrana espermática, alterando o processo de capacitação espermática.

Peña et al. (2003) utilizaram o Trolox<sup>®</sup> (100 e 200  $\mu$ M) na congelação do sêmen de suínos e identificaram que a maior dosagem conferiu melhores resultados para a motilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial. Breininger et al. (2005), também utilizando a espécie suína e adicionando diferentes concentrações de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (100, 200 e 500  $\mu$ g/mL), evidenciaram que a dosagem de 200  $\mu$ g/mL preservou a integridade mitocondrial, melhorando, desta forma, os índices de motilidade, uma vez que a célula espermática preservou a matriz de energia.

Na criopreservação de sêmen equino, Silva et al. (2008) testaram a dosagem de 120 mM de Trolox<sup>®</sup> ao meio de refrigeração e obtiveram resultados satisfatórios quanto à motilidade, decidindo testar esta mesma concentração na congelação do sêmen desta espécie. Entretanto, os resultados não foram favoráveis aos parâmetros avaliados. Silva et al. (2009b) testaram a mesma dosagem de 120 mM após a descongelação do sêmen de equinos e obtiveram resultados significativos na motilidade espermática após 120 minutos de incubação a 37°C.

### Considerações finais

A criopreservação da célula espermática apresenta diversificados resultados na literatura, considerando-se as espécies estudadas e os produtos utilizados no processamento do sêmen. A padronização de protocolos de criopreservação adequados aos parâmetros fisiológicos de cada espécie animal se faz necessária, com o intuito de minimizar os efeitos deletérios da criopreservação.

O estudo sobre as modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucida possíveis lesões e diminuição da capacidade fertilizante deste gameta masculino e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a seleção e/ou associação de crioprotetores mais eficazes para determinada espécie, assim como a adição de componentes que podem oferecer substrato ou remover os causadores de lesões celulares, como as espécies reativas ao oxigênio.

Pesquisas devem ser realizadas no intuito de identificar qual antioxidante pode ser utilizado, em quais concentrações e em que momento deve ser adicionado ao diluente com o objetivo de melhorar os índices de integridade do espermatozoide pós-criopreservação e conseqüentemente os resultados de prenhez com o uso de sêmen congelado/descongelado.

### Referências bibliográficas

- Aboagla EM, Terada T.** Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1160-1172, 2004.
- Almeida J, Ball BA.** Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.321-337, 2005.
- Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.** Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, v.32, p.541-545, 2000.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.105-113, 2005.
- Amann RP, Pickett BW.** Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, v.7, p.145-174, 1987.
- Ashwood-Smith MJ.** Mechanisms of cryoprotectant action. *Symp Soc Exp Biol*, v.41, p.395-406, 1987.
- Audet I, Laforest JP, Martineau GP, Matte JJ.** Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J Anim Sci*, v.82, p.626-633, 2004.
- Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IKM.** Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res*, v.61, p.1026-1030, 2000.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova*, v.29, p.113-123, 2006.
- Barreto SCS, Zapata JFF, Freitas ER, Fuentes MFF, Nascimento RF, Araújo SRS, Amorim AGN.** Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. *Pesq Agropec Bras*, v.41, p.1767-1773, 2006.
- Baudot A, Cacula C, Duarte ML, Fausto R.** Thermal study of simple amino-alcohol solutions. *Cryobiology*,

v.44, p.150-160, 2002.

**Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P.** Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod*, v.77, p.120-126, 2007.

**Bergmann AR, Ramos P, Hermann E, Winklhofer-Roob BM.** RRR- $\alpha$ -tocopherol can be substituted for by Trolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidizability by copper. *J Lipid Res*, v.38, p.2580-2588, 1997.

**Bianchi MLP, Antunes LMG.** Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, v.12, p.123-130, 1999.

**Bicudo SD, Sousa DB, Takada L.** Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.120-127, 2003.

**Bilodeau JF, Blanchette C, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-288, 2001.

**Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C.** Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.

**Bittencourt RF, Ribeiro AL, Santos ADF, Furst R, Teixeira RBS, Chalhoub M, Portela AP, Alves SGG, Almeida AK, Guimarães JD.** Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. *Ciênc Anim Bras*, v.5, p.27-32, 2004.

**Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Chalhoub MCL, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, Oba E.** Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.45, p.305-312, 2008.

**Braga CVP, Fuentes MFF, Freitas ER, Carvalho LE, Sousa FM, Bastos SC.** Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais. *Rev Bras Zootec*, v.34, p.76-80, 2005.

**Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT.** Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamics parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.2126-2135, 2005.

**Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A.** The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, v.67, p.1060-1067, 2007.

**Calderam IBK, Maschio ÉF, Madeira EM, Ulguim RR, Rambo G, Corrêa ÉK, Lucia Jr T Deschamps JC, Corrêa MN.** Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. *Ciênc Rural*, v.38, p.1978-1983, 2008.

**Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP.** Efeito da adição de antioxidantes ao meio diluidor na qualidade do sêmen ovino pós-descongelamento. In: SINCORTE (Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte), 4, 2009, João Pessoa, PB. *Anais...* João Pessoa, PB: SINCORTE, 2009. CD-ROM.

**Carneiro GF, Silva SV, Medeiros LRD, Gomes Neto O, Procópio OCS.** Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. *Anais...*, Gravatá, PE: ASSIST, 2007. CD-ROM.

**Carvalho OF, Ferreira JDJ, Silveira NA, Freneau GE.** Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J Bras Patol Med Lab*, v.38, p.33-38, 2002.

**Castelo TS, Frota TR, Silva AR.** Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008.

**Christophersen BO.** The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of microsomal fraction and mitochondria. *Biochem J*, v.106, p.515-522, 1968.

**Christova Y, James PS, Jones R.** Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.365-372, 2004.

**Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT.** Effect of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, v.49, p.619-627, 1998.

**Davies MJ, Forni LG, Willson RL.** Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochem J*, v.255, p.513-522, 1988.

**De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MMP, Maxwell WMC, O'Brien JK.** The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.217-227, 2007.

**Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM.** Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril*, v.72, p.484-495, 1999.

**Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA.** Sperm head defects and disturbances in spermatozoa chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin Biochem*, v.42, p.589-594, 2009.

**Fahy GM.** Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophys J*, v.32, p.837-850, 1980.

**Farstad W.** Cryopreservation of canine semen - New challenges. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.336-341, 2009.

- Feltre R.** *Fundamentos da química*. 4.ed. São Paulo: Moderna, 2005. 700p.
- Fernandes AC, Herold B, Maia H, Rauter AM, Rodrigues JAR.** *Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos*. Lisboa: Lidel, 2002. 220p.
- Ferreira ALA, Matsubara LS.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*, v.43, p.61-68, 1997.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A.** Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89, 2007.
- Fontgibell A, Francesch A.** Primeros resultados en el estudio de los efectos de la congelación de semen de gallo en tres razas catalanas. *Archiv Zootec*, v.47, p.335-341, 1998.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.71, p.13-23, 2002.
- Gadella BM.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.229-236, 2008.
- Giller G, Singler K.** Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol*, v.40, p.131-152, 1995.
- Godim D, Castro ACN, Vidal M, Ferreira MAR, Cury LJ, Pinho TG.** Métodos de congelamento *One Step e Two Steps* do sêmen de cães, diluído em solução de água de coco e etilenoglicol. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.10, p.417-422, 2009.
- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WHC.** Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.187-195, 2004.
- Halliwell B.** The antioxidant paradox. *Lancet*, v.355, p.1179-1180, 2000.
- Hiwasa M, Kohno H, Togari T, Okabe K, Fukui Y.** Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev*, v.55, p.50-54, 2009.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- Houpalathi R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R.** *Bioactive egg compounds*. New York: Springer-Verlag, 2007. 296p.
- Irvine DS.** Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod*, v.1, p.6-12, 1996.
- Jain SK, McVie R, Smith T.** Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care*, v.23, p.1389-1394, 2000.
- Jones R, Mann T.** Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil*, v.50, p.261-268, 1977.
- Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A.** Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci*, v.114, p.125-134, 2009.
- Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L.** Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res*, v.33, p.385-397, 1992.
- Kagan VE, Serbinova EA, Packer L.** Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologues of differing hydrocarbon chain length in liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, v.282, p.221-225, 1990.
- Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C.** Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and Catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.
- Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T.** Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. *J Reprod Dev*, v.52, p.511-516, 2006.
- Katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Wentz I.** Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5°C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. *Ciênc Rural*, v.35, p.138-144, 2005.
- Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T, Tsutsui T.** Superoxide dismutase and Catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci*, v.62, p.133-136, 2007.
- Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP.** Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *Eur J Obstet Gynecol*, v.82, p.171-184, 1999.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF.** The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v.46, p.246-253, 2003.
- Kundu CN, Das K, Majunder GC.** Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology*, v.41, p.21-27, 2001.
- Ladha S.** Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol*, v.165, p.1-10, 1998.
- Luberda Z.** The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, v.5, p.5-17, 2005.
- Luz SLN, Neves JP, Gonçalves PBD.** Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.37, p.141-145, 2000.
- Machado VP, Nunes JF, Araújo AA, Fernández DRP, Cordeiro MA, Medeiros CHN, Medeiros ALN, Monteiro AWU.** Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas

- utilizando diluidores à base de água de coco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, supl, p.43-49, 2006.
- Marti E, Marti JI, Muinõ-Blanco T, Cebrián-Pérez JA.** Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl*, v.29, p.459-467, 2008.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.1013-1020, 1996.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- Melo CM, Zahn FS, Martin I, Orland C, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA, Papa FO.** Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.27, n.4, p.171-175, 2007.
- Milczwski V, Kozicki LE.** Inseminação artificial ovina com sêmen refrigerado aplicado em diferentes vias. *Sci Agrar*, v.1, p.83-95, 2000.
- Moraes CN, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Schweitzer CM.** Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. *Ciênc Rural*, v.28, p.287-292, 1998.
- Mortimer D.** Sperm preparation methods. *J Androl*, v.21, p.357-366, 2000.
- Murgas LDS, Miliorini AB, Freitas RTF, Pereira JGM.** Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.526-531, 2007.
- Neid DM, Gadella BM, Collenbrander B, Agüero A, Brouwers JFHM.** Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.58, p.295-298, 2002.
- Nishikimi M, Machlin LJ.** Oxidation of  $\alpha$ -tocopherol model compound by superoxide anion. *Arch Biochem Biophys*, v.170, p.684-689, 1975.
- Nunes JF.** Inseminação artificial em caprinos. In: Gonsalvez PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. p.111-125.
- Ohata PM, Wentz I, Bernardi ML, Castagna C, Bortolozzo FP.** Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio pré-congelamento com ou sem a presença de plasma seminal. *Arq Fac Vet*, v.29, p.123-129, 2001.
- Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S, Kashiwazaki N.** Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim*, v.56, p.29-34, 2007.
- Oliveira AV, Viveiros ATM, Maria NA, Freitas RTF, Izaú ZA.** Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.1509-1515, 2007.
- Oliveira ECS, Juliani GC, Marques Jr AP, Henry M.** In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.58, p.1116-1122, 2006.
- Ortega AM, Izquierdo AC, Gomez JJH, Olivares-Corichi IM, Torres VMM, Méndez JJV.** Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciência*, v.28, p.699-704, 2003.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- Pasqualotto FF, Pasqualotto EB, Umezu FM, Salvador M.** Atividades da superóxido-dismutase e Catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. *Rev Assoc Méd Rio Grande do Sul*, v.50, p.130-134, 2006.
- Pegg DE.** The History and Principles of Cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, v.20, n.1, p.05-14, 2002.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H.** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.85-98, 2003.
- Petrunkina AM.** Fundamental aspects of gamete cryobiology. *J Reproduktionsmed Endokrinol*, v.4, p.78-91, 2007.
- Phillips PH, Lardy HA.** A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci*, v.23, p.399-404, 1940.
- Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.
- Rajmakers MTM, Roelofs HMJ, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM, Mulder TPJ, Knäpen MFCM, Wong WY, Peters WHM.** Glutathione and glutathione s-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril*, v.79, p.169-172, 2003.
- Ribeiro BRC, Lara LJC, Baião NC, Lopez CAA, Fiuza MA, Caçado SV, Silva GMM.** Efeito do nível de ácido linoleico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.789-796, 2007.
- Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Meyers SA.** Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod*, v.74, p.359-365, 2006.
- Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA.** Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl*, v.26, p.15-24, 2005.

- Rodríguez-Martínez H.** Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*, v.38, n.4, p.312-318, 2003.
- Rover Júnior L, Höehr NF, Vellasco AP.** Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*, v.24, p.112-119, 2001.
- Sanches EG, Oliveira IR, Serralheiro PCS.** Criopreservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Bioikos*, v.22, p.81-90, 2008.
- Sarlós P, Molnár A, Kókai M, Gábor GY, Rátky J.** Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung*, v.50, p.235-245, 2002.
- Schneider CD, Oliveira AR.** Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*, v.10, p.308-313, 2004.
- Scott JW, Cort WM, Harley H, Parrish DR, Saucy G.** 6-hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, v.51, p.200-203, 1974.
- Sikka SC.** Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, v.25, p.5-18, 2004.
- Silva AR, Fontenele-Neto JD, Cardoso RCS, Silva LDM, Chiniréa VH, Lopes MD.** Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.595-601, 2009a.
- Silva KMG, Moraes TAP, Silva ECB, Gamboa SC, Guerra MMP.** Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.42-49, 2009b.
- Silva KMG, Gamboa SC, Rodrigues AS, Santos JR, Guerra MMP.** Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. *Ciênc Rural*, v.38, n.8, p.2271-2277, 2008.
- Silva PNF, Gadella BM.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL.** The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim Reprod Sci*, v.41, p.237-243, 1996.
- Snoeck PPN.** Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.
- Soares AT, Silva SV, Lemos PFBA, Almeida FC, Batista AM, Andrade AKG, Guerra MMP.** Atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e motilidade de espermatozoides caprino submetidos à criopreservação em meio adicionado de glutatona reduzida. In: SINCORTE (Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte), 4, 2009, João Pessoa, PB. *Anais...* João Pessoa, PB; SINCORTE, 2009. CD-ROM.
- Sojka EJ, Kimmick SVB, Carison GP.** Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Proc Am Assoc Equine Pract*, v.36, p.683-690, 1990.
- Sousa DB, Bicudo SD.** Inseminação artificial com sêmen ovino refrigerado por 24 horas e transportado no sistema Equitainer®. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.330-332, 2003.
- Souza AF, Guerra MMP, Batista AM, Mergulhão FCC, Neves AC, Wischral A.** Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.5, p.103-105, 2002.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK.** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.
- Stedman TL.** *Stedman: dicionário médico*. 27.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 2196p.
- Stefanov R, Angelova M, Stefanova T, Subev M, Dolashka P, Voelter W, Zachariev Z.** Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea 103* improves ram spermatozoa functions *in vitro*. *Andrologia*, v.36, p.51-56, 2004.
- Stone RW.** Clinical updates on the use of dimethyl sulfoxide. *Canine Pract*, v.18, p.16-19, 1993.
- Storey BT.** Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.3, p.203-214, 1997.
- Taylor CT.** Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharmacol*, v.10, p.189-198, 2001.
- Thirumala S, Campbell WT, Vicknair MR, Tiersch TR, Devireddy RV.** Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, v.66, p.964-973, 2006.
- Thomas AD, Meyers SA, Ball BA.** Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1531-1550, 2006.
- Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF.** Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci*, v.51, p.275-287, 1998.
- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF.** Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.269-278, 1997.
- Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, Marques CC, Vasques MI, Silva Pereira MVC, Horta AEM, Barbas JP.** In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci*,



v.117, p.74-77, 2010.

**Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.

**Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.

**Watson PF.** The protection of ram and bull spermatozoa by the low-density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *J Thermal Biol*, v.1, p.137-141, 1976.

**Watson PF.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, v.62, p.483-492, 1981.

**Williams AC, Ford WCL.** Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertil Steril*, v.83, p.929-936, 2005.

**Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI.** Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci*, v.76, p.99-111, 2003.

**Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X.** Effect of vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.217-222, 2010.

---