



Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos

Perspectives on the use of antioxidants on the conservation of the boar semen

R.M.M. Rondon¹, A.A. Araújo², R. Toniolli², F.C.M. Rondon³

¹Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

Correspondência: fcmrondon@yahoo.com.br

Resumo

A inseminação artificial é uma prática de rotina nas granjas de suínos no Brasil, porém o tempo de conservação do sêmen diluído ainda é um problema devido à alta sensibilidade das células espermáticas ao choque térmico e ao alto grau de estresse oxidativo presente. Assim, o objetivo do presente trabalho foi reportar as diferentes formas de conservação do sêmen suíno e os possíveis fatores presentes durante o estresse oxidativo que diminuem o potencial fecundante dos espermatozoides, demonstrando que os antioxidantes podem servir como uma alternativa para minimizar os efeitos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio durante o protocolo de conservação do sêmen suíno.

Palavras-chave: conservação de sêmen e antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, suíno.

Abstract

Artificial insemination is a practice routine on boar farms in Brazil, but the time for preservation of semen is still an issue due to the high sensitivity of the sperm cells to warm-shock and the high degree of oxidative stress present. Thus, the objective was to report the different forms of boar semen's preservation and factors present during the oxidative stress that reducing the sperm fertilizing potential, and this revision showed that the antioxidants as a potent alternative to minimize these effects induced by reactive oxygen species during the stress caused during the protocol for storage of boar semen.

Keywords: conservation of semen, and antioxidants, reactive oxygen species, swine.

Introdução

A dificuldade em preservar o sêmen durante um período considerável de tempo, de forma consistente e eficaz, tem sido um grande obstáculo no avanço da inseminação artificial, pois a conservação inadequada do sêmen é uma das causas da baixa eficiência reprodutiva (Watson, 2000). O estudo inicial da conservação de sêmen para evitar danos às células espermáticas e manter a viabilidade foi feito a partir de um meio de nutrição que proporcionasse uma fonte de energia, a qual permitisse a viabilidade dos espermatozoides, mantivesse-os fecundantes por um período de vários dias e eliminasse o uso diário do reprodutor. O componente escolhido foi a gema de ovo, que continha estas características para suprir todas as necessidades dos espermatozoides no sêmen conservado (Phillips et al., 1940).

Assim, a necessidade em se utilizar substâncias com ação protetora sobre espermatozoides submetidos a diferentes métodos de conservação, seja resfriamento e/ou congelamento, tem sido amplamente estudada em diferentes espécies de animais domésticos para evitar os danos devido ao choque térmico (Nunes e Combarous, 1995; Alvarenga et al., 2000; Rondon et al., 2008) e ao estresse oxidativo em suínos (Peña et al., 2003, 2004; Moraes et al., 2010a, b). Já está demonstrado que o espermatozoide suíno é extremamente mais sensível ao choque térmico (Bamba e Cran, 1985), portanto o uso de protetores durante o protocolo de conservação é essencial para minimizar o dano acrossomal (Bamba e Cran, 1988).

Outro fator importante que pode ocasionar sérios danos às células, inclusive às espermáticas, é o estresse oxidativo que gera espécies reativas ao oxigênio (ROS). Estas substâncias são prejudiciais para o esperma, diminuindo suas qualidades de viabilidade, e também ocasionam danos irreversíveis no DNA do espermatozoide maduro (De Ambrogi et al., 2006). Além disso, foi comprovado que o espermatozoide suíno é muito sensível ao dano peroxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolípidos da membrana plasmática espermática (Parks e Lynch, 1992; Cerolini et al., 2001) e à baixa capacidade antioxidante do plasma seminal de suínos (Brezczynska-Slevbodzinska et al., 1995). Assim, o equilíbrio entre os benefícios e os riscos de ROS e os antioxidantes, *in vitro* e *in vivo*, parece ser necessário para o funcionamento reprodutivo normal, evitando os efeitos deletérios que tornam improdutivos os espermatozoides tanto do homem (Sikka, 2004) quanto do suíno (Moraes et al., 2010a, b) na refrigeração e/ou congelamento do



sêmen (Valença e Guerra, 2007). Portanto, os estudos envolvendo a análise do estresse oxidativo originado durante a realização de alguns procedimentos laboratoriais podem contribuir para uma possível intervenção terapêutica com antioxidantes que auxiliem no avanço das técnicas reprodutivas (Guerra et al., 2004; De Ambrogi et al., 2006).

Com base no exposto, objetivou-se reportar os diferentes métodos de conservação do sêmen suíno e discutir o papel dos antioxidantes em minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre os espermatozoides de suínos.

Conservação do sêmen

A conservação do sêmen por refrigeração, apesar de ser uma técnica muito utilizada na suinocultura, com resultados semelhantes à da monta natural, tem o seu uso restrito a um período de dois a três dias após a coleta (Watson, 2000). A expectativa sobre a possibilidade de prolongar o tempo de conservação do sêmen por um período considerável continua sendo um grande desafio para os profissionais da área (Deschamps et al., 1997; Watson, 2000).

Durante a conservação do sêmen por refrigeração (15 a 17°C), ocorre o desequilíbrio iônico intra e extracelular, o qual pode reduzir a motilidade espermática e apresentar problemas de fertilidade, porém neste intervalo os efeitos deletérios não se mostraram significativos (Watson, 1995). Em temperaturas de 25 a 5°C, ocorre a redução da fluidez dos lipídeos na membrana do espermatozoide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (Buhr et al., 2000). Em temperaturas inferiores a 15°C, ocorre significativa redução da motilidade espermática (De Leeuw et al., 1990). Esse fato é relevante para a conservação dos espermatozoides de suínos (Watson, 1995).

A refrigeração do sêmen suíno, quando efetuada de modo inadequado, causa choque térmico que induz a ocorrência de danos parcialmente irreversíveis aos gametas masculinos, os quais se caracterizam por padrão anormal de movimento do espermatozoide (movimento circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma, danos à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. Muitos desses danos são decorrentes de alterações da membrana à medida que os espermatozoides progredem para as mudanças de fase de transição e durante o processo de conservação (Watson 2000; Cerolini et al., 2001; Peña et al., 2003; De Ambrogi et al., 2006).

Outra forma de conservação do sêmen de suínos é a congelação, entretanto esta técnica é raramente executada na prática comercial. As principais razões para isso são as baixas taxas de sobrevivência dos espermatozoides e, conseqüentemente, a elevada concentração exigida na dose de inseminação. Todavia, a criopreservação é uma técnica valiosa, especialmente para a conservação dos recursos genéticos, ou para garantir um fornecimento comercial constante de doses de sêmen no caso de um problema epidemiológico temporário ou de diminuição da produção de sêmen (Cerolini et al., 2001). Esta técnica afeta, além dos parâmetros de motilidade e viabilidade, também a integridade da membrana do espermatozoide. Outro fato que ocorre durante esta etapa *in vitro* é que as células espermáticas têm a capacidade de capturar lipídeos e ácidos graxos do meio circundante para utilizá-los em seu próprio metabolismo (Bwanga, 1991; Watson, 1995; Cerolini et al., 2001). Entretanto, as alterações na membrana dos espermatozoides vêm sendo atribuídas aos processos ocorridos durante a conservação do sêmen, quando cerca de 10 a 50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem ao processo de congelação e morrem (Watson, 2000). Portanto, os procedimentos de refrigeração e congelação/descongelação do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (Bamba e Cran, 1988; Cerolini et al., 2001; De Ambrogi et al., 2006).

Diluidores

Os diluidores amplamente utilizados para diluição e conservação do sêmen são Kiev[®] (Johnson et al., 1982), etileno diamino tetracetato (EDTA), Zorlesco (Paquignon et al., 1987), Beltsville Thawing Solution - BTS[®] (Woelders, 1992) e água de coco em pó -ACP[®] (Rondon et al., 2008).

Vasconcelos et al. (2001) trabalharam com os diluidores BTS[®], Zorlesco[®] modificado (ZOR) e BTZOR (Faculdade de Maringá, PR) e avaliaram as características do sêmen suíno e o período de conservação. Os resultados demonstraram que período de conservação foi maior no BTZOR (4,94 ± 0,30 dias), seguido pelos ZOR (4,62 ± 0,29 dias) e BTS (3,27 ± 0,30 dias), mantendo os espermatozoides viáveis quanto à motilidade progressiva e ao vigor. Outro estudo realizado por Alexopoulos et al. (1996) demonstrou que ocorrem reduções significativas de motilidade progressiva no sêmen de suíno conservado em BTS[®] a partir de 48 horas.

No Brasil, são utilizados vários tipos de diluidores comerciais nos processos de conservação do sêmen suíno, como o BTS[®] e o Merck (Reis, 1997). Porém, tem aumentado o interesse por diluidores naturais, como a água de coco, que vem sendo usado em granjas da região Nordeste, mantendo dentro dos padrões de qualidade as características de vigor e motilidade espermática dos espermatozoides de diversas espécies de animais



domésticos *in vitro* (Nunes e Combarrous, 1995; Toniolli et al., 1998; Rondon et al., 2008) e *in vivo* (Toniolli e Mesquita, 1990; Toniolli et al., 1997; Sousa, 1998; Nunes e Salgueiro, 1999).

Crioprotetores penetrantes e não penetrantes

Ao longo de vários anos, uma gama de substâncias tem sido utilizada para fornecer proteção adequada às células espermáticas durante a criopreservação. Estas substâncias foram divididas em crioprotetores penetrantes e não penetrantes (Keith, 1998). Contudo, os resultados insatisfatórios obtidos com sêmen suíno congelado, em geral, são atribuídos à ineficiência dos diluidores e crioprotetores, o que sugere que novas soluções crioprotetoras e métodos diferentes de congelamento devam ser testados (Buhr et al., 2000).

Os crioprotetores não penetrantes são algumas substâncias, dentre as quais lipídeos, lipoproteínas e macromoléculas eficientes na proteção dos espermatozoides durante a congelamento, sem que, para isto, necessitem penetrar nas células, incluindo-se neste grupo a gema de ovo, o leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (Keith, 1998).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra como no extracelular, sendo mais comumente utilizados glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (Keith, 1998). O uso do glicerol como meio crioprotetor proporcionou uma melhora nos resultados. No entanto, encontrar o meio crioprotetor ideal não é tarefa fácil. O próprio glicerol é utilizado em diferentes concentrações, dependendo da espécie animal, devido a sua agressão tóxica à célula (Critser et al., 1988). A concentração de glicerol é lesiva aos espermatozoides do suíno se for adicionado a mais de 3%, do bovino a mais de 8% e do rato a mais de 1,7% (Holt, 2000). Outro conceito aceito entre os pesquisadores da área diz respeito ao envase, que deve ser efetuado em palhetas de 0,5 mL, pois os resultados são superiores a *pellets* ou palhetas maiores (Johnson et al., 2000). Além disso, outro estudo com sêmen de suíno demonstrou que o uso do crioprotetor intracelular dimetilacetamida, na concentração de 5%, proporcionou, nas avaliações *in vitro*, resultados superiores ao tratamento-controle (glicerol 3%), não diferindo na avaliação *in vivo* (Bianchi et al., 2008).

Membrana do espermatozoide suíno

Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática (MP) que define a sua delimitação, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a MP determina a composição do citoplasma celular (Cooper, 1996) e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (Singer e Nicolson, 1972). A membrana plasmática é composta por uma dupla camada de fosfolípido e proteínas associadas (Cooper, 1996). As membranas espermáticas seguem o modelo clássico de membrana plasmática (Watson, 1995). Entretanto, a membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos apresenta-se organizada em domínios regionais bem delineados, que diferem em composição e função (Wolfe et al., 1998). Na cabeça do espermatozoide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal, a membrana pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial, sendo que os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. No flagelo, observa-se o domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e o domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (Eddy e O'Brien, 1994).

A membrana plasmática representa relevante papel na capacidade fertilizante destas células, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, bem como no trânsito e armazenagem no epidídimo, na ejaculação, no depósito no trato genital feminino e, finalmente, na capacitação e penetração do oócito (Holt, 1995; Watson, 1995; Lenzi et al., 1996). Portanto, esta estrutura deve apresentar-se íntegra física e funcionalmente para que a célula tenha viabilidade e capacidade fertilizante (Parks e Graham, 1992).

O acrossoma é importante por conter enzimas hidrolíticas necessárias para penetração dos ovócitos e está intimamente associado à fertilização (Rodrigues-Martinez et al., 1997). Além disso, esta estrutura é parte fundamental nos processos de fertilização, e qualquer alteração pode inibir a capacidade fecundante do espermatozoide (Bennermann et al., 2000).

Nos suínos, as principais diferenças na membrana espermática são: menor porcentagem de moléculas de colesterol e sua distribuição de maneira assimétrica na membrana, tendo uma quantidade maior de glicerol na monocamada interna do que na monocamada externa, uma quantidade menor de fosfatidilcolina e uma quantidade maior de fosfatidiletanolamina e esfingomielina, além de diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolípídeos que possuem poucas duplas ligações do tipo *cis* (Johnson et al., 2000). Estas diferenças estruturais na membrana do espermatozoide ajudam a explicar sua alta sensibilidade ao choque pelo frio. Com o choque térmico, ocorre aumento da permeabilidade da membrana espermática e consequente perda de cátions e enzimas através dela, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana, além de mudanças no movimento lateral dos canais iônicos (Buhr et al., 2000; Johnson et al., 2000), o que não favorece os processos de difusão (De Leeuw et al., 1990).

A falta de conhecimentos bioquímicos sobre as membranas dos espermatozoides é o principal entrave



para o desenvolvimento tecnológico (Antunes, 2007).

Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias como vitaminas, minerais, pigmentos naturais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos vegetais, os quais bloqueiam ou neutralizam o efeito danoso provocado pelos radicais livres (Wilhelm-Filho, 1994).

A vitamina E (α -tocoferol), antioxidante mais conhecido, lipossolúvel, protege as células de radicais livres de oxigênio, *in vitro* e *in vivo*. Acredita-se ser o inibidor primário das espécies reativas ao oxigênio (ROS) encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal humano (Sikka, 2004) e suíno (Satorre et al., 2007; Moraes et al., 2010a, b). Sua função é proteger as células do estresse oxidativo (Sikka, 1996; Satorre et al., 2007; Moraes et al., 2010a, b) e também dos efeitos sobre a motilidade espermática semelhante àquela observada na utilização de seus análogos (α -tocoferol e Trolox[®]; Brezezinska-Slevbodzinska et al., 1995; Satorre et al., 2007; Moraes et al., 2010a, b). O processo de oxidação atua diferentemente entre as estruturas das células espermáticas de diversas espécies. Assim, os efeitos da vitamina E podem variar com o uso da dose utilizada, ou de acordo com a quantidade de radicais hidroxilas a serem inativados (Valença e Guerra, 2007). A vitamina E tem efeito antioxidante sobre o sêmen de suíno, possibilitando aumento da velocidade espermática e do percentual de motilidade (Brezezinska-Slevbodzinska et al., 1995; Jeong et al., 2009). A vitamina C também atua sinergicamente com a vitamina E, por meio da geração do grupo de tocoferóis a partir de radicais tocoferoxil produto da interação de tocoferol com as espécies reativas ao oxigênio (ROS); (Valença e Guerra, 2007).

Outros mecanismos de defesa antioxidante presentes no plasma seminal e na célula espermática incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GSH), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Esta última atua como catalisadora na reação de redução do peróxido de hidrogênio à água e ao oxigênio molecular. Seu papel antioxidante diminui os riscos de formação do radical hidroxila a partir do H₂O₂, via reação de Fenton (Wilhelm-Filho, 1994).

Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem sua oxidação. Desse modo, os antioxidantes atuam como protetores contra a oxidação de biomoléculas por radicais livres, impedindo que a reação em cadeia seja avariada (Halliwell e Gutteridge, 1999). Neste perfil, incluem-se a glutatona reduzida (GSH), o urato, o ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenoides e as ubiquinonas (coenzima Q), o ácido úrico e o ácido lipóico (Nordberg e Arnér, 2001).

Espécies reativas ao oxigênio

O elemento oxigênio pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, conferindo ao radical uma alta reatividade (Halliwell e Gutteridge, 1999). As ROS incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos (Wilhelm-Filho, 1994). Em condições fisiológicas, o oxigênio sofre uma redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água. Durante esta reação, são elaborados reativos intermediários, como os radicais superóxido, hidroperoxila e hidroxila. Além destes, há o não radical, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), extremamente danoso, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas e, uma vez produzido, é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutatona peroxidase e a peroxirredutase (Nordberg e Arnér, 2001).

O efeito prejudicial das ROS sobre o espermatozoide foi sugerido por Macleod (1943), o qual demonstrou que a exposição do espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade, de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (White e Aitken, 1989).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre processos bioquímicos que conduzem à produção de ROS e substâncias oxidantes responsáveis pela sua remoção (Sayre et al., 2008). Com o metabolismo equilibrado, os mamíferos produzem radicais livres para destruir bactérias nocivas, vírus e fungos (Halliwell e Gutteridge, 1989; Aitken e Krausz, 2001). Os estresses oxidativo e osmótico causam danos às membranas plasmáticas e acrossomal, respectivamente, assim como contribuem para a antecipação da capacitação e da reação acrossomal, no processo de refrigeração e de congelamento/descongelamento, reduzindo a longevidade do espermatozoide (De Ambrogi et al., 2006; Satorre et al., 2007; Moraes et al., 2010a, b).



Macleod (1943) sugeriu que a exposição do espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica, incluindo perda de motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA) e perda de enzimas intracelulares que afetavam a capacidade fertilizante do espermatozoide. Este fato também foi comprovado em espermatozoides de suínos (De Ambrogi et al., 2006).

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas sobre os efeitos do estresse oxidativo na célula espermática, especialmente no sêmen de humanos (Aitken e Krauz, 2001) e no sêmen de suínos (Cerolini et al., 2001), observando-se, especialmente, a grande atuação dos peróxidos sobre as membranas espermáticas e a baixa capacidade antioxidante no plasma seminal de suínos (Brezezinska-Slembodzinska et al., 1995), o que estimulou o trabalho de Kowalowka et al. (2008), os quais estudaram o efeito da superóxido dismutase (SOD) extracelular e cujos achados encontrados refletem que a presença desta enzima antioxidante no plasma seminal de suínos é fundamental para minimizar os efeitos deletérios ocasionados durante o estresse oxidativo.

Considerações finais

A partir do exposto, pode-se observar que o conhecimento sobre a conservação do sêmen suíno em refrigeração prolongada e/ou congelamento é de grande relevância para o entendimento das características básicas das células espermáticas afetadas pelo estresse oxidativo. Além disso, o uso de antioxidantes pode proteger a membrana do espermatozoide, tornando-se uma alternativa a ser considerada no sentido de minimizar ou impedir as injúrias causadas pelos radicais livres de oxigênio, evitando, assim, a perda no potencial fecundante dos espermatozoides.

Referências

- Aitken RJ, Krausz C.** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.
- Alexopoulos C, Boscos C, Saratsis P, Saoulidis C, Kyriakis S.** The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville Thaw Solution (BTS) extender. *Anim Prod*, v.62, p.599-604, 1996.
- Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.** Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, v.32, p.541-545, 2000.
- Antunes RC.** Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. *Rev Bras. Reprod Anim*, v.31, p.60-63, 2007.
- Bamba K, Cran DG.** Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J Reprod Fertil*, v.75, p.133-138, 1985.
- Bamba K, Cran DG.** Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J Reprod Fertil*, v.82, p.509-518, 1988.
- Bennermann PE, Bortolozzo FP, Wentz I, Cardoso MRI.** Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Cienc Rural*, v.30, p.313-318, 2000.
- Bianchi I, Calderan K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim RR, Rambo G, Corrêa EK, Lucia-Jr T, Deschamps JC, Corrêa MN.** Inseminação artificial intrauterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. *Cienc Rural*, v.38, p.1978-1983, 2008.
- Brezezinska-Slembodzinska E, Slembodzinski AB, Prietas B, Wiczorek G.** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Element Res*, v.47, p.69-74, 1995.
- Buhr MM, He L, Kasimanickam V.** Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: Johnson LA, Guthrie HD (Ed.). *Boar Semen Preservation IV*. Beltsville, MD: Allen Press, 2000. p.61-69.
- Bwanga CO, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H.** Criopreservação de boar semen II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini-and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet Scand*, v.32, p.455-461, 1991.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM.** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, v.121, p.395-401, 2001.
- Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneron BW, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*, v.50, p.314-20, 1988.
- Cooper GM.** *The cell: a molecular approach*. Washington: ASM Press, 1996. 673p.
- De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C.** Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1994-2000, 2006.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Criobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- Deschamps JC, Corrêa MN, Lucia JRT.** Impacto da inseminação artificial em suínos. *Rev Bras Reprod Anim*,



v.22, p.75-79, 1997.

Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon. In: Knobil E, Neil JD (Ed.). The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994. p.29-77.

Guerra MMP, Evans G, Maxwell WEC. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: revisão de literatura. Rev Bras Reprod Anim, v.28, p.187-195, 2004.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

Holt WV. Fundamental aspects of sperm os cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology, v.53, p.47-53, 2000.

Holt WV. The sperm plasma membrane. In: International Symposium on Human Sperm Acrossome Reaction, Physiological and Pharmacological Induction and Transduction Pathways, 1995, Collioure, France. Proceedings... Collioure, France: International Society of Andrology, 1995.

Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. Cryobiology, v.58, p.181-189, 2009.

Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Rademaker, JHM, Rexroad-Jr CE. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18°C. J Anim Sci, v.54, p.132-141, 1982.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell, WM. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci, v.62, p.143-172, 2000.

Keith SL. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. 1998. 104f. Tese - Colorado State University Fort Collins, Colorado, 1998.

Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzezek, J. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. Reprod Domest Anim, v.43, p.490-496, 2008.

Lenzi A, Picardo M, Gandini, L, Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum Reprod Update, v.2, p.246-256, 1996.

Macleod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. Am J Physiol, v.138, p.512-518, 1943.

Moraes EA, Torres CAA, Guimarães JD, Carvalho GR, Murgas LDS, Costa EP. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5°C. Rev Bras Zootec, v.39, p.1460-1468, 2010a.

Moraes EA, Torres CAA, Guimarães JD, Murgas LDS. Efeito de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características físicas e morfológicas do sêmen in natura de suínos. Arq Bras Med Vet Zootec, v.62, p.521-527, 2010b.

Nordberg J, Arnér SJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biol Med, v.31, p.1287-1312, 2001.

Nunes JF, Combarrous Y. Utilização da água de coco e suas frações como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. In: Simpósio Nacional da Reprodução de Mamíferos Domésticos, 1, 1995, Fortaleza. Anais... Fortaleza: SNBRMD, 1995. p.57-63.

Nunes JF, Salgueiro CCM. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. Rev. Cient. Prod. Anim., v.1, p.17-46, 1999.

Paquignon M, Bussiere J, Bariteau F. Resultats recents en matiere de technologies de la conservation de la semence de verrat. Journ Rech Porcine, v.19, p.63-78, 1987.

Parks JE, Grahah JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, v.38, p.209-222, 1992.

Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology, v.29, p.255-266, 1992.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez 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.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. Zygote, v.12, p.117-124, 2004.

Phillips PH. The preservation of bull semen. J Biol Chem, v.130, p.415, 1940.

Reis FT. Coleta, avaliação e manipulação do ejaculado de suínos. Rev Bras Reprod Anim, v.21, p.22-29, 1997.

Rodrigues-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod Fertil Dev, v.9, p.297-308, 1997.

Rondon RMM, Rondon FCM, Nunes JF, Alencar AA, Sousa FM, Carvalho MAM. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluidor de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). Rev Bras Saúde Prod Anim, v.9, p.848-854, 2008.



- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB.** α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, v.68, p.958-965, 2007.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA.** Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, v.21, p.172-188, 2008.
- Sikka SC.** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, v.1, p.78-86, 1996.
- Sikka SC.** Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, v.25, p.5-18, 2004.
- Singer SJ, Nicolson GL.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, p.720-31, 1972.
- Sousa FM.** Efeitos do ácido indol 3-acético (IAA) sintético na estocagem de sêmen do galo (*Gallus*). 1998. 103f. (Tese de Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1998.
- Tonioli R, Courot M, Combarous Y, Bussière J.** Fração ativa da água de coco: conservação e fertilidade do sêmen de suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.29-40, 1997.
- Tonioli R, Mesquita DSM.** Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S. *Rev Bras Reprod Anim*, v.14, p. 249-254, 1990.
- Tonioli R, Mesquita DSM, Cavalcante SG.** Avaliação in vitro do sêmen suíno diluído em PBS e na água de coco in natura e estabilizada. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.198-201, 1998.
- Valença RMB, Guerra MMP.** Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.47-53, 2007.
- Vasconcelos AMMA, Moraes GV, Moreira I, Martins EN.** Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno e conservados em diferentes diluentes. *Rev Bras Zootec*, v.30, p.394-401, 2001.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment 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.
- White DR, Aitken RJ.** Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res*, v.22, p.163-177, 1989.
- Wilhelm-Filho D.** Oxigênio, radicais livres de oxigênio e saúde. *Biotemas*, v.7, p.7-18, 1994.
- Woelders H.** Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. *Pigs- Misset*, v.8, p.22-23, 1992.
- Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R.** Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane spermatozoa. *Biol Reprod*, v.59, p.1506-1514, 1998.
-