



Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal

Presence of antioxidants in teleost sperm and its use in supplementation of seminal freezing media

Júlia Trugílio Lopes^{1,3}, Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley^{1,2}, Priscila Silva de Almeida-Monteiro¹

¹Faculdade Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

³Correspondência: juliatrugilio@gmail.com

Resumo

A criopreservação seminal é uma ferramenta promissora para o desenvolvimento da aquicultura, entretanto, seus efeitos incluem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando danos à célula espermática e reduzindo sua viabilidade após a descongelamento seminal. Além disso, a diluição do sêmen reduz a concentração dos constituintes do plasma seminal, incluindo antioxidantes. Dessa forma, a utilização de terapias antioxidantes tem ganhado destaque nos protocolos de criopreservação seminal de peixes. Assim, essa revisão teve como objetivo abordar a utilização de antioxidantes na suplementação de meios de congelamento e elencar os antioxidantes empregados com sucesso na criopreservação seminal de peixes teleósteos. A utilização dessas substâncias tem promovido melhorias no movimento espermático, reduzido danos ao DNA espermático e elevado taxas de fertilização e eclosão. Entretanto, sua ação antioxidante sofre elevada variação interespecífica, gerando a necessidade de se testar diferentes tipos de antioxidantes e concentrações, buscando a melhor opção para as espécies de interesse.

Palavras-chave: criopreservação, espermatozoide, estresse, oxidativo, peixe, reprodução.

Abstract

The seminal cryopreservation is a promising tool for the development of aquaculture, however, its effects include increased production of reactive oxygen species (ROS), causing damage to sperm cells and reducing their viability after thaw seminal. Furthermore, the semen dilution reduces the concentration of seminal plasma constituents, including antioxidants. The use of antioxidant therapies has been notable in fish seminal cryopreservation protocols. Therefore, this review aimed to address the use of antioxidants supplementation in freezing media and list the antioxidants employed successfully in seminal cryopreservation of teleost fish. The use of these substances has improved sperm movement, reduced damage to sperm DNA and increased fertilization and hatching rates. However, the action of these substances suffer high interspecific variation, generating the need to test different types of antioxidants and concentrations, seeking the best option for the species of interest.

Keywords: cryopreservation, fish, oxidative stress, reproduction, spermatozoa.

Introdução

Responsável por 40% da produção mundial de pescado, a aquicultura tem se esforçado para ser um setor mais produtivo e sustentável. Considerada fundamental no atendimento à crescente demanda por produtos da pesca, a aquicultura tem sido impulsionada pelo aumento da população mundial e pela busca por uma alimentação mais saudável (FAO, 2014). Entretanto, para alcançar tais expectativas, faz-se necessário o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias que tornem a produção de pescado na aquicultura cada vez mais eficiente.

Nesse contexto, a criopreservação seminal aparece como uma biotecnologia reprodutiva que, aliada à aquicultura, tem a capacidade de solucionar problemas relacionados à redução dos estoques naturais de espécies aquícolas, auxiliando no aumento da oferta de alimentos e na manutenção do material genético em programas de preservação de espécies (Murgas et al., 2014). Apesar das vantagens, o processo de criopreservação pode causar danos às células espermáticas como choque térmico, formação intracelular de cristais de gelo, alterações nas membranas e estresse oxidativo (Watson, 1995), comprometendo sua integridade estrutural e funcional.

Condições como exposição ao oxigênio atmosférico e a choques térmicos, às quais o sêmen fica submetido durante o processo de criopreservação, aumentam a susceptibilidade à peroxidação lipídica, resultando em produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Shaliutina-Kolesová et al., 2015). O estresse oxidativo resultante pode levar à redução da motilidade e da viabilidade espermáticas e à diminuição da capacidade fertilizante do sêmen (Ball, 2008). Danos no DNA também têm sido associados aos danos provocados pelo estresse oxidativo no sêmen de peixe (Pérez-Cerezales et al., 2009). Além disso, a diluição do



sêmen pela adição de soluções criodiluidoras, indispensáveis para sua congelamento, altera sua composição, pois dilui seus componentes, dentre os quais os antioxidantes (Butts et al., 2010).

Assim, como forma de minimizar o problema, a suplementação das soluções criodiluidoras com antioxidantes visa aumentar o poder antioxidante e o reestabelecimento dos níveis apropriados desses componentes no plasma seminal, buscando tornar esse meio adequado à sobrevivência espermática durante o processo de criopreservação, capaz de fornecer melhores resultados de qualidade espermática pós-descongelamento.

Dessa forma, objetivou-se com essa revisão abordar a presença de antioxidantes no sêmen de peixes teleósteos, bem como as principais substâncias antioxidantes já empregadas com sucesso na suplementação de meios de congelamento seminal desse grupo animal.

Antioxidantes e sua presença no sêmen

As EROs são produzidas constantemente pelo metabolismo aeróbio celular e seu excesso pode levar ao estresse oxidativo, promovendo várias alterações patológicas, incluindo lesões na membrana plasmática e no DNA (Słowińska et al., 2013). Para proteger o organismo do estresse oxidativo, existem sistemas antioxidantes, compostos por substâncias produzidas pelo próprio organismo ou adquiridas por meio da dieta (Barreiros et al., 2006).

As células espermáticas são facilmente submetidas ao estresse oxidativo em virtude da carência de citoplasma, fonte natural de enzimas antioxidantes (Saleh e Agarwal, 2002). Isso acontece pois, nos estágios finais da espermatogênese, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma, sendo privados de uma fração dos antioxidantes endógenos (Carvalho et al., 2002). Além disso, a membrana plasmática dos espermatozoides é composta por lipídios na forma de ácidos graxos poliinsaturados, que são vulneráveis aos ataques de EROs (Wathes et al., 2007).

Contudo, no sêmen estão presentes compostos que constituem os sistemas de defesa antioxidantes (Sanocka e Kurpisz, 2004; Silva et al., 2011), presentes no interior da célula espermática e no plasma seminal, sendo o plasma seminal o principal responsável pela proteção do sêmen contra o estresse oxidativo (Metwally e Fouad, 2009; Shaliutina-Kolešová et al., 2013).

Os antioxidantes são compostos que atuam regulando, removendo e suprimindo a formação de EROs ou que antagonizam as ações destas (Sikka, 1996; Sikka, 2004; Maneesh e Jayalekshmi, 2006), evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (Degáspari e Waszczynskyj, 2004). O mecanismo de defesa antioxidante é dividido em três etapas: Prevenção, na qual ocorre a inibição da produção de EROs; intercepção, que interrompe a reação em cadeia da oxidação, impedindo a atuação das EROs; e reparação, na qual os danos causados por EROs são corrigidos (Saleh e Agarwal, 2002). Além disso, o sistema de defesa antioxidante é dividido em sistema enzimático e não-enzimático e ambos protegem o organismo contra as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Barreiros et al., 2006).

Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas, oriundas ou não do próprio organismo (Barreiros et al., 2006). Entre os antioxidantes enzimáticos presentes no sêmen, pode-se citar a superóxido dismutase, a catalase e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase (Carvalho et al., 2002; Zini et al., 2002; Alvarez e Moraes, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas, que, em geral, são de origem dietética (Barbosa et al., 2010). Como exemplos desta categoria de antioxidantes, tem-se α -tocoferol, ácido ascórbico, urato, piruvato, glutatona, taurina e hipotaurina. Tanto os antioxidantes enzimáticos quanto os não-enzimáticos reduzem as concentrações dos agentes oxidantes no sêmen a níveis fisiológicos e mantêm a fertilidade natural e assistida dos indivíduos (Agarwal e Saleh, 2002; Saleh e Agarwal, 2002). Ademais, a ação dos dois sistemas, enzimático e não-enzimático, pode ocorrer de forma conjunta, uma vez que a atividade enzimática muitas vezes depende da participação de antioxidantes de origem dietética como cofatores (Barbosa et al., 2010). A vitamina E, por exemplo, pode atuar na restauração dos níveis de glutatona e, assim, inibir a peroxidação lipídica (Sikka, 2004).

Antioxidantes naturalmente presentes no sêmen de peixes

O plasma seminal e os espermatozoides de peixes teleósteos apresentam, naturalmente, diferentes tipos de antioxidantes (Liu et al., 1995; Ciereszko et al., 2000; Lahnsteiner et al., 2010) que são importantes na manutenção da viabilidade do sêmen em condições *in vivo* e que, possivelmente, têm relevância na prática de suplementação de meios de armazenamento de sêmen e soluções diluidoras para melhorar a qualidade espermática na criopreservação.

Entre os antioxidantes presentes no sêmen de peixes, o ácido ascórbico (Ciereszko e Dabrowski, 1995; Metwally e Fouad, 2009) e o ácido úrico (Ciereszko et al., 1999) são considerados antioxidantes importantes no sêmen de teleósteos, já detectados em espécies como a *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) e a *Ctenopharyngodon idellus* (carpa capim). Além destes, já foram detectados o tocoferol, no sêmen de *Salmo*



trutta f. fario (truta marrom) (Lahnsteiner e Mansour, 2010), a metionina e a metionina redutase em *O. mykiss* e *Cyprinus carpio* (carpa comum) (Lahnsteiner, 2009), a glutatona reduzida em *Acipenser baerii* (esturjão-siberiano) *Acipenser ruthenus* (esturjão) e em *Perca fluviatilis* (perca europeia) e *Sander lucioperca* (lucioperca) (Stejskal et al., 2008), e a catalase, a peroxidase e a superóxido dismutase em *Salvelinus alpinus* (truta do ártico) e *S. trutta f. fario* (Mansour et al., 2006; Lahnsteiner et al., 2010).

A presença, concentração e modo de atuação dessas substâncias no sêmen ocorrem de maneira espécie-específica, podendo variar ainda de acordo com a frequência de coleta seminal e com o tipo de dieta a qual o animal está submetido. Apesar disso, poucas espécies de peixes já tiveram seus compostos antioxidantes, naturalmente presentes no sêmen, descritos na literatura, entre elas estão *Dicentrarchus labrax* (robalo europeu), *Sparus aurata* (dourada), *O. mykiss*, *C. carpio* e *Salvelinus fontinalis* (truta de riacho) (Cabrita et al., 2011, Ciereszko e Dabrowski, 1995; Lahnsteiner e Mansour, 2010; Lahnsteiner et al., 2011).

Agentes antioxidantes já utilizados na criopreservação seminal de peixes

Em peixes, a utilização de antioxidantes na suplementação dos meios de congelamento seminal tem apresentado resultados promissores na qualidade do sêmen pós-descongelado das seguintes espécies: *S. fontinalis*, *S. aurata*, *D. labrax*, *Prochilodus lineatus*, *O. mykiss* e *C. carpio*. Já foram utilizados, com resultados positivos: catalase, superóxido dismutase, glutatona reduzida, sistema glutatona reduzida/oxidada, metionina, ácido úrico, taurina, hipotaurina, ácido ascórbico, -tocoferol, carnitina e cisteína (Lahnsteiner et al., 2011; Cabrita et al., 2011; Martínez-Páramo et al., 2013; Navarro et al., 2014; Kutluyer et al., 2014; Öğretmen et al., 2015).

A catalase, uma enzima antioxidante encontrada na região do peroxissoma e mitocôndria das células, atua de forma complementar à superóxido dismutase, convertendo o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Sikka, 1996; Maneesh e Jayalekshmi, 2006), reduzindo o risco de formação de radical hidroxila. Quando incorporada, na concentração de 100 U/L, ao meio de congelamento seminal de *S. fontinalis*, promoveu o aumento da taxa de fertilização, quando comparada com a catalase na concentração de 250 U/L, com a superóxido dismutase (250 U/L e 500 U/L), com a peroxidase (500 U/L), com a glutatona oxidada e com a glutatona reduzida (1,5 mmol/L e 3mmol/L) (Lahnsteiner et al., 2011).

A superóxido dismutase é capaz de catalisar a dismutação do O_2^{++} (superóxido) em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e O_2 (oxigênio), os quais sofrem ação da glutatona peroxidase e da catalase (Silva e Guerra, 2012). Sua adição ao meio de congelamento, na concentração de 250 U/L, levou ao aumento da taxa e da duração da motilidade espermática do sêmen descongelado de *O. mykiss* (Kutluyer et al., 2014).

A glutatona reduzida participa dos mecanismos antioxidantes como parte do substrato da enzima glutatona peroxidase, transformando o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água. A glutatona oxidada, por sua vez, pode ser transformada em glutatona reduzida por ação da glutatona redutase (Sikka, 2004). Em peixes, o emprego da glutatona reduzida, na concentração de 1,5 mmol/L, foi responsável pelo aumento da taxa e da duração da motilidade do sêmen de *O. mykiss* (Kutluyer et al., 2014) e elevou a taxa de fertilização quanto testada, na mesma concentração, para a criopreservação do sêmen de *S. fontinalis* (Lahnsteiner et al., 2011). Já a adição conjunta de glutatona reduzida e oxidada, também em concentração de 1,5 mmol/L, na composição do meio de congelamento seminal de *S. fontinalis*, proporcionou o aumento da velocidade espermática no sêmen criopreservado (Lahnsteiner et al., 2011).

A metionina, em sua forma reduzida, protege os espermatozoides por se ligar às EROs (Lahnsteiner e Mansour, 2010), prevenindo o estresse oxidativo. Esse aminoácido já foi testado com sucesso como suplemento em meios de congelamento para *S. fontinalis* e *O. mykiss*, na concentração de 1,5 mmol/L promovendo o aumento da velocidade espermática, taxa de fertilização e da taxa e a duração da motilidade espermática (Lahnsteiner et al., 2011; Kutluyer et al., 2014).

O ácido úrico, um forte agente redutor e, portanto, um potente agente antioxidante, também apresentou bons resultados na criopreservação seminal de *O. mykiss*, aumentando a taxa e duração da motilidade espermática, após a descongelamento, quando utilizada uma concentração de 0,25 mmol/L (Kutluyer et al., 2014).

A taurina, um aminoácido sulfurado essencial com capacidade antioxidante comprovada (Aruoama et al., 1988), atua como um estabilizador de membrana através de interações diretas com fosfolípidios, de modo que essa interação pode ser responsável pela proteção contra a peroxidação lipídica. Além disso, a taurina também apresenta função na regulação transportadores de Ca^{2+} , podendo mostrar efeitos diferenciais na motilidade espermática, já que uma determinada concentração intracelular de Ca^{2+} é necessária para desencadear a ativação dos espermatozoides de peixes (Martínez-Páramo et al., 2013). Na concentração de 1 mmol/L, proporcionou elevação da motilidade espermática e da estabilidade do DNA espermático de dourada (*Sparus aurata*) (Cabrita et al., 2011) e promoveu melhora dos parâmetros de motilidade espermática de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), aumentando a velocidade e linearidade espermáticas, e a redução da fragmentação de DNA (Martínez-Páramo et al., 2013).

A hipotaurina, por sua vez, demonstrou ser um excelente captador de oxidantes, tais como o radical



hidroxila, o peróxido de hidrogênio e radicais superóxido e sua oxidação resulta na formação de taurina. Por ser um precursor desta, a hipotaurina pode estar, indiretamente, relacionada à regulação osmótica e à proteção da membrana espermática (Martínez-Páramo et al., 2013). Testada nas concentrações de 1 e 10 mmol/L, levou a uma redução da fragmentação do DNA espermático de *S. aurata* (Cabrita et al., 2011). Na concentração de 1 mmol/L, ocasionou aumento da motilidade total e redução na fragmentação de DNA no sêmen criopreservado de *D. labrax* (Martínez-Páramo et al., 2013).

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, neutraliza as EROs e ERNs por meio de reações de redução, com conjunta inibição da peroxidação lipídica (Barreiros *et al.*, 2006). Em diferentes concentrações (0,001 mg/L e 0,5 a 10 mmol/L), a presença de ácido ascórbico no meio de congelamento promoveu a redução da fragmentação de DNA espermático de *S. aurata*, o aumento da taxa e da duração da motilidade espermática do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e melhoria do movimento espermático de *O. mykiss*, aumentando a linearidade e retilinearidade das células espermáticas (Cabrita et al., 2011; Kutluyer et al., 2014; Navarro et al., 2014).

O α -tocoferol, conhecido como vitamina E, é um antioxidante lipossolúvel que pode proteger os espermatozoides contra danos oxidativos ao DNA e à membrana (Sikka, 1996) devido à sua capacidade em prevenir a peroxidação lipídica (Silva e Guerra, 2012). Sua aplicação na suplementação de meios de congelamento seminal elevou, em diferentes concentrações (0,001 mg/L e 0,1 a 2 mmol/L), as taxas de motilidade espermática de *P. lineatus* e *O. mykiss*; e também a duração da motilidade de *P. lineatus*, além de reduzir a fragmentação do DNA espermático em *S. aurata* (Cabrita et al., 2011; Kutluyer et al., 2014; Navarro et al., 2014).

A carnitina atua reduzindo a quantidade de lipídeos disponíveis para a peroxidação, transportando ácidos graxos para o interior da mitocôndria, onde serão utilizados para a formação do ATP (Lisboa, 2014). Sua utilização como suplemento do meio de congelamento seminal promoveu, na concentração de 0,05 mmol/L, a elevação da taxa de motilidade, da linearidade e da retilinearidade espermáticas do sêmen criopreservado de *O. mykiss* (Kutluyer et al., 2014).

A cisteína, um aminoácido sulfurado não essencial, tem propriedades antioxidantes por ser um precursor importante na produção de glutatona, que protege as células contra os radicais livres (Piste, 2013). Na criopreservação do sêmen de *Cyprinus carpio* (carpa comum) a utilização de cisteína levou ao aumento da taxa e duração da motilidade espermática e da taxa de eclosão de larvas, assim como à redução de danos ao DNA espermático. Os efeitos positivos foram observados a partir da utilização das concentrações de 2,5 a 20 mmol/L, de forma que a maior concentração gerou os melhores resultados (Öğretmen et al., 2015).

Além dos antioxidantes já citados, alguns autores relataram bons resultados a partir da utilização de antioxidantes comerciais, entre eles trolox, MDPA (methylenediphosphonic acid) e BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol), que promoveram o aumento da taxa de fertilização e a redução de danos ao DNA espermático, quando testados para o *Huso huso* (esturjão branco) e *S. aurata*, respectivamente (Cabrita et al., 2011; Osipova et al., 2014; Osipova et al., 2016).

Outra abordagem já testada é a utilização de antioxidantes de alvo mitocondrial. Essa abordagem consiste na conjugação de antioxidantes a moléculas capazes permear a membrana interna da mitocôndria, permitindo que o antioxidante alcance seu interior, local de intensa produção de EROs. Nesse contexto, observou-se que a utilização do complexo MitoQ, carreador de ubiquinol, diminuiu a produção de EROs e a peroxidação lipídica e aumentou a viabilidade do sêmen descongelado de *Pelteobagrus fulvidraco* (bagre amarelo) (Fang et al., 2014).

Considerações finais

A adição de agentes antioxidantes ao meio de congelamento seminal tem proporcionado melhorias no movimento espermático, aumentando sua velocidade, linearidade, taxa e duração da motilidade; elevado taxas de fertilização e eclosão; e reduzido os danos ao DNA espermático.

Entretanto, o conhecimento acerca da presença e das concentrações de antioxidantes naturalmente encontrados no sêmen de teleósteos ainda é escasso, uma vez que existe uma elevada variação interespecífica desses fatores. Dessa forma, torna-se difícil a escolha dos antioxidantes a serem empregados na suplementação dos meios de congelamento. Além disso, é importante ressaltar que a adição de antioxidantes ao meio de congelamento exerce efeitos espécie-específicos, o que reafirma a necessidade de se determinar quais os antioxidantes estão naturalmente presentes no sêmen, em cada espécie de interesse, assim como o seu modo de ação; e de se testar diferentes tipos de antioxidantes, bem como diferentes concentrações destes, buscando a melhor opção para a suplementação do meio.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.



Referências

- Agarwal A, Saleh RA.** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*, v.29, p.1-12, 2002.
- Alvarez CA, Moraes GV.** Efeitos da Seleno metionina e vitamina C sobre o sêmen. *Rev Saúde Biol*, v.1, p.42-51, 2006.
- Ball BA.** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.260-267, 2008.
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J.** Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*, v.23, p.629-643, 2010.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*, v.29, p.113-123, 2006.
- Butts IAE, Litvak MK, Kaspar V, Trippel EA.** Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. *Cryobiology*, v.61, p.174-181, 2010.
- Cabrira E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT.** The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.189-195, 2011.
- 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.
- Ciereszko A, Dabrowski K, Kucharczyk D, Dobosz S, Goryczko K, Glogowski J.** The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiol Biochem*, v.21, p.313-315, 1999.
- Ciereszko A, Dabrowski K.** Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol Reprod*, v.52, p.982-988, 1995.
- Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K.** Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, TR, Mazik, PM (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, p.20-48, 2000.
- Degáspari CH, Waszczyński N.** Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v.5, p.33-40, 2004.
- Fang L, Bai C, Chen Y, Dai J, Xiang Y, Ji X, Huang C, Dong Q.** Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. *Cryobiology*, v.69, p.386-393, 2014.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO).** The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and changes. Roma, Italia: FAO, 2014. p.223.
- Kutluyer F, Kayim M, Ögretmen F, Serhat Buyukleblebici S, Tuncer PB.** Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, v.69, p.462-466, 2014.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Kunz FA.** The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved sêmen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, v.76, p.882-890, 2011.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer C.** Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) semen. *Anim Reprod Sci*, v.119, p.314-321, 2010.
- Lahnsteiner F, Mansour N.** A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*, v.307, p.130-140, 2010.
- Lahnsteiner F.** The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol*, v.75, p.816-833, 2009.
- Lisboa FP.** Efeito da adição da L-carnitina e acetil-L-carnitina sobre a viabilidade espermática na refrigeração do sêmen equino. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2014.
- Liu L, Dabrowski K, Ciereszko A.** Protective effect of seminal plasma proteins on the degradation of ascorbic acid. *Mol Cell Biochem*, v.148, p.59-66, 1995.
- Maneesh M, Jayalekshmi H.** Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian J Clin Biochem*, v.21, p.80-89, 2006.
- Mansour N, McNiven MA, Richardson GF.** The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, v.66, p.373-382, 2006.
- Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Soares F, Sarasquete C, Cabrira E.** Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v.66, p.333-338, 2013.



- Metwally MAA, Fouad IM.** Effects of l-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Global Vet*, v.3, p.132-136, 2009.
- Murgas LDS, Felizardo VO, Andrade ES, Ferreira MR, Paula DAJ, Carvalho AFS.** Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish. In: Yamashiro H (Ed.) *Recent Advances in Cryopreservation*. p.59-72, 2014.
- Navarro RD, Navarro FKSP, Felizardo VO, Murgas LDS, Andrade ES.** Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. *Acta Scientiarum: Technology*, v.36, p.55-60, 2014.
- Öğretmen F, Inanan BE, Kutluyer F, Kayim M.** Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*, v.83, p.1548-1552, 2015.
- Osipova VP, Berberova NT, Gazzaeva RA, Kudryavtsev KV.** Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. *Cryobiology*, v.72, p.112-118, 2016.
- Osipova VP, Kolyada MN, Berberova NT, Milaeva ER, Ponomareva EN, Belaya MM.** Cryoprotective effect of phosphorous-containing phenolic anti-oxidant for the cryopreservation of beluga sperm. *Cryobiology*, v.69, p.467-472, 2014.
- Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, de Paz P, Herráez MP.** Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*, v.71, p.605-613, 2009.
- Piste P.** Cysteined master antioxidant. *Inter J Pharm Chem Biol Sci*, n.3, v.14, p.3-9, 2013.
- Saleh RA, Agarwal A.** Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J Androl*, v.23, p.737-752, 2002.
- Sanocka D, Kurpisz, M.** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrin*, v.2, p.1-7, 2004.
- Shaliutina-Kolešová A, Gazo I, Cosson J, Linhart O.** Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. *Czech J. Anim. Sci*, v.58, p.313-320, 2013.
- Shaliutina-Kolešová A, Cosson J, Lebeda I, Gazo I, Shaliutina O, Dzyuba B, Linhart O.** The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenserruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*, v.154, p.66-76, 2015.
- 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.
- Silva ECB, Guerra MMP.** Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Rev Port Ciênc Vet*, v.107, p.143-149, 2012.
- Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP.** In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.874-881, 2011.
- Śłowińska M, Nynca J, Cejko BI, Dietrich MA, Horváth Á, Urbányi B, Kotrik L, Ciereszko A.** Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, v.400-401, p.101-104, 2013.
- Stejskal K, Svobodova Z, Fabrik I, Adam V, Beklova M, Rodina M, Kizek R.** Content of cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of Acipenseriformes (*Acipenser baerii* and *A. ruthenus*) as well as teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). *J Appl Ichthyol*, v.24, p.519-21, 2008.
- Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ.** Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*, v.77, p.190-201, 2007.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Zini A, Fischer MA, Mak V, Phang D, Jarvi K.** Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. *Urol Res*, v.30, p.321-323, 2002.
-