

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (6)

December 2018

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=719&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Criopreservação de sêmen e emprego de vitaminas no meio diluidor: revisão de literatura.

Semen cryopreservation and use of vitamins in the extender medium: literature review

W. Oliveira, M. F. Mota, A. Pinto Neto, B. G. Becher

Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS, Campus Realeza

Author for correspondence: williamoliveira.vet@gmail.com

Resumo. Objetivou-se essa revisão apresentar as principais dificuldades encontradas na criopreservação de sêmen, sendo o estresse oxidativo a mais impactante delas, e evidenciar o potencial antioxidante das Vitaminas C e E, bem como seu uso em meios diluidores de sêmen criopreservado. A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande impacto na pecuária nacional e vem se destacando devido aos avanços das biotecnologias da reprodução animal. A utilização do sêmen criopreservado na inseminação artificial é importante ferramenta para o melhoramento genético de várias espécies animais, sendo detentora de inúmeras vantagens, como a facilidade de comercialização e transporte do sêmen, controle de doenças sexualmente transmissíveis e, principalmente, o expressivo ganho genético. Diferentes meios e aditivos são utilizados na criopreservação do sêmen, buscando conferir maior crioresistência aos espermatozoides durante o ciclo de congelamento/descongelamento, no entanto, e apesar das inúmeras pesquisas na área, aproximadamente 50% das células espermáticas se tornam inviáveis após esse processo. Grandes avanços foram obtidos desde a descoberta do glicerol, sendo de suma importância estudos sobre crioprotetores e demais aditivos como os antioxidantes, a fim de melhorar a viabilidade espermática, visando aumentar o rendimento de doses por ejaculado e as taxas de gestação. Como antioxidantes usados nos meios de congelamento seminal, destacam-se as Vitaminas C e E, que são antioxidantes não enzimáticos. Essas vitaminas são substâncias de baixo peso molecular, que atuam como possíveis removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos, ou como reparadores da lesão já iniciada, tendo potencial para auxiliar na melhoria da viabilidade seminal pós-descongelamento.

Palavras-chaves: Estresse Oxidativo, Espécies Reativas de Oxigênio, Antioxidante, Tocoferol, Ácido Ascórbico

Abstract. The objective of this review was to present the main difficulties encountered in cryopreservation of semen, with oxidative stress being the most impacting of them, and to demonstrate the antioxidant potential of Vitamins C and E, as well as its use in cryopreserved semen dilution media. Semen cryopreservation is a technology of great impact in the national livestock industry and has been increasingly emphasized due to the advances of animal breeding biotechnologies, being the use of cryopreserved semen in artificial insemination, an important tool for the genetic improvement of several animal species and which has many advantages of its application, such as the ease of commercialization and transportation, control of sexually transmitted diseases, and mainly, the expressive genetic gain. Different media and additives are used in cryopreservation of the semen, seeking to confer greater cryoresistance to the spermatozoa during the freeze / thaw cycle. However, despite numerous research in the field, approximately 50% of sperm cells become unviable after the process. Despite the great advances made since the discovery of glycerol, studies on cryoprotectants and other additives such as antioxidants, in order to improve sperm viability, aiming to increase the yield of ejaculated doses and pregnancy rates are of great importance. As antioxidants used in seminal freezing media, stand out Vitamins C and E, which are non-enzymatic antioxidants. These vitamins are substances of low molecular weight, which act as possible removers of the agents that cause oxidative damage, or as repairers of the already initiated lesion, and have the potential to aid in the improvement of seminal viability after thawing.

Keywords: Oxidative Stress, Reactive Oxygen Species, Antioxidant, Tocopherol, Ascorbic Acid

Contextualização e Análise

O Brasil se destaca entre os principais produtores de bovinos no mundo, como reflexo de

um estruturado processo de desenvolvimento, que elevou não só a produtividade dos rebanhos, como também a qualidade do produto brasileiro, passando

a ter, no ano de 2015, o maior rebanho mundial, e o segundo maior exportador de carne bovina no mundo (Gomes et al., 2017).

As biotecnologias usadas na reprodução abrem novas oportunidades e maximizam a melhoria da produtividade dos animais, pelo aumento da qualidade da carcaça, maior desenvolvimento ponderal, maiores índices reprodutivos, melhoramento na nutrição e utilização dos alimentos, levando-se em conta a qualidade e a segurança desta produção (Milazzotto et al., 2008), fazendo com que o país se destaque cada vez mais no segmento pecuário.

Essas biotecnologias também são ferramentas de grande valor para o melhoramento genético, pois otimizam a vida reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, sendo a inseminação artificial a que produz maior impacto na produção animal (Freitas, 2015). Porém, para sua ampla aplicação é indispensável o uso de sêmen congelado (Rodrigues, 2015).

A criopreservação de sêmen se destaca progressivamente devido aos avanços das biotecnologias da reprodução animal, sendo a utilização do sêmen criopreservado na inseminação artificial, um facilitador na comercialização e transporte do sêmen, auxiliando no controle de doenças sexualmente transmissíveis e, principalmente, o expressivo ganho genético (Silva et al., 2011).

Porém, a qualidade do sêmen criopreservado é inferior quando comparado com sêmen fresco, uma vez que o processo de criopreservação causa estresse celular devido as diluições realizadas, promovendo redução na concentração de antioxidantes, advindos das glândulas acessórias do trato reprodutor masculino e da própria célula espermática (Bilodeau et al., 2000). Com a diminuição desses antioxidantes naturais, a célula fica sensibilizada, impondo aos espermatozoides condições desfavoráveis para se manterem viáveis, isso aliado à alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides de mamíferos (membrana plasmática), favorece o surgimento do estresse oxidativo, ocasionado por um desequilíbrio entre produção e neutralização dos radicais livres, podendo afetar diretamente a capacidade fecundante do sêmen (Savi et al., 2012; Zanganeh et al., 2013).

No Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal estão apresentadas as características mínimas que o sêmen bovino deve ter para ser considerado próprio para comercialização no uso da IA incluindo índices de motilidade progressiva, vigor, alterações morfológicas e concentração espermática por palheta (CBRA, 2013). Na maioria das vezes, estas características ajudam na seleção de animais e evitam o uso de partidas de sêmen que poderão resultar em falhas de fertilidade (Celeghini, 2017).

Por outro lado, algumas partidas que apresentam excelentes resultados para as características citadas no sêmen a fresco, quando

criopreservadas e usadas na IA, mostram deficiência no potencial de fertilidade, que pode ser atribuída a alterações em estruturas ou funções espermáticas, não contempladas nas avaliações realizadas, ou devido ao estresse oxidativo gerado no processo de congelação e descongelação (Amidi et al., 2016; Celeghini, 2017).

A qualidade seminal depende das estruturas que compõem a célula espermática estarem intactas, como a membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossoma e cromatina, mantendo suas estruturas e funções fisiológicas, as quais são geralmente avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade fecundante do espermatozoide (Arruda et al., 2011).

Os espermatozoides, morfológicamente, são divididos em cabeça que exerce a função de fertilizar os oócitos e depositar os cromossomos, o flagelo que é responsável pela motilidade, tornando-o apto a percorrer o trato reprodutivo da fêmea, e a peça intermediária composta por mitocôndrias, que tem a responsabilidade de fornecer energia em forma de ATP para o batimento flagelar (Mortimer, 1997; Pinto, 2015).

Adicionalmente, os espermatozoides são cobertos por membranas, que se distinguem de acordo com sua localização (Flesch e Gadella, 2000), sendo nuclear, mitocondrial, acrossomal e plasmática (Pinto, 2015). As membranas são compostas por lipídios e proteínas, e suas principais funções são metabolismo celular, motilidade espermática, reação acrossomal, capacitação e fertilização do oócito (Peña et al., 2005).

Durante o processo de criopreservação o espermatozoide passa pelas etapas de resfriamento, congelação e descongelação, os quais são capazes de danificar as células espermáticas em diferentes níveis, comprometendo o metabolismo energético dos espermatozoides e provocar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a redução na cinética espermática e maior fragmentação de DNA (Schober et al., 2007; Leite et al., 2011).

As ROS, *in vivo*, estão intimamente envolvidas no processo de capacitação espermática e fecundação. No entanto, a geração contínua pode sobrecarregar as defesas antioxidantes limitadas destes gametas, prejudicando às células espermáticas, por ocasionar lesões que levam a queda da motilidade, vigor e até a morte do espermatozoide (Savi et al., 2012; Aitken, 2017). Concomitantemente, os radicais livres podem não levar a morte dos espermatozoides pós-descongelação, podendo observar espermatozoides móveis, porém danificados de maneira que a penetração e fertilização do oócito sejam comprometidas, levando a redução de fertilidade (Wang et al., 2003).

As injúrias ocorridas durante esse procedimento são geralmente devidas as alterações de temperatura e na osmolaridade do meio, provocando mudanças na organização e composição dos lipídios das membranas

espermáticas (Celenghini, 2005). Espermatozoides de mamíferos são muito sensíveis ao resfriamento rápido, ou seja, da temperatura ambiente até próximo ao ponto de congelamento da água, sendo essa redução de temperatura capaz de causar um choque térmico e danos irreversíveis na viabilidade dos espermatozoides, pela rápida diminuição da motilidade, ou surgimento de padrão anormal de movimento, que passa a ser circular ou retrógrado (Leite et al., 2011).

Também no processo de criopreservação se dá a peroxidação lipídica das membranas espermáticas, gerando as ROS, promovendo desestruturação e aumento da permeabilidade da membrana, que contribuem para a ocorrência de danos irreparáveis no DNA, mitocôndrias e cromatina, fazendo com que o espermatozoide perca sua capacidade fecundante (Agarwal et al., 2014; Aitken, 2017; Silva et al., 2017). Isso ocorre invariavelmente devido as membranas espermáticas possuírem grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, ao mesmo tempo que o citoplasma possui pouca quantidade de enzimas capazes de debelar a ação do ROS (Jedrzejowska et al., 2012). A peroxidação lipídica favorece uma maior geração de ROS pelas mitocôndrias espermáticas, acelerando o início de um processo apoptótico intrínseco que inevitavelmente leva à morte celular (Moazamian et al., 2015).

Durante a criopreservação ocorrem vários fatores potencialmente indutores de ROS, gerando um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, ampliando a chance do desenvolvimento do estresse oxidativo, e seu impacto negativo pode ser amplificado por falta de mecanismos de defesa fisiológica, ausência de antioxidantes naturais e presença de múltiplas fontes potenciais de ROS (Watson, 2000; Lampiao, 2012; Masoudi et al., 2016). Nogueira et al. (2014) afirmaram que a principal causa de infertilidade nos machos das diversas espécies de mamíferos na atualidade, se deve à produção excessiva de ROS.

Em vista disso, torna-se necessário concentrações espermáticas de aproximadamente oito vezes mais espermatozoides congelados para obter taxas de gestação equivalentes as obtidas *in vivo*, sendo no mínimo 20×10^6 de espermatozoides viáveis por dose seminal para ser usada pós-descongelamento (Watson, 2000). Com essa diminuição na qualidade espermática quando comparada ao sêmen fresco, torna-se necessária a busca por substâncias capazes de fornecer proteção as células espermáticas, minimizando o dano induzido pelos radicais livres, sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA (Maia e Bicudo, 2009).

Devido a esses fatos começou-se a optar pelo uso de antioxidantes nos meios de criopreservação. Sikka (2004) definiu que antioxidantes são compostos que regulam, removem e suprimem a formação de ROS, ou contrariam suas ações, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação.

A ação dos antioxidantes nas células espermáticas é basicamente de dois modos, podem impedir a produção de ROS, ou interromper a reação em cadeia que intercorre com a peroxidação lipídica (Silva e Guerra, 2012). São classificados de acordo com a sua função antioxidante, sendo, enzimáticos, os que tem sua função desempenhada por enzimas, e os não enzimáticos (Andreyev, 2005).

Como antioxidantes usados nos meios de congelamento seminal, destacam-se as Vitaminas E e C, que são antioxidantes não enzimáticos. Essas vitaminas são substâncias de baixo peso molecular, que atuam como possíveis removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos, ou como reparadores da lesão já iniciada, tendo potencial para auxiliar na melhora da viabilidade seminal pós-descongelamento (Silva et al., 2017).

A Vitamina E, ou Tocoferol, é um poderoso antioxidante, lipossolúvel, presente na membrana interna das mitocôndrias, com a função de doar elétrons e H^+ , interrompendo a reação em cadeia durante a peroxidação lipídica, e por consequência, diminui a produção de malondialdeído, possibilitando atuar como quelante das ROS produzidas durante a lipoperoxidação e capaz de quebrar os elos covalentes das espécies reativas de oxigênio entre cadeias laterais de ácido graxo nos lipídeos de membrana (Sikka, 2004; Jeong et al., 2009; Silva et al., 2011). A vitamina E pode ser considerada uma das moléculas mais potentes conhecidas por inibir a produção de ROS e a lipoperoxidação (Banhenia et al., 2018).

Estudo realizado em equinos mostrou que a Vitamina E demonstrou ser eficaz como antioxidante ao fornecer proteção aos espermatozoides dos danos causados pelo estresse oxidativo no processo de criopreservação, diminuindo os níveis de lipoperoxidação (Franco et al., 2013). Corroborando com AminiPour et al. (2013), onde afirmam que a vitamina E teve efeitos benéficos em relação a motilidade progressiva e a viabilidade dos espermatozoides, tanto antes como depois da criopreservação.

Tvrđá et al. (2013) relataram um aumento na motilidade do sêmen de bovinos incubados entre zero e 24 horas com Vitamina E, além de sugerir a prevenção da perda de motilidade rápida, que normalmente ocorre durante a incubação dos espermatozoides, mantendo-a sob condições de estresse oxidativo, melhorando a percentagem de espermatozoides móveis e viáveis em condições *in vitro*.

Banhenia et al. (2016), ao suplementarem o meio de criopreservação de sêmen de ovinos com a Vitamina E isolada, detectaram um aumento significativo na motilidade progressiva, velocidade curvilínea, velocidade média da trajetória, amplitude de deslocamento lateral da cabeça e frequência de batimento flagelar cruzado, em amostras submetidas ao teste CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), quando comparados com

espermatozoides congelados sem a adição da Vitamina.

Chacur et al. (2017) forneceram via oral Vitamina E a cães da Raça Bulldog Francês, o que influenciou de forma benéfica na qualidade do sêmen, com aumento da concentração espermática no sêmen fresco, e redução dos defeitos do acrossoma no sêmen congelado. Yue et al. (2010) ao testarem diferentes concentrações de vitamina E (20, 200, 1000 e 2400 UI) na dieta de carneiros durante o período de 12 meses, ressaltaram que a dosagem de 200 UI melhorou a qualidade seminal, inclusive gerando um aumento das enzimas do sistema antioxidante (SOD e GPx).

A adição de vitamina E combinada com vitamina C ao meio de preservação de sêmen ovino conferiu maior sobrevivência das células pós-descongelamento e melhora nos parâmetros de qualidade dos espermatozoides (Azawi e Hussein, 2013).

Em pesquisas realizadas por Hadi (2016) com sêmen humano, o autor afirma que os meios crioprotetores devem conter 6 UI de Vitamina E por mL para melhorar a proteção e evitar o aumento da produção de radicais livres durante a criopreservação.

A suplementação de vitamina E em meio diluidor a base de gema de ovo melhorou a viabilidade espermática do sêmen de carneiros submetidos a criopreservação, favorecendo a integridade de acrossoma e do DNA e a produção de malondialdeído (MDA), que é o produto final da peroxidação lipídica, foi reduzida quando comparado ao grupo controle que não teve a adição do antioxidante (Kurmi et al., 2018).

Uma alternativa usada para facilitar a diluição em meios crioprotetores é o Trolox, por se tratar de um análogo da vitamina E solúvel em água com propriedades antioxidantes poderosas, reduzindo a produção de ROS, para prevenir surgimento do estresse oxidativo e apoptose (Nekoonam et al., 2016). Domínguez-Rebolledo et al. (2010) relataram que ao incubarem Trolox no sêmen coletado do epidídimo de veado vermelho, características como motilidade e integridade acrossomal dos espermatozoides foram melhoradas. O que condiz com o encontrado por Varu-Ghiuru et al. (2015), ao adicionarem o Trolox em combinação com Ácido Ascórbico ao diluente de sêmen de javalis, a motilidade, integridade acrossomal e do DNA pós-descongelamento foram significativamente melhoradas. Já Soares et al. (2015), ao incubarem 60nmol/mL de Trolox em meio diluidor a base de leite desnatado, relataram preservação ultraestrutural da membrana plasmática e bainha mitocondrial em espermatozoides de caprinos após criopreservação.

A Vitamina C, ou Ácido Ascórbico, é um antioxidante de notável atuação *in vivo*, sendo secretado pelas vesículas seminais, tornando-se o principal antioxidante presente no plasma seminal de machos férteis, uma vez que neutraliza as ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) por meio de

reações de redução, com concomitante inibição da peroxidação lipídica e prevenção da aglutinação de espermatozoides, podendo melhorar a função espermática devido a eliminação contínua de radicais livres (Lewis et al., 1995; Barreiros et al., 2006; Agarwal et al., 2008; Gangwar et al., 2015). Tem caráter hidrossolúvel e baixa toxicidade, mas é incapaz de debelar diretamente a peroxidação lipídica, agindo em associação com a Vitamina E, para executar tal função, reciclando-a e tornando novamente viável (Sierens et al., 2002; Silva et al., 2017).

Memon et al. (2012) demonstraram que o sêmen caprino criopreservado com a adição de Vitamina C apresenta melhora na viabilidade espermática, aumentando parâmetros de motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, morfologia e viabilidade dos espermatozoides, o que também foi observado por Asadpour et al. (2011) para o sêmen bovino. Gangwar et al. (2015) relataram que a Vitamina C na dose de 56,78 μ M pode ser usada como antioxidante no diluente de criopreservação de sêmen caprino, melhorando a qualidade espermática pós-descongelamento quando comparado ao sêmen sem adição de antioxidante.

Souza et al. (2017) ao testarem a adição da associação da Vitamina C e Vitamina E no sêmen de carneiros pré criopreservação, encontraram melhoria na qualidade espermática nas análises pós-descongelamento, conferindo proteção contra crioinjúrias e melhorando o potencial fecundante *in vitro*.

Zhao et al. (2015) ao criopreservarem sêmen de bovinos da raça Quinchuan com adição de Vitamina E e C associados ao meio diluidor, destacaram que o grupo tratado com 7 mg/mL de Vitamina C e 0,1 UI/mL de Vitamina E, apresentou melhoria na motilidade espermática, integridade de acrossoma, atividade de glutatona reduzida e superóxido dismutase. Guiaretta et al. (2015), evidenciaram o efeito benéfico da associação da Vitamina C e Glutathione, em sêmen de suíno, e relataram efeito positivo da associação da Glutathione e Vitamina C (5mM e 100mM, respectivamente) sobre a viabilidade e motilidade espermática, integridade acrossômica e estrutura nucleoproteína.

Sandeep et al. (2015), ao adicionarem Vitamina C ao diluente de sêmen de búfalos da raça Murrah, afirmaram que houve redução no estresse oxidativo durante a congelamento e descongelamento, fornecendo proteção aos espermatozoides, resultando na melhoria na qualidade e longevidade das células. Mittal et al. (2014) ao criopreservarem sêmen de búfalos da raça Bhadawari com a adição de Vitamina C e E no meio diluidor, concluíram que a interação das duas Vitaminas concedeu maior proteção aos espermatozoides a ação das ROS e do choque térmico, do que quando suplementadas sozinhas ao meio extensor.

Considerações Finais

A literatura apresenta vários estudos avaliando os efeitos da adição de agentes antioxidantes enzimáticos, e não enzimático ao sêmen, tanto na pré-congelação, quanto pós-descongelação, que levam a resultados variáveis e desconhecidos, necessitando de aprofundamento das pesquisas nessa área, considerando, sobretudo, a susceptibilidade entre ejaculados, indivíduos e as diferentes espécies, assim como período de incubação e concentração dos diferentes antioxidantes.

Referências

- AGARWAL, A., DURAIRAJANAYAGAM, D., DU PLESSIS, S.S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence-based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12:1, p.1-12, 2014.
- AGARWAL A., MAKKER K., SHAMA R. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility, *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 2–11, 2008.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction & Development*. 84:1039 –1052, 2017.
- AMIDI, F., PAZHOHAN, A., NASHTAEI, M. S., KHODARAHMIAN, M., NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*. v.17, p.745-756, 2016.
- AMINIPOUR, H., TAHMASBI A. M., NASERIAN, A. A. The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. *Eur J Zool Res* 2(5):94–99, 2013.
- ANDREYEV, A. Y., KUSHNAREVA, Y. E., STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 70:200-214, 2005.
- ARRUDA, R. P., SILVA, D. F., AFFONSO, F. J., LEMES, K. M., JAIMES, J. D., CELEGHINI, E. C. C., ALONSO, M. A., CARVALHO, H. F., OLIVEIRA, L. Z., NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- ASADPOUR, R., JAFARI, R., TAYEFI-NASRABADI, H. Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and Tris-based extenders. *Veterinary Research Forum*, 2(1), 37-44, 2011.
- AZAWI, O. I., HUSSEIN, E. K. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 C. *Veterinary Research Forum*, 4(3):157-160, 2013.
- BARREIROS, A., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, v.29, n.1, 2006.
- BENHENIA, K., LAMARA, A., IDRES, T., FATMI, S. IGUER-OUADA, M. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram sêmen. *Small Ruminant Research*, v. 141, p. 29–35, 2016.
- BENHENIA, K., RAHAB, H., SMADI, M. A., BENMAKHLOUF, H., LAMARA, A., IDRES, T., IGUER-OUADA, M. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal Reproduction Science*. v. 195, p. 266-273, 2018.
- BILODEAU, J. F.; CHATEERJEE, S.; SIRRARD, M. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev. Nova York*. v. 55, p. 282-288, 2000.
- CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. P., FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A., SANTOS, F. B., ALVES, M. B. R., OLIVEIRA, B. M. M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.
- CHACUR, M. G. M., SOUZA, M. G. R., SOUZA, C. D. S., CREMASCO, C. P. Efeito da administração via oral de selênio e vitamina E na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45: 1442, 2017.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á. E., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R., BISBAL, A., ROS-SANTAELLA, J. L., RAMÓN, M., CARMONA, M., MARTÍNEZ-PASTOR, F., GARDE, J.J. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil Dev*, 22: 856–870, 2013.
- FRANCO, J.S.V., CHAVEIRO, A., GÓIS, A., SILVA, F.M. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, p.1-7, 2013.
- FLESCHE, F.M; GADELLA, B.M. Dynamic of the mammalian sperm membrane in the processo fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, p 197-235, 2000.

- FREITAS, B. W. Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Tese (doutorado), 104f. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Viçosa – MG, fevereiro de 2015.
- GANGWAR, C. KHARCHE, S. D., RANJAN, R., KUMAR, S., GOEL, A. K., JINDAL, S. K., AGARWAL, S. K. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. *Small Ruminant Research*, v. 129, p. 104-107, 2015.
- GOMES, R. C., FEIJÓ, G. L. D., CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande. Março de 2017.
- GUIARETTA, E., ESTRADA, E., BUCCI, D., SPINACI, M., RODRIGUEZ, GIL, J., YESTE, M. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, v.83, p. 399-407, 1778, 2015.
- HADI, I. H. Effect of Vitamin E on Sperm Motility and Survival in Chilled-Stored Semen. *Iraqi Journal of Embryo and Infertility Researches*, v. 6 p.1-7, 2016.
- JEDRZEJOWSKA, R. W., WOLSKI, J. K., HILCZER, J. S. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, p. 60-67, 2012.
- JEONG, Y. J., KIM, M. K., SONG, H. J., KANG, E. J., OCK, S. A., KUMAR, B. M., BALASUBRAMANIAN, S., RHO, G. J. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58:181–189, 2009.
- KURMI, D. J., SINHA, M. P., KUMAR, R., HAZARIKA, S. B., DEWRY, R. K., GOHAIN, S. Effect of Vitamin E on the Quality of Frozen Ram Semen. *Theriogenology Insight*, 8(1): 39-43, 2018.
- LAMPIAO, F. Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them. *World Journal Obstetrics and Gynecology*. 1: 29-34, 2012.
- LEITE, P. A., SCHREDER, G. G., ALMEIDA, C. L. R., ZÚCCARI, C. E. S. N., SILVA, E. V. C. Criopreservação do Sêmen Bovino. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*.13(4):279-86, 2011.
- LEWIS S, BOYLE P, MCKINNEY K, YOUNG I, THOMPSON W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 64:868–870, 1995.
- MAIA, M.S., BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MASOUDI, R., SHARAFI, M., SHAHNEH, A. Z., TOWHIDI, A., ESMAEILI, V., SHAHVERDI, A., DAVACHI, N. D. Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology* 73: 69-72, 2016.
- MEMON, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., GOH, Y., EBRAHIMI, M., NADIA, F. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 1-6, 2012.
- MILAZZOTTO, P., VISINTIN, J. A., ASSUMPÇÃO, M. O. E. D. Biotecnologias da reprodução animal: biologia molecular aplicada à biotecnologia. *Ciências Veterinária nos trópicos*. v.11, p:145-148, 2008.
- MITTAL, P. K., ANAND, M., MADAN, A. K., YADAV, S., KUMAR, J. Antioxidative capacity of vitamin E, vitamin C and their combination in cryopreserved Bhadavari bull semen. *Veterinary World*, EISSN, p. 2231-0916, 2014.
- MOAZAMIAN, R., POLHEMUS, A., CONNAUGHTON, H., FRASER, B., WHITING, S., GHARAGOZLOO, P., AITKEN, R. J. Oxidative stress and human spermatozoa: Diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Molecular Human Reproduction*, 21, 502–515, 2015.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, v. 3, pag. 403–439, 1997.
- NEKOONAM, S., NASHTAEI, M. S., NAJI, M., ZANGI, B. M., AMIDI, F. Effect of Trolox on sperm quality in normozoospermia and oligozoospermia during cryopreservation. *Cryobiology*, (2):106-11, 2016.
- NOGUEIRA, B. G., BITENCOURT, J. L., SAMPAIO, B. F. B., BENDER, E. S. C., COSTA E SILVA, E. V., ZÚCCARI, C. E. S. N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. *Revista eletrônica de Veterinária*, vol 15, nº1, 2014.
- PEÑA, F.J; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ; MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen thawed boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.28, p. 107 – 114, 2005.

- PINTO, S. C. C. Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações funcionais e fecundação *in vitro*. Dissertação (mestrado), 84 f. Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias. São Luís – MA, 2015.
- RODRIGUES, M., TARRAGÓ, O. F., ARRUDA, R., OLIVEIRA, L., BERTOLLA, R., NICHI, M., BARNABE, V. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 52(2), 134-140, 2015.
- SANDEEP, P. S., VIRMANI, M., MALIK, R. K. Effect of vitamin c on the seminal and biochemical parameters of Murrah buffalo bull semen during different stages of freezing. *Haryana Vet.* 54 (1), 15-18, 2015.
- SAVI, P. A. P. Uso de antioxidantes no meio diluente Tris para refrigeração e congelamento de células espermáticas provenientes de epidídimo de cães submetidos à orquiectomia eletiva. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. 78f. São Paulo, 2012.
- SCHÖBER, D., AURICH, C., NOHL H., GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 68:745-754, 2007.
- SIERENS, J., HARTLEY, J., CAMPBELL, M., LEATHEM, A., WOODSIDE, J. In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog Carcinog Mutagen*, 22:227–234, 2002.
- SIKKA S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, 25(1), 5-18, 2004.
- SILVA, E. C. B., CAJUEIRO, J. F. P., SILVA, S. V., SOARES, P.C., GUERRA, M. M. P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77, 1722-1726, 2012.
- SILVA, E. C. B., GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, 2011.
- SILVA, E. C. B., GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Revista Portuguesa Ciência Veterinária*, 107:143-149, 2012.
- SILVA, L. F. M. C., ARAUJO, E. A. B., OLIVEIRA, S. N., DALANEZI, F. M., ANDRADE JUNIOR, L. R. P., SOUZA, F. F., CRESPILO, A. M. Mecanismos de ação dos principais antioxidantes utilizados na criopreservação espermática de garanhões. *Vet. e Zootec*, 24(3): 418-434, setembro de 2017.
- SILVA, N.C., LEÃO, K. M., MOUTINHO, E. P. M., SILVA, R. P., RODRIGUES, M. C., SILVA, M. A. P. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. *PUBVET*, Londrina, V. 5, N. 19, Ed. 166, Art. 1122, 2011.
- SOARES, A. T., SILVA, S. V., BATISTA, A. M., ALMEIDA, F. C., NUNES, J. F., PEIXOTO, C. A., GUERRA, M. M. P. Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation. *Andrologia*, v. 47, p. 470–476, 2015.
- SOUZA, W. L., MORAES, E. A., TONIOLLI, R. Addition of antioxidants in ram semen and the effects after thawing. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 37 n°5. Rio de Janeiro, maio de 2017.
- TVRDÁ, E., LUKÁČ, N., LUKÁČOVÁ, J., KŇAŽICKÁ, Z., MASSÁNYI, P. Stimulating and protective effects of vitamin e on bovine spermatozoa, *JMBFS*, 2 (1) 1386-1395, 2013.
- VARO-GHIURU, F., MICLEA, I., HETTIG, A., LADOȘI, I., MICLEA, V., EGERSZEGI, I., ZĂHAN, M. Lutein, Trolox, Ascorbic Acid and Combination of Trolox With Ascorbic Acid Can Improve Boar Semen Quality During Cryopreservation, *CryoLetters*, v36, p. 1-7, 2015.
- WANG, X., SHARMA, R.K., GUPTA, A., GEORGE, V., THOMAS J. A. J., ALCONTE, T., AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertility and Sterility*. v.80, 2, p.844-850, 2003.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61:481-92, 2000.
- 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.
- ZANGANEH, Z., ZHANDI, M., ZARE-SHAHNEH, A., NAJAFI, A., NABI, M. M., MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Rumin Research*, v. 114, p. 120-125, 2013.
- ZHAO, X. L., CAO, S., HU, J.H., WANG, W.H., HAO, R.J., GUI, L.S., ZAN, L.S. Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of freeze-thawed semen of Qinchuan bulls.

Genetic and Molecular Research, v. 1, p. 2572 –
2581, 2015.