

USO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DILUIDORES PARA SÊMEN OVINO: REVISÃO DE LITERATURA

USE OF ANTIOXIDANTS IN SEMEN EXTENDERS FOR SHEEP: LITERATURE REVIEW

**P. A. P. SAVI¹, L. B. ZAVAREZ¹, B. H. KIPPER¹, M. A. R. FELICIANO¹,
W. R. R. VICENTE¹, M. E. F. OLIVEIRA^{1*}**

RESUMO

O desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocasionam o estresse oxidativo, caracterizado por danos celulares prejudiciais na qualidade espermática. Os espermatozoides de ovinos possuem grande susceptibilidade ao estresse oxidativo e consequentemente à peroxidação lipídica, devido a maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e a presença de um citoplasma reduzido que mantém baixas as concentrações de enzimas antioxidantes. Dessa forma, torna-se importante adicionar substâncias antioxidantes aos meios diluidores do sêmen, que são subdivididas em dois grupos os enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os antioxidantes enzimáticos endógenos presentes no plasma seminal destacam-se a catalase (Cat), a glutathione peroxidase (GSH), o superóxido dismutase (SOD) e a cisteína. Já os não enzimáticos são: vitamina E (Tocoferol), vitamina C e resveratrol. A adição dos antioxidantes é vantajosa na criopreservação do sêmen ovino, entretanto em excesso se torna prejudicial, pois participam de importantes fases da aquisição do potencial fertilizante espermático, como a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e sua interação com o oócito. Sendo assim a presente revisão visou agrupar os principais antioxidantes, seus malefícios e benefícios na criopreservação do sêmen ovino.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes. Criopreservação. Espermatozoides. Ovinos. ROS.

SUMMARY

An imbalance between the antioxidant defense system and the production of reactive oxygen species (ROS) cause oxidative stress, characterized by cellular damage with detrimental effects on sperm quality. The sheep spermatozoa has high susceptibility to oxidative stress and consequently to lipid peroxidation due to higher amount of polyunsaturated fatty acids present in their plasma membrane and the presence of a reduced cytoplasm that maintain low concentrations of antioxidant enzymes. Therefore, it is important to add antioxidants in semen extenders. Some of the endogenous antioxidants present in seminal plasma are catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH) and superoxide dismutase (SOD). The non-enzymatic are: Vitamin E (Tocopherol), Vitamin C and resveratrol. The addition of antioxidants is beneficial in ram semen cryopreservation, however in excess are detrimental as they participate in important stages of the acquisition of sperm fertilizing potential, as training, hyperactivation, acrosome reaction and their interaction with the oocyte.

KEY-WORDS: Antioxidants. Cryopreservation. ROS. Sheep. Spermatozoa.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Campus de Jaboticabal – Email.: m_emiliafraoli@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são células metabolicamente variáveis em relação à utilização de oxigênio, podendo sobreviver em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos (CUMMINS et al., 1994). A utilização do metabolismo oxidativo pelas células espermáticas como principal fonte de energia gera grande quantidade de metabólitos ativos de oxigênio, ou seja, as espécies reativas de oxigênio (ROS) (SILVA, 2006). Esse termo é usado para identificar os intermediários reativos provenientes do metabolismo do oxigênio, sendo eles: o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA & BICUDO, 2009).

As ROS em quantidades fisiológicas atuam como moléculas sinalizadoras de importantes fases da aquisição do potencial espermático fertilizante, como a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão com o oócito (DE LAMIRANDE et al., 1997; DESAI et al., 2009). Porém, o excesso de produção dos radicais livres devido ao processo de criopreservação pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, tornando-o mais sensível ao estresse oxidativo (MAIA & BICUDO, 2009). Deste modo, a célula espermática apresentará prejuízos ao metabolismo celular e diminuição da motilidade e vigor (AITKEN et al., 2007). O ideal seria um equilíbrio entre a quantidade de ROS gerada e a quantidade removida pelo sistema antioxidante, enquanto que o desequilíbrio desta relação é denominado estresse oxidativo (SIKKA, 1996).

As substâncias protetoras do sêmen que atuam contra o efeito destrutivo das ROS são denominadas antioxidantes. Estes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e atuam tanto removendo as ROS quanto impedindo a formação das lesões ou ainda, reparando as injúrias causadas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; FOOTE et al., 2002).

A capacidade do estresse oxidativo de romper as membranas espermáticas foi primeiramente relatada em 1943 por MacLeod, quando se reconheceu o impacto negativo de altas concentrações de oxigênio na motilidade espermática (revisado por AITKEN et al., 1998). Isto se deve ao conteúdo do citoplasma destas células ser reduzido, limitando assim a quantidade disponível de enzimas antioxidantes (VERNET et al., 2004). Além disso, a abundância de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) nas membranas dos espermatozoides ovino, responsável pela fluidez e fusão de membranas no processo da fecundação (LENZI et al., 2000; AGARWAL et al., 2003), torna esses gametas mais vulneráveis. A natureza insaturada desses ácidos graxos poliinsaturados predispõe o espermatozoide à ação de radicais livres e à peroxidação lipídica na membrana plasmática (ZINI et al., 2009). Além disso, o próprio processo de criopreservação do sêmen também potencializa o estresse oxidativo (CURRY, 2000) e contribui na antecipação da capacitação e reação acrossomal (BRENER et al., 2003), sendo observado

como importante problema da conservação de sêmen ovino.

Atualmente, têm-se sugerido métodos alternativos para melhorar a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen de ovinos. Neste contexto, estudos utilizando antioxidantes nos meios diluidores tem sido de fundamental importância para evidenciar qual o melhor dentre eles e qual a melhor dose a ser adicionada ao sêmen no controle do estresse oxidativo. Deste modo, a presente revisão teve o objetivo de apresentar um panorama dos antioxidantes mais estudados, assim como, seus resultados de acordo com as doses empregadas no sêmen ovino.

ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ROS em água de modo a prevenir a proliferação destes radicais (AGARWAL et al., 2005) e atuam assim na proteção dos sistemas biológicos contra possíveis lesões causadas pelo estresse oxidativo (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). Na biotecnologia da reprodução, a utilização de antioxidantes adicionados ao meio diluidor do sêmen tem o intuito de minimizar os danos provocados durante a criopreservação (WHITE, 1993), contando com um sistema antioxidante constituído por dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos.

Dentre os antioxidantes endógenos enzimáticos presentes no plasma seminal destacam-se a catalase, a glutatona peroxidase, o superóxido dismutase e a cisteína (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1996). Estes, quando adicionados ao diluidor de sêmen ovino mostraram-se eficientes na sobrevivência e integridade do acrossoma dos espermatozoides desta espécie (MAXWELL & STOJANOV, 1996). Já entre os antioxidantes não enzimáticos estão: vitamina E (Tocoferol), vitamina C e resveratrol. Todos tem sido relacionados também a incremento de qualidade espermática pós-descongelamento de sêmen ovino (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

A catalase é uma hemiproteína citoplasmática e tem apresentado resultados controversos em relação a sua atuação na prevenção da peroxidação lipídica e aumento da viabilidade espermática após descongelamento em ovinos. A adição de 500UI/L de catalase no meio diluente INRA-96 diminuiu a formação de radicais livres quando comparado ao grupo controle após a refrigeração à 5°C por três dias de sêmen desta espécie. A redução do estresse oxidativo teve implicação favorável a integridade acrossomal, a qual foi preservada (LA FALCI, et al., 2011). Corroborando com os resultados anteriores, Maia e colaboradores (2010) observaram que a adição de 50µg/mL de catalase no meio diluente Tris-gema diminuiu a produção de radicais livres, comparado ao grupo controle que não recebeu adição de antioxidante. A suplementação da mesma concentração do antioxidante resultou em maior motilidade progressiva e viabilidade espermática, mas não melhorou a atividade mitocondrial e motilidade total em relação ao grupo sem aditivo (MAIA et al., 2009). Em contrapartida, Camara e colaboradores (2011) não

observaram diferenças significativas quanto a capacidade antioxidante do sêmen acrescido ou não de 5, 10 ou 20 U/mL de catalase ao meio diluidor Tris-gema. Tampouco os autores registraram benefícios da adição do antioxidante em relação a lesão acrossomal ou integridade de membrana pós-descongelamento. Segundo Graaf et al. (2007), a suplementação de 100U/mL de catalase em meio diluidor de sêmen ovino também não resultou em benefícios sobre a motilidade e qualidade espermática pós-descongelamento.

A superóxido dismutase (SOD) também tem sido adicionada ao sêmen ovino com a função de prevenir a peroxidação lipídica dos espermatozoides. Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), a enzima mais abundante do organismo é a SOD, que apresenta a função de catalisar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e H_2O_2 . Nos mamíferos a SOD está presente no citoplasma, na forma cobre-zinco dependente (CuZnSOD) e na matriz mitocondrial, como manganês dependente (MnSOD) (GUERRA et al., 2012). Silva et al. (2011) verificaram que a adição de SOD nas concentrações de 60 e 120U/mL foi eficaz na supressão da produção de H_2O_2 , assim como a concentração de 100U/mL também preservou o acrossoma de espermatozoides congelados de ovinos. Em contrapartida, Camara et al. (2011) não observaram redução da produção de radicais livres após a suplementação do meio diluídos com a SOD nas concentrações 5, 10 e 20U/mL, quando comparado ao grupo controle que não recebeu adição de antioxidante.

Outro antioxidante importante enzimático é a glutatona peroxidase, esta tem papel importante na proteção sinérgica de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos contra danos oxidativos, atuando como uma tríade catalítica com a catalase e superóxido dismutase, encontrado em praticamente todos os organismos aeróbios procariotas e eucarióticas (DREVET, 2006). De acordo com La Falci et al. (2011), a adição de 20UI/mL de glutatona ao meio diluidor teve efeito expressivo na criopreservação de células espermáticas ovinas. Maior taxa de motilidade e integridade de membrana pelo teste hiposmótico foi observado em sêmen congelado com diluidor acrescido de 5mM/mL em comparação ao suplementado com 2,5 mM/mL (BUCAK et al., 2009). Valores inferiores do mesmo antioxidante (0,5, 1 ou 2mM/mL) não possuíram efeito significativo na atividade antioxidante durante a criopreservação das células espermáticas de ovinos quando comparado ao grupo controle, que não recebeu adição de antioxidante (CAMARA et al., 2011).

Em paralelo, outro antioxidante enzimático que vem sendo estudado recentemente é a cisteína. Esta possui capacidade de penetração celular e atua diretamente como agente antioxidante ou na participação da biossíntese da glutatona reduzida, a qual age como co-fator para a glutatona peroxidase na proteção da célula contra o estresse oxidativo (MENEZES et al.; 2008). Çoyan e colaboradores (2011) observaram que a adição de 1mM/mL deste antioxidante proporcionou maior efeito protetor em relação a integridade de membrana e possibilitou aumento da atividade mitocondrial dos espermatozoides ovinos pós-descongelamento quando comparado ao grupo controle,

que não teve acréscimo de nenhum antioxidante. O aumento da atividade mitocondrial também foi observado na concentração de 2mM/mL de cisteína, no entanto, não se constatou efeito significativo sobre a motilidade espermática após a criopreservação. Similarmente, Menezes et al. (2008) não verificaram efeito considerável na motilidade espermática após refrigeração por 48 horas quando comparado o grupo controle, que não recebeu adição de antioxidantes, aos suplementados com 0,5mM, 1mM, 5mM e 10mM de cisteína.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos pode ser observado na literatura estudos com a adição de vitamina E (SARLOS et al., 2002; MAIA et al., 2010), vitamina C (SÖNMEZ & DEMIREI, 2004; MATA-CAMPUZANO et al., 2012) e compostos fenólicos (STOJANOVIC et al., 2001; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004) em sêmen ovino.

A vitamina E (VIT E) ou tocoferol é um composto lipossolúvel natural da membrana celular (SIKKA, 1996; MANEESH et al., 2006) e protege as células das ROS. Acredita-se que a VIT E é o inibidor primário dos radicais livres encontrados nas membranas celulares e no plasma seminal de mamíferos (SIKKA, 2004). No entanto, os efeitos da vitamina E podem variar em função da concentração utilizada. Sabe-se que de acordo com a quantidade de radicais livres a serem inativados, esta poderá ter ação antioxidante ou de estimular a oxidação (CAO & CUTLER, 1997). O efeito deste antioxidante no sêmen ovino tem sido estudado por diferentes grupos de pesquisa. A adição do análogo da vitamina E (Trolox), nas concentrações 60 e 120µM/mL, protegeu as células espermáticas após o período de congelamento/descongelamento, sendo observado menores danos à membrana plasmática e maior motilidade quando comparado ao grupo controle, quando não houve adição de Trolox (SILVA, et al., 2013). MAIA et al. (2010) observaram também melhor preservação das células espermáticas de ovinos, quando em meio diluidor Tris-gema acrescido de 50µM/mL de Trolox em relação ao meio sem aditivos, após o processo de descongelamento. Corroborando com os estudos retromencionados, outras pesquisas em que as células espermáticas foram submetidas a refrigeração à 5°C por 48 horas, verificaram maior percentual de motilidade e integridade da membrana espermática quando em meio suplementado com 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/mL Trolox em relação ao grupo controle (sem adição de antioxidante) (SARLOS et al., 2002).

O ácido ascórbico ou vitamina C (VIT C) está presente no plasma seminal e é encontrado no organismo na forma de ascorbato. Este é uma vitamina hidrossolúvel, que tem sido considerado o antioxidante mais importante do fluido extracelular (ALVAREZ et al., 2006; HOSSEIN et al., 2007). A VIT C é útil na neutralização das ROS por meio de reações de redução e previne a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, inibindo assim o estresse oxidativo (ANNAE & CREPPY, 2001; BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007; GUERRA et al., 2012). Apesar dos potenciais benefícios, estudos ainda são necessários para escolha da dose ideal de VIT C a ser adicionada em meio diluidor de sêmen ovino. A

criopreservação de sêmen desta espécie em meio Tris-glucose acrescido de 0,5, 1 e 2 mg/mL de ácido ascórbico não preservou as características seminais, enquanto que a adição de 5 e 10 mg/mL reduziu a motilidade espermática (SÖNMEZ & DEMIRCI, 2004). Quando adicionada após a descongelação do sêmen e incubado à 37°C por 2 e 4 horas, o ácido ascórbico na concentração de 0,1 mM/mL em meio TALP-Hepes preservou a motilidade, viabilidade e atividade mitocondrial, enquanto na concentração de 1 mM/mL resultou em redução destes parâmetros espermáticos. Os efeitos podem ser justificados por ter sido observado decréscimo das ROS na concentração menor enquanto a maior o mesmo não aconteceu. (MATA-CAMPUZANO et al., 2012).

Um grupo novo de antioxidantes não enzimático que vem sendo estudado são os compostos fenólicos, os quais podem ser divididos em duas classes os flavonoides e não flavonoides (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). A quercetina é um polifenol flavonóide que possui uma estrutura considerada ideal para redução do estresse oxidativo; isto porque apresenta vários grupos de hidroxilas e assim, é considerado mais potente que as vitaminas E e C (STOJANOVIC et al., 2001; BARREIROS et al., 2006). Este antioxidante possui ainda, capacidade de inibir danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ no DNA (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Em equinos foi observado significativas melhorias de motilidade, capacidade de ligação dos espermatozoides na zona pelúcida e ainda redução da fragmentação de DNA em sêmen sexado criopreservado em meio diluidor enriquecido com quercitina (GIBB et al., 2013). O resultado é bastante satisfatório visto que as células submetidas as duas técnicas (criopreservação e sexagem) sofrem potencialmente muitos danos, em especial, fragmentação de DNA. Em ovinos os estudos ainda são incipientes, entretanto, foi observado que a suplementação com 5, 10, 15 ou 20 µg/mL desta substância em meio diluidor Tris Gema Glicerol reduz o potencial mitocondrial das células espermáticas pós-congelação/descongelação (SILVA et al., 2012). Apesar das propriedades positivas deste antioxidante, maiores estudos na espécie ovina são necessários.

Já no grupo dos fenólicos não flavonoides pode-se destacar o resveratrol como importante antioxidante, encontrado em duas formas, cis e trans (STOJANOVIC et al., 2001; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). A forma trans é a mais estável enquanto a cis é instável a ação da luz (TRELA & WATERHOUSE, 1996; GUERRA et al., 2012). Segundo Sarlós et al. (2002), este antioxidante tem ação importante na conservação do sêmen ovino em virtude da alta capacidade de inibir a lipoperoxidação frente aos demais antioxidantes. Os autores mencionados observaram menor quantidade de lesão acrossomal em sêmen ovino diluído com meio Tris adicionado de 15µg/mL de resveratrol, após nove dias de refrigeração em relação ao sêmen em que não se suplementou com o antioxidante. Em contrapartida, outro estudo apresentou que a adição de 5 a 20µg/mL de resveratrol não preservou a motilidade progressiva e vigor dos espermatozoides ovinos criopreservados, além de

diminuir o potencial mitocondrial dessas células (SILVA et al., 2012).

Por fim, vale reforçar que diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de identificar o antioxidante (em isolado) e sua dose ideal para uso na criopreservação de sêmen ovino. No entanto, há trabalhos que avaliam a associação de antioxidantes, obtendo-se efeitos positivos. A associação de resveratrol (15µg/mL) e vitamina E (5mg/mL) prolongou o período de conservação do sêmen ovino, reduzindo o grau de danos celulares e preservando a motilidade espermática (SARLÓS et al., 2002). O uso associado de Trolox (50 µM/mL) e catalase (50µg/mL) diminuiu a produção de ROS quando comparado ao grupo controle ou aos grupos que receberam a adição isolada dos antioxidantes (MAIA et al., 2010). Existem ainda outros estudos publicados com a utilização conjunta de diferentes antioxidantes, entretanto, sabe-se que ainda não se tem a definição de qual antioxidante isolado, ou em associação, e sua concentração é ideal para criopreservação de sêmen ovino. À vista disso, há maiores possibilidades e pleito de futuras pesquisas visando aprimorar a criopreservação do sêmen ovino pelo uso de substâncias antioxidantes.

CONCLUSÃO

Ambos antioxidantes, enzimáticos ou não, possuem a função de diminuir a ação das ROS na membrana plasmática, auxiliando assim na criopreservação das células espermáticas. Os estudos tem demonstrado a eficácia do emprego de antioxidantes em sêmen ovino, assim como, seus efeitos deletério. A justificativa parece estar relacionada a dose adicionada ao meio diluidor, que em excesso é prejudicial e pode comprometer etapas fisiológicas importantes como a capacitação espermática. Contudo, ainda são necessários mais estudos para definir o antioxidante de escolha ou a associação que confere melhores resultados, da mesma forma que a concentração ideal visando a evolução e incremento da criopreservação de sêmen ovino.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility Sterility**, v.79, p.829-843, 2003.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID T. M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v.26, n.6, p.654-660, 2005.
- AITKEN, G. R.; HENDERSON, J. R.; CHANG, S. C.; MCNEIL, C. J.; BIRCH-MACHIN, M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.32, n.6, p.722-727, 2007.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1046, 1998.

- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; CARDOZO, R. M.; MARCELA MATAVELI, M.; KIOSHIMA R. S. Efeito as suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfologia espermática do sêmen de coelho. **Acta Science Animal Science**, v.28, p.165-175, 2006.
- ANNAE, R.; CREPPY, E. E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamin E and C. **Human Experimental Toxicology**, v.20, p.477-481, 2001.
- 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.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p.123-130, 1999.
- BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, p.837-845, 2003.
- BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIOZKAN, S.; ULUTAS, P. A. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v.81, p.13-17, 2009.
- CAMARA, D. R.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v.15, n. 76, p.342-350, 2011.
- CAO, G.; CUTLER, R. G. High concentration of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.17, p.189-201, 1997.
- ÇOYAN, K.; BASPMAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. **Cryobiology**, v.63, p.1-6, 2011.
- CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular Reproduction Development**, v.37, p.345-362, 1994.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Society for Reproduction and Fertility**, v.2, p.48-54, 1997.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v.5, n.1, 2004.
- DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K.; SABANEKH, E. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertility and Sterility**, v.92, p.1626-1631, 2009.
- DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.250, p.70-79, 2006.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, Sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.
- FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.
- GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Quercetin improves the post thaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, p.1001- 1009, 2013.
- GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M. C.; O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.217-227, 2007.
- GUERRA, M. M. P.; CÂMARA, D. R.; SILVA, E. C. B. da; SILVA, S. V. USO DE Antioxidantes no sêmen ovino (Use of antioxidants on ram semen). **Ciência Animal**, v.22, n.1, p. 354-364, 2012.
- HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Pathology and Biology**, v.44, n.1, p.6-13, 1996.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715S-725S, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 936p., 1999.
- HOSSEIN, M. S.; HASHEM, M. A.; JCONG, Y. M.; LEE, M. S.; KIM, S.; KIM, J. H.; KOO, O. J.; PARK, S. M.; LEE, E. G.; PARK, S. W.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Temporal effects of tocopherol and ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.107-117, 2007.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.

- LA FALCI, V. S.; YRIO-KOSKINEN, A. E.; FAZELI, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.180-187, 2011.
- LEHMANN, C.; WEBER, M.; KRAUSCH, D.; WAUER, H.; NEWIE, T.; ROHR, U.; HENSEL, M.; GLATZEL, E.; PRIEM, F.; GRUNE, T.; KOX, W. J. Parenteral selenium supplementation in critically ill patients--effects on antioxidant metabolism. **Z Ernährungswiss**, v.37, p.106-109, 1998.
- LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.
- LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. Role of Antioxidants Agents in Germ Cells and Embryos Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956, 2011.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGÓ, I. C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.122, n.1-2, p. 118-123, 2010.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p. 85-90, 2009.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MANEESH, M.; JAYALAKSHMI, H.; SINGH, T. A.; CHAKRABARTI, A. Impaired hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.21, n.1, p.165-168, 2006.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, p. 23-28, 1981.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P.; GARDE, J. J.; MARTINEZ-PASTOR, F. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37°C up to four hours. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, n.6, p.907-914, 2012.
- MAXWELL, W. M. C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1013-1020, 1996.
- MENEZES, E. S. B.; CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SOUZA, D. F. R.; NETO, E. T. A.; SILVA JUNIOR, J. B.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Uso da n-acetilcisteína na conservação de sêmen ovino a 4°C: Resultados preliminares. **Anais CONBRAVET (Congresso Brasileiro de Veterinária)**, 2008.
- ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associada a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.
- SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; GABOR, G. Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78-86, 1996.
- SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.
- SILVA, E. C.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1722-1726, 2012.
- SILVA, P. F. N. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. **Doctoral Thesis**, Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Utrecht, 177f, 2006.
- SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.137, n.1-2, p.37-44, 2013.
- SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.874-981, 2011.
- SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.28, p.893-899, 2004.

STOJANOVIC, M. N.; DE PRADA, P.; LANDRY, D. W. Catalytic molecular beacons. **Chembiochem**, v.2, n.6, p.411-415, 2001.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular Cell Endocrinology**, v.216, p.31-39, 2004.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v.5, n.6, p.639-58, 1993.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v.134, n.3, p.488-492, 2004.

ZINI, A.; GABRIEL, M. S.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.427-432, 2009.