

1 **USO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DILUIDORES PARA SÊMEN OVINO:**

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

3 *(USE OF ANTIOXIDANTS IN SEMEN EXTENDERS FOR SHEEP: LITERATURE REVIEW)*

4  
5  
6 **RESUMO**

7 O desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de espécies reativas  
8 de oxigênio (ROS) ocasionam o estresse oxidativo, o qual é responsável por danos celulares  
9 irreversíveis e prejudiciais à qualidade espermática. Este cenário é comum a sêmen submetidos a  
10 criopreservação em virtude do severo decréscimo de temperatura. Adicionalmente, os  
11 espermatozoides de ovinos possuem grande susceptibilidade ao estresse oxidativo e  
12 conseqüentemente à peroxidação lipídica, devido a maior quantidade de ácidos graxos  
13 poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e a presença de um citoplasma reduzido  
14 que mantém baixas as concentrações de enzimas antioxidantes. Por estas razões, torna-se  
15 importante a adição de agentes antioxidantes aos meios diluidores de sêmen ovino; fato que tem  
16 motivado inúmeras pesquisas no intuito de preservar a qualidade de células espermáticas  
17 submetidas a criopreservação. Entre as substâncias antioxidantes amplamente estudadas nesta  
18 espécie destaca-se a catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e cisteína  
19 (classificadas como enzimáticas) bem como, vitamina E - tocoferol, vitamina C e resveratrol  
20 (não-enzimáticas). Tem-se demonstrado que a adição de antioxidantes é vantajosa na  
21 criopreservação do sêmen ovino, entretanto em excesso torna-se prejudicial, pois as ROS  
22 participam de importantes fases da aquisição do potencial fertilizante espermático (por exemplo,  
23 a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e sua interação com o oócito). A presente  
24 revisão visa apresentar um panorama dos antioxidantes mais estudados, assim como, seus  
25 resultados de acordo com as doses empregadas no sêmen ovino.

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

30 **SUMMARY**

31 The imbalance between the antioxidant defense system and the production of reactive oxygen  
32 species (ROS) cause oxidative stress, which is responsible for irreversible cellular damage and  
33 detrimental effects on sperm quality. This scenario is common to undergo semen  
34 cryopreservation because of a severe decrease in temperature. Sperm especially of ovine has high  
35 susceptibility to oxidative stress and consequently to lipid peroxidation due to higher amount of  
36 polyunsaturated fatty acids present in their plasma membrane and the presence of a reduced  
37 cytoplasm that maintain low concentrations of antioxidant enzymes. For these reasons, it is  
38 important to add antioxidants in ovine semen extenders. This fact has motivated numerous  
39 studies in order to preserve the quality of sperm cells undergoing cryopreservation. Among the  
40 antioxidants widely studied in this species stands out as catalase, glutathione peroxidase,  
41 superoxide dismutase and cysteine (classified as enzyme) as well as vitamin E - tocopherol,  
42 vitamin C and resveratrol (non-enzymatic). It has been shown that the addition of antioxidants is  
43 beneficial in ram semen cryopreservation, however excess becomes harmful because ROS  
44 participate in important stages of the acquisition of sperm fertilizing potential (eg, training,  
45 hyperactivation, acrosome reaction and their interaction with the oocyte). The present review  
46 aims to provide an overview of the most studied antioxidants, as well as their results according to  
47 the doses used in ram semen cryopreserved.

48

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

50

51 **INTRODUÇÃO**

52 Os espermatozoides utilizam como principal fonte de energia o metabolismo oxidativo, o  
53 qual gera grande quantidade de metabólitos ativos de oxigênio, ou seja, espécies reativas de  
54 oxigênio (ROS) (SILVA, 2006), sendo eles: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ )  
55 e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA & BICUDO, 2009).

56 As ROS em quantidades fisiológicas atuam como moléculas sinalizadoras de importantes  
57 fases da aquisição do potencial espermático fertilizante: capacitação, hiperativação, reação

58 acrossomal e fusão com o oócito (DESAI et al., 2009). Porém, o excesso de produção de ROS  
59 devido ao processo de criopreservação pode subjugar o sistema intracelular de defesa  
60 antioxidante do espermatozoide, tornando-o mais sensível ao estresse oxidativo (MAIA &  
61 BICUDO, 2009), ocasionando assim efeitos deletérios ao metabolismo celular e diminuição da  
62 motilidade e vigor (AITKEN et al., 2007). O ideal seria o equilíbrio entre a quantidade de ROS  
63 gerada e a removida pelo sistema antioxidante (SIKKA, 1996).

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

77 Atualmente, têm-se sugerido métodos alternativos para preservar a qualidade de células  
78 espermática submetidas a criopreservação em ovinos, como pela utilização de antioxidantes nos  
79 meios diluidores. Estas substâncias atuam tanto removendo as ROS quanto impedindo a  
80 formação de lesões ou ainda, reparando as injúrias por elas causadas (HALLIWELL &

81 GUTTERIDGE, 1999, FOOTE et al., 2002). Neste contexto, tem fundamental importância  
82 estudos focados em evidenciar a melhor substância e sua dose ideal a ser adicionada ao sêmen no  
83 controle do estresse oxidativo. Deste modo, a presente revisão teve o objetivo de apresentar um  
84 panorama dos antioxidantes mais estudados, assim como, seus resultados de acordo com as doses  
85 empregadas no sêmen ovino.

86

87

## ANTIOXIDANTES

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

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

103 A catalase é uma hemiproteína citoplasmática e tem apresentado resultados controversos  
104 em relação a sua atuação na prevenção da peroxidação lipídica e aumento da viabilidade  
105 espermática após descongelamento em ovinos. A adição de 500UI/L de catalase no meio diluente  
106 INRA-96 diminuiu a formação de radicais livres quando comparado ao grupo controle após a  
107 refrigeração à 5°C por três dias de sêmen desta espécie. A redução do estresse oxidativo teve  
108 implicação favorável a integridade acrossomal, a qual foi preservada (LA FALCI, et al., 2011).  
109 Corroborando com os resultados anteriores, Maia e colaboradores (2010) observaram que a  
110 adição de 50µg/mL de catalase no meio diluente Tris-gema diminuiu a produção de radicais  
111 livres, comparado ao grupo controle que não recebeu adição de antioxidante. A suplementação  
112 da mesma concentração do antioxidante resultou em maior motilidade progressiva e viabilidade  
113 espermática, mas não melhorou a atividade mitocondrial e motilidade total em relação ao grupo  
114 sem aditivo (MAIA et al., 2009). Em contrapartida, Camara e colaboradores (2011) não  
115 observaram diferenças significativas quanto a capacidade antioxidante do sêmen acrescido ou  
116 não de 5, 10 ou 20 U/mL de catalase ao meio diluidor Tris-gema. Tampouco os autores  
117 registraram benefícios da adição do antioxidante em relação a lesão acrossomal ou integridade de  
118 membrana pós-descongelamento. Segundo Graaf et al. (2007), a suplementação de 100U/mL de  
119 catalase em meio diluidor de sêmen ovino também não resultou em benefícios sobre a motilidade  
120 e qualidade espermática pós-descongelamento.

121 A superóxido dismutase (SOD) também tem sido adicionada ao sêmen ovino com a  
122 função de prevenir a peroxidação lipídica dos espermatozoides. Segundo Halliwell e Gutteridge  
123 (1999), a enzima mais abundante do organismo é a SOD, que apresenta a função de catalisar a  
124 dismutação do ânion superóxido em oxigênio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos mamíferos a SOD está presente no  
125 citoplasma, na forma cobre-zinco dependente (CuZnSOD) e na matriz mitocondrial, como

126 manganês dependente (MnSOD) (GUERRA et al., 2012). Silva et al. (2011) verificaram que a  
127 adição de SOD nas concentrações de 60 e 120U/mL foi eficaz na supressão da produção de  
128 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim como a concentração de 100U/mL também preservou o acrossoma de  
129 espermatozoides congelados de ovinos. Em contrapartida, Camara et al. (2011) não observaram  
130 redução da produção de radicais livres após a suplementação do meio diluídos com a SOD nas  
131 concentrações 5, 10 e 20U/mL, quando comparado ao grupo controle que não recebeu adição de  
132 antioxidante.

133 Outro antioxidante importante enzimático é a glutathione peroxidase, esta tem papel  
134 importante na proteção sinérgica de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos contra danos  
135 oxidativos, atuando como uma tríade catalítica com a catalase e superóxido dismutase,  
136 encontrado em praticamente todos os organismos aeróbios procariotas e eucarióticas (DREVET,  
137 2006). De acordo com La Falci et al. (2011), a adição de 20UI/mL de glutathione ao meio diluidor  
138 teve efeito expressivo na criopreservação de células espermáticas ovinas. Maior taxa de  
139 motilidade e integridade de membrana pelo teste hiposmótico foi observado em sêmen congelado  
140 com diluidor acrescido de 5mM/mL em comparação ao suplementado com 2,5 mM/mL  
141 (BUCAK et al., 2009). Valores inferiores do mesmo antioxidante (0,5, 1 ou 2mM/mL) não  
142 possuíram efeito significativo na atividade antioxidante durante a criopreservação das células  
143 espermáticas de ovinos quando comparado ao grupo controle, que não recebeu adição de  
144 antioxidante (CAMARA et al., 2011).

145 Em paralelo, outro antioxidante enzimático que vem sendo estudado recentemente é a  
146 cisteína. Esta possui capacidade de penetração celular e atua diretamente como agente  
147 antioxidante ou na participação da biossíntese da glutathione reduzida, a qual age como cofator  
148 para a glutathione peroxidase na proteção da célula contra o estresse oxidativo (MENEZES et al.;

149 2008). Çoyan e colaboradores (2011) observaram que a adição de 1mM/mL deste antioxidante  
150 proporcionou maior efeito protetor em relação a integridade de membrana e possibilitou aumento  
151 da atividade mitocondrial dos espermatozoides ovinos pós-descongelção quando comparado ao  
152 grupo controle, que não teve acréscimo de nenhum antioxidante. O aumento da atividade  
153 mitocondrial também foi observado na concentração de 2mM/mL de cisteína, no entanto, não se  
154 constatou efeito significativo sobre a motilidade espermática após a criopreservação.  
155 Similarmente, Menezes et al. (2008) não verificaram efeito considerável na motilidade  
156 espermática após refrigeração por 48 horas quando comparado o grupo controle, que não recebeu  
157 adição de antioxidantes, aos suplementados com 0,5mM, 1mM, 5mM e 10mM de cisteína.

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

162 A vitamina E (VIT E) ou tocoferol é um composto lipossolúvel natural da membrana  
163 celular (SIKKA, 1996; MANEESH et al., 2006) e protege as células das ROS. Acredita-se que a  
164 VIT E é o inibidor primário dos radicais livres encontrados nas membranas celulares e no plasma  
165 seminal de mamíferos (SIKKA, 2004). No entanto, os efeitos da vitamina E podem variar em  
166 função da concentração utilizada. Sabe-se que de acordo com a quantidade de radicais livres a  
167 serem inativados, esta poderá ter ação antioxidante ou de estimular a oxidação (CAO &  
168 CUTLER, 1997). O efeito deste antioxidante no sêmen ovino tem sido estudado por diferentes  
169 grupos de pesquisa. A adição do análogo da vitamina E (Trolox), nas concentrações 60 e  
170 120µM/mL, protegeu as células espermáticas após o período de congelação/descongelção,  
171 sendo observado menores danos à membrana plasmática e maior motilidade quando comparado

172 ao grupo controle, quando não houve adição de Trolox (SILVA, et al., 2013). MAIA et al. (2010)  
173 observaram também melhor preservação das células espermáticas de ovinos, quando em meio  
174 diluidor Tris-gema acrescido de 50µM/mL de Trolox em relação ao meio sem aditivos, após o  
175 processo de descongelação Corroborando com os estudos retromencionados, outras pesquisas em  
176 que as células espermáticas foram submetidas a refrigeração à 5°C por 48 horas, verificaram  
177 maior percentual de motilidade e integridade da membrana espermática quando em meio  
178 suplementado com 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/mL Trolox em relação ao grupo controle (sem adição de  
179 antioxidante) (SARLÓS et al., 2002).

180 O ácido ascórbico ou vitamina C (VIT C) está presente no plasma seminal e é encontrado  
181 no organismo na forma de ascorbato. Este é uma vitamina hidrossolúvel, que tem sido  
182 considerado o antioxidante mais importante do fluido extracelular (ALVAREZ et al., 2006;  
183 HOSSEIN et al., 2007). A VIT C é útil na neutralização das ROS por meio de reações de  
184 redução e previne a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas,  
185 inibindo assim o estresse oxidativo (ANNAE & CREPPY, 2001; BARREIROS et al., 2006;  
186 VASCONCELOS et al., 2007; GUERRA et al., 2012). Apesar dos potenciais benefícios, estudos  
187 ainda são necessários para escolha da dose ideal de VIT C a ser adicionada em meio diluidor de  
188 sêmen ovino. A criopreservação de sêmen desta espécie em meio Tris-glucose acrescido de 0,5,  
189 1 e 2 mg/mL de ácido ascórbico não preservou as características seminais, enquanto que a adição  
190 de 5 e 10 mg/mL reduziu a motilidade espermática (SÖNMEZ & DEMIRCI, 2004). Quando  
191 adicionada após a descongelação do sêmen e incubado à 37°C por 2 e 4 horas, o ácido ascórbico  
192 na concentração de 0,1 mM/mL em meio TALP-Hepes preservou a motilidade, viabilidade e  
193 atividade mitocontrial, enquanto na concentração de 1 mM/mL resultou em redução destes  
194 parâmetros espermáticos. Os efeitos podem ser justificados por ter sido observado decréscimo



195 das ROS na concentração menor enquanto a maior o mesmo não aconteceu.(MATA-  
196 CAMPUZANO et al.; 2012).

197 Um grupo novo de antioxidantes não enzimático que vem sendo estudado são os  
198 compostos fenólicos, os quais podem ser divididos em duas classes os flavonoides e não  
199 flavonoides (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). A quercetina é um polifenol  
200 flavonóide que possui uma estrutura considerada ideal para redução do estresse oxidativo; isto  
201 porque apresenta vários grupos de hidroxilas e assim, é considerado mais potente que as  
202 vitaminas E e C (STOJANOVIC et al., 2001, BARREIROS et al., 2006). Este antioxidante  
203 possui ainda, capacidade de inibir danos oxidativos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no DNA (BIANCHI &  
204 ANTUNES, 1999). Apesar do efeito antioxidante positivo da quercetina, foi demonstrada a  
205 redução do potencial mitocondrial das células espermáticas de ovinos pós  
206 congelação/descongelação em meio diluidor Tris acrescido de 5 a 20µg/mL desta substância  
207 (SILVA et al., 2012).

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

218 vigor dos espermatozoides ovinos criopreservados, além de diminuir o potencial mitocondrial  
219 dessas células (SILVA et al., 2012).

220 Por fim, vale reforçar que diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de  
221 identificar o antioxidante (em isolado) e sua dose ideal para uso na criopreservação de sêmen  
222 ovino. No entanto, há trabalhos que avaliam a associação de antioxidantes, obtendo-se efeitos  
223 positivos. A associação de resveratrol (15µg/mL) e vitamina E (5mg/mL) prolongou o período  
224 de conservação do sêmen ovino, reduzindo o grau de danos celulares e preservando a motilidade  
225 espermática (SARLÓS et al., 2002). O uso associado de Trolox (50 µM/mL) e catalase  
226 (50µg/mL) diminuiu a produção de ROS quando comparado ao grupo controle ou aos grupos  
227 que receberam a adição isolada dos antioxidantes (MAIA et al., 2010). Existem ainda outros  
228 estudos publicados com a utilização conjunta de diferentes antioxidantes, entretanto, sabe-se que  
229 ainda não se tem a definição de qual antioxidante isolado, ou em associação, e sua concentração  
230 é ideal para criopreservação de sêmen ovino. À vista disso, há maiores possibilidades e pleito de  
231 futuras pesquisas visando aprimorar a criopreservação do sêmen ovino pelo uso de substâncias  
232 antioxidantes.

233

234

## CONCLUSÕES

235 Os antioxidantes, enzimáticos ou não, possuem a função de diminuir as concentrações de  
236 ROS no meio e os danos por elas causados, auxiliando assim na criopreservação das células  
237 espermáticas. Os estudos têm demonstrado a eficácia da adição de antioxidantes em meios  
238 diluidores de sêmen ovino, assim como, seus efeitos deletérios. A justificativa parece estar  
239 relacionada a dose adicionada ao meio diluidor, que em excesso é prejudicial e pode  
240 comprometer etapas fisiológicas importantes da aquisição do potencial fertilizante espermático.

241 Contudo, ainda são necessários mais estudos para definir com exatidão o antioxidante de escolha  
242 ou a associação que confere melhores resultados, assim como, qual a concentração ideal para a  
243 preservação da qualidade espermática, desta forma, visando a evolução e incremento da  
244 criopreservação de sêmen ovino.

245

246

## REFERÊNCIAS

247 AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the  
248 pathophysiology of human reproduction. **Fertility Sterility**, v.79, p.829–843, 2003.

249 AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID T. M., Prevention of Oxidative Stress Injury to  
250 Sperm. **Journal of Andrology**, v.26, n.6, p.654-660, 2005.

251 AITKEN, G. R.; HENDERSON, J. R.; CHANG, S. C.; MCNEIL, C. J.; BIRCH-MACHIN, M.  
252 A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. **Clinical  
253 and Experimental Dermatology**, v.32, n.6, p.722-727, 2007.

254 AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.  
255 Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human  
256 spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1046, 1998.

257 ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; CARDOZO, R. M.;  
258 MARCELA MATAVELI, M.; KIOSHIMA R. S. Efeito as suplementação de selenometionina e  
259 vitamina C sobre a morfologia espermática do sêmen de coelho. **Acta Science Animal Science**,  
260 v.28, p.165-175, 2006.

261 ANNAE, R.; CREPPY, E. E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human  
262 skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamin E and C.  
263 **Human Experimental Toxicology**, v.20, p.477-481, 2001.

264 BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de  
265 espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, 2006.

266 BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta.  
267 **Revista de Nutrição**, v.12, p.123-130, 1999.

268 BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H.  
269 Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome  
270 reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, p.837-845, 2003.

271 BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIOZKAN, S.; ULUTAS, P. A. Comparison of the effects  
272 of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid  
273 peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v.81, p. 13-17, 2009.

274 CAMARA, D. R.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. Effects  
275 of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen.  
276 **Theriogenology**, v.15, n. 76, p. 342-350, 2011.

277 CAO, G.; CUTLER, R. G. High concentration of antioxidants may not improve defense against  
278 oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.17, p.189-201, 1997.

279 ÇOYAN, K.; BASPMAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P. Effects of cysteine and  
280 ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. **Cryobiology**,  
281 v.63, p.1-6, 2011.

282 CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility:  
283 links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular Reproduction**  
284 **Development**, v.37, p.345-362, 1994.

285 CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**,  
286 v.5, p.46-52, 2000.

287 DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos  
288 fenólicos. **Visão acadêmica**, v.5, n.1, 2004.

289 DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K.; SABANEKH, E. Physiologic and pathologic levels  
290 of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertility and Sterility**, v.92, p.1626-  
291 1631, 2009.

292 DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex  
293 story. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.250, p.70-79, 2006.

294 FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in  
295 whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23,  
296 2002.

297 GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M. C.; &  
298 O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro  
299 quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.217-227, 2007.

300 GUERRA, M. M. P.; CÂMARA, D. R.; SILVA, E. C. B. da; SILVA, S. V. USO DE  
301 Antioxidantes no sêmen ovino (Use of antioxidants on ram semen). **Ciência Animal**, v.22, n.1,  
302 p. 354-364, 2012.

303 HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Pathology and**  
304 **Biology**, v.44, n.1, p.6-13, 1996.

305 HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and  
306 significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715S-725S, 1993.

307 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed.,  
308 Oxford University Press: New York, 936p., 1999.

309 HOSSEIN, M. S.; HASHEM, M. A.; JCONG, Y. M.; LEE, M. S.; KIM, S.; KIM, J. H.; KOO, O.  
310 J.; PARK, S. M.; LEE, E. G.; PARK, S. W.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S.  
311 Temporal effects of tocopherol and ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo  
312 development. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.107-117, 2007.

313 KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.;  
314 THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index,  
315 lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**,  
316 v.65, p.1407-1421, 2006.

317 LA FALCI, V. S.; YRIO-KOSKINEN, A. E.; FAZELI, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F.  
318 Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram  
319 sperm oxidative stress during storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.180-187,  
320 2011.

321 LEHMANN, C.; WEBER, M.; KRAUSCH, D.; WAUER, H.; NEWIE, T.; ROHR, U.;  
322 HENSEL, M.; GLATZEL, E.; PRIEM, F.; GRUNE, T.; KOX, W. J. Parenteral selenium  
323 supplementation in critically ill patients--effects on antioxidant metabolism. **Z Ernährungswiss**,  
324 v.37, p.106-109, 1998.

325 LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E.  
326 Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger  
327 mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.

328 LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.  
329 R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células  
330 germinativas e embriões. Role of Antioxidants Agents in Germ Cells and Embryos  
331 Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956, 2011.

332 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em  
333 mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193,  
334 2009.

335 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.;  
336 RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender  
337 supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p. 85-90, 2009.

338 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGO, I. C. Lipid  
339 peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in  
340 extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.122, n1-2, p. 118-123, 2010.

341 MANEESH, M.; JAYALAKSHMI, H.; SINGH, T. A.; CHAKRABARTI, A. Impaired  
342 hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. **Indian Journal of**  
343 **Clinical Biochemistry**, v.21, n.1, p.165-168, 2006.

344 MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.;  
345 LUTWAK-MANN, C. **Male reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, p. 23-28,  
346 1981.

347 MATA-CAMPUZANO, M.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, L.; DE  
348 PAZ, P.; GARDE, J. J.; MARTINEZ-PASTOR, F. Effect of several antioxidants on thawed ram  
349 spermatozoa submitted to 37°C up to four hours. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, n.6,  
350 p.907-914, 2012.

351 MAXWELL, W. M. C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence  
352 of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1013-1020, 1996.

353 MENEZES, E. S. B.; CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SOUZA, D. F. R.; NETO, E.  
354 T. A.; SILVA JUNIOR, J. B.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Uso da n-acetilcisteína na

355 conservação de sêmen ovino a 4°C: Resultados preliminares. In: **Anais CONBRAVET**  
356 **(Congresso Brasileiro de Veterinária)**, 2008.

357 ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema  
358 antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associada a métodos eletroanalíticos na  
359 avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

360 SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; GABOR, G. Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation  
361 of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**,  
362 v.50, n.2, p.235-245, 2002.

363 SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function.  
364 **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78-86, 1996.

365 SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive  
366 technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

367 SILVA, E. C.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. Effect of  
368 antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm.  
369 **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1722-1726, 2012.

370 SILVA, P. F. N. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. **Doctoral Thesis**,  
371 Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Utrecht, 177f, 2006.

372 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO,  
373 C. A.; GUERRA, M. M. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram  
374 spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**,  
375 v.137, n.1-2, p.37-44, 2013.

376 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO,  
377 C. A.; GUERRA, M. M. P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-



378 yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in**  
379 **Domestic Animals**, v.46, p.874-981, 2011.

380 SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect os ascorbic acid on the freezability of ram semen  
381 diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turkish. Journal of**  
382 **Veterinary and Animal Sciences**, v.28, p.893-899, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

399