Investigação

ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO, ANTIOXIDANTES E SUAS IMPLICAÇÕES NA QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

*Reactive oxygen species, antioxidants and their implications for
the quality of cryopreserved semen in domestic mammals*

Dr. Ricardo Toniolli^{1*}, MSc. Jonathan Maia da S. Costa²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS - Labsuis) – Faculdade de Veterinária, ²Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza Ceará; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da FAVET/UECE.

*E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

O processo de criopreservação proporciona uma série de alterações celulares, as quais são responsáveis pela perda de qualidade do ejaculado. Os danos podem variar desde a queda da motilidade até lesões irreversíveis ao DNA espermático, que contribuem para redução das taxas de fertilidade. Estas crioinjúrias são resultados da produção exacerbada das espécies reativas de oxigênio (ERO) no sêmen. Com objetivo de minimizar os danos causados à célula espermática, diversos estudos têm sugerido a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento do sêmen. Esta revisão teve por objetivo trazer informações relativas às ações dos antioxidantes sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado.

Palavras-chave: espermatozoides, congelamento, radicais livres, refrigeração.

ABSTRACT

The cryopreservation process provides a number of cellular changes, which are responsible for the loss of quality of the semen. This damage can range from loss of motility until irreversible damage to sperm DNA, contributing to reduced fertility rates. Such cryogenic damage are the result of high production of reactive oxygen species (ROS) in semen. In order to minimize damage to sperm cells, several studies have suggested the addition of antioxidants to medium for chilled and frozen semen. This review aims to bring information about the actions of antioxidants on the quality of cryopreserved boar semen.

Key-words: sperm, frozen, free radicals, refrigeration

INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas no organismo animal, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os antioxidantes encontram-se em uma situação de equilíbrio. Entretanto, quando este equilíbrio é quebrado em uma situação de aumento da concentração de EROs, devido à produção de diversos radicais livres, dentre os quais se destacam os superóxidos (O_2^-), a hidroperoxila (HO_2), a hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ocorrer danos irreversíveis nas células (GUERRA et al., 2004; BARREIROS et al., 2006).

Na esfera reprodutiva, a produção excessiva de EROs pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o mais susceptível ao estresse oxidativo, pois as EROs interagem com os lipídeos e as proteínas da membrana e com o DNA mitocondrial e nuclear. Com isto, há uma redução da motilidade, da viabilidade dos espermatozoides e da taxa de fecundação (MORAES et al., 2015).

Embora o plasma seminal, seja rico em antioxidantes e ofereça proteção ao espermatozoide, compensando a sua baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes, esta condição não é suficiente para minimizar os danos causados pelas crioinjúrias. Portanto, seria necessário reduzir a produção de EROs ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis para as células (GUERRA et al., 2012; MAIA et al., 2009).

Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos em diversas espécies animais, adicionando antioxidantes

externos ao meio diluente em protocolos de refrigeração e de congelamento de sêmen, no intuito de reduzir ou interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas (PEÑA et al., 2003; COYAN et al., 2010; COSTA et al., 2015 e 2016; MORAES et al. 2015). Esta necessidade inclui, além da identificação dos antioxidantes, as suas melhores concentrações, visando a diminuição do estresse oxidativo e dos danos espermáticos, possibilitando a maximização dos efeitos dos diluentes.

Nesta revisão, serão abordados aspectos ligados à geração e degradação de EROs no sêmen, bem como seu envolvimento na capacitação espermática e a influência da adição de antioxidantes sobre a fisiologia do espermatozoide de mamíferos submetidos aos processos de refrigeração e congelamento.

Espécies reativas ao oxigênio - EROs

Os metabólitos reativos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, sendo altamente energéticos e instáveis. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, cerca de 98% do oxigênio (O_2) absorvido pelos organismos é reduzido, formando água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria. No retículo endoplasmático, o sistema enzimático citocromo (fosforilação oxidativa), procede a redução tetravalente do oxigênio com aceitação de quatro elétrons (NORDBERG e ARNÉR, 2001; MAIA et al., 2010). Durante esse processo, cerca de 5% do O_2 é reduzido, sendo que uma molécula recebe apenas um elétron, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como os radicais superóxidos ($-O_2^-$), Hidroxila ($-OH$) e radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Radical superóxido

O radical superóxido age como oxidante ou redutor, sendo produzido em quase todas as células aeróbicas durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A sua formação ocorre na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória, sendo produzido também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (BARREIROS et al., 2006). Por se tratar de um radical pouco reativo, não possui habilidade para penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Radical hidroxila

São formados a partir do peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, a qual é catalisada por íons de metais (Fe^{++} ou Cu^{+}). Embora apresente limitada capacidade de difusão, esses radicais possuem meia vida curta, atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição de insaturações (BARREIROS et al., 2006). Quando a hidroxila é produzida próxima ao DNA, modificações poderão ocorrer nas bases purínicas e pirimídicas, levando a mutação ou inativação do material genético. Esta alta reatividade torna-o responsável pelas maiores alterações no RNA, sendo considerado o mais reativo radical em sistemas biológicos, devido o seu potencial deletério ao organismo. Ele pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS et al., 2006).

Peróxido de hidrogênio

Dois radicais superóxido formam o peróxido de hidrogênio, em conversão espontânea e enzimática. Em pH fisiológico, a

baixa concentração de prótons reduz a taxa de reação espontânea e o H₂O₂ formado é o produto da reação enzimática para eliminação do radical superóxido pela ação da superóxido redutase (HALLIWEL e GUTRIDGE, 1999).

O peróxido de hidrogênio, é praticamente inócuo, porém apresenta uma elevada permeabilidade e estabilidade, difundindo-se rapidamente através da membrana plasmática, devido a célula possuir metais de transição exercendo importante papel no estresse oxidativo, sendo talvez o mais apto a promover alterações nos sistemas enzimáticos intracelulares (BAUMBER et al., 2000; NORDBERG e ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, ele pode ser removido parcialmente por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas a tioredoxina (NORDBERG e ARNÉR, 2001; BARREIROS et al., 2006)

Produção de EROs

O mecanismo responsável pela produção de EROs no espermatozoide ainda não está totalmente elucidado (MAIA e BICUDO, 2009), entretanto, algumas hipóteses foram lançadas. A primeira refere-se a possível presença de uma oxidase na membrana plasmática do espermatozoide que, quando ativa, gera O₂⁻, sugerindo que o fóstato de dinucleotídeo de nicotinamina adenonisa (NADPH) seja a principal fonte de elétrons, pois são coenzimas envolvidas nas reações de oxidação-redução dos processos do metabolismo energético.

A segunda, baseia-se na possível integração da diaforase espermática, com a cadeia respiratória mitocondrial localizada na peça intermediária da célula. Ela indica o sistema mitocondrial como a maior fonte intracelular

desses oxidantes, principalmente em espermatozoides de animais inférteis (GAVELLA e LIPOVAC, 1992).

A mitocôndria é o principal local de formação de EROs, pois grande parte da energia produzida é gerada por meio da fosforilação oxidativa, o que implica nos complexos enzimáticos (BLIER et al., 2001; BARJA et al., 2007). Sendo assim, paradoxalmente, o processo natural para o desenvolvimento da vida, também é um dos principais responsáveis pela formação das EROs, já que essas espécies são produzidas por reações REDOX, como é o caso da NADPH, que atua no mecanismo de defesa intracelular (DOWNLING e SIMMONS, 2009).

Estas hipóteses fortalecem a afirmativa de que, independente do mecanismo de formação das substâncias oxidantes sabe-se que esta produção é intrínseca aos espermatozoides, particularmente os imaturos e morfológicamente anormais, os quais potencializam em cem vezes mais a produção de EROs no sêmen (MARCHESI e FENG, 2007; MAIA e BICUDO, 2009; MAIA et al., 2010).

EROs e capacitação espermática

Há evidências de que a capacitação espermática é um processo oxidativo, no qual pequenas quantidades de EROs são necessárias para que ela aconteça (O'FLAHERTY et al., 2003; GUERRA et al., 2004). Durante o processo de capacitação ocorre um aumento dos níveis de cálcio intracelular, de EROs e da tirosina quinase, levando a maior produção da adenosina monofosfato cíclica (AMPc). Estes eventos induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Nestas condições, ele passa pelo processo de reação acrossomal fisiológica, adquirindo a habilidade de fecundar (SAALU, 2010).

Segundo De Lamirande e Lamonthe (2009) o superóxido (O₂⁻) e o óxido nítrico (NO) estão envolvidos na capacitação do espermatozoide humano, ambos em tempos diferentes deste processo. Enquanto o O₂⁻ participa dos primeiros 30 minutos, o NO finaliza o processo nas últimas duas horas, fornecendo adequada

capacidade de fecundação aos espermatozoides. Burnaugh et al. (2007) ao incubarem espermatozoides de garanhão com cálcio ionóforo, mimetizando as condições da capacitação espermática, observaram um aumento significativo na produção do ânion superóxido (O₂⁺⁺), evidenciando a participação das EROs nesta função do gameta masculino.

O'flaherty et al. (2003) e Maia et al. (2010) avaliaram o envolvimento das EROs na capacitação espermática em células bovina e ovina e observaram que os níveis de H₂O₂ foram aumentados após indução à capacitação espermática, demonstrando a importância deste radical para esta ação. O'flaherty et al. (2003) observaram também que, após adicionar superóxido dismutase ao meio diluente, houve uma inibição da capacitação. Sendo a superóxido dismutase (SOD) uma removedora de O₂⁻, pressupõe-se que este esteja envolvido no processo de capacitação espermática.

Danos causados pelas EROs ao espermatozoide

Embora as EROs sejam necessárias para o desenvolvimento de algumas funções fisiológicas tais como, regulação da expressão de genes sensíveis às alterações da homeostase, em diferentes tipos celulares, a sua produção exacerbada, principalmente dos radicais O₂⁻ e H₂O₂, pode condicionar a capacitação espermática precoce (ROY e ATREJA, 2008).

As altas concentrações de EROs, ainda são responsáveis por reações específicas e inespecíficas em componentes celulares adjacentes, tais como, lipídeos insaturados, proteínas e DNA, prejudicando o funcionamento celular (GHARAGOZLO e AITKEN, 2011). Elas promovem sérios danos à célula espermática, com o declínio da qualidade espermática de forma irreversível e aumento da fragmentação do DNA, em garanhões (BAUMBER et al. 2003), suínos (VALENÇA e GUERRA, 2007), cães (KAWAKAMI et al., 2007; NEAGU et al., 2011), homens (COCUZZA et al., 2007), touros (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2008), veados (MATA-CAMPUZANO et

al., 2012a) e carneiros (MATA-CAMPUZANO et al., 2012b).

As elevadas taxas de EROs podem inibir o metabolismo energético do espermatozoide, lesionar o DNA mitocondrial, promover perdas de enzimas intracelulares e interferir na capacidade fecundante da célula (VALENÇA e GUERRA, 2007; MORAES et al., 2015). Tais danos, podem aumentar de maneira irreversível, quando os espermatozoides são submetidos à criopreservação (RODELLO et al., 2011; MAIA et al., 2010; MAHFOUZ et al., 2010). Esses fatos geram um estresse oxidativo pelo desequilíbrio entre os processos bioquímicos, o que aumenta a fluidez da membrana plasmática, com perda de sua função seletiva de transporte (SAYRE et al., 2008; SICHERLE et al., 2011).

Antioxidantes

Segundo Stedman (2003), o termo antioxidante significa impedir a oxidação de outras substâncias químicas, tendo por função regenerar o substrato ou prevenir sua oxidação. O equilíbrio entre agentes óxido-redutores com as EROs e o sistema de defesa antioxidante é essencial, uma vez que estes agentes são gerados de maneira endógena em decorrência do metabolismo do oxigênio (NOGUEIRA et al., 2014). A adição de antioxidantes aos diluentes vem sendo testada, visando proteger os espermatozoides dos efeitos tóxicos das EROs e minimizar as injúrias decorrentes do processo de criopreservação (GUERRA et al., 2012).

De acordo com suas características os antioxidantes podem ser divididos em sistemas enzimáticos e não enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

São macromoléculas, advindas do próprio organismo e por isso, denominadas antioxidantes naturais. Neste grupo as principais enzimas são: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) (ANDRADE et al., 2010).

Superóxido dismutase (SOD)

Ela é a enzima mais abundante do organismo. Tem por função catalisar a dismutação do superóxido (O_2^{++}) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), concentrando-se na célula espermática e no plasma seminal (NORDBERG e ARNÉR, 2001), caracterizando seu poder antioxidativo, tanto na sua produção endócrina quanto na sua implementação externa na técnica de criopreservação (BILODEAU et al. 2000; MARTI et al. 2008; SILVA et al. 2011).

Marti et al. (2008) avaliaram a atividade do SOD no sêmen ovino, e observaram uma redução de 65% de atividade dessa enzima no sêmen criopreservado, quando comparado ao sêmen in natura e resfriado, evidenciando a importância da adição de antioxidantes externos ao meio diluente, antes do processo de criopreservação. Cerolini et al. (2001) demonstraram que o sêmen suíno apresenta maior viabilidade após descongelação quando possuem previamente alta atividade de SOD e alta proporção de GSH-Px. A adição de SOD (100 UI/mL) preserva o acrossoma de espermatozoides criopreservados de carneiros e inibe a reação acrossômica precoce, por favorecer o equilíbrio entre as concentrações de antioxidantes e oxidantes no ejaculado (SILVA et al., 2011).

Catalase

É uma heme-proteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, e participa da detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada do peróxido de hidrogênio. Ela expressa seu papel antioxidante na diminuição da formação do radical hidroxila,

a partir do peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton. Esta enzima aumenta sua eficiência e proteção contra a inativação, ao ligar-se à fonte carreadora de elétron NADPH (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Câmara et al. (2011) constataram que a adição de catalase (100 e 200 UI/mL) ao diluente, reduz os efeitos deletérios da refrigeração (5 °C) sobre a motilidade dos espermatozoides de carneiros por 24 h. Entretanto, a adição de 100 UI/mL ao sêmen de carneiros, não foi suficiente para melhorar a cinética espermática e impedir a excessiva produção de EROs, ocasionando peroxidação lipídica e fragmentação do DNA, em vista da sua baixa atividade influenciada pela produção de ATP e NADPH (SRICHERLE et al., 2011).

No entanto, a adição de catalase ao meio diluente pode ser funcionalmente relevante no trato genital feminino, uma vez que os espermatozoides possuem deficiência da mesma. Além disso, aminoácidos presentes no útero e no oviduto de bovinos estimulam a produção de H_2O_2 pelos espermatozoides mortos. Lapointe e Bilodeau (2003) observaram que a sua presença no fluido do oviduto de vacas aumenta cerca de duas vezes durante o ciclo estral, principalmente na região da ampola, ressaltando a importância da remoção de H_2O_2 no oviduto.

Glutathione peroxidase

Esta enzima, se apresenta no organismo de mamíferos de quatro formas diferentes: GSH-Px 1, GSH-Px 2, GSH-Px 3 e GSH-Px 4. A GSH-Px4 é considerada a principal responsável pela proteção espermática (ALVAREZ et al., 2006), porém todas possuem participação na inibição da peroxidação lipídica (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). A GSH-Px atua ainda como catalisador da redução/degradação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos, melhorando a qualidade da motilidade espermática de sêmen criopreservado (FOOTE et al., 2002; BUCAK et al., 2008).

O efeito da adição de glutathione (5 ou 10 mM) ao sêmen melhorou significativamente a motilidade, viabilidade e estabilização da

membrana de espermatozoides descongelados de carneiros (BUCAK e TEKIN, 2007). Assim como a utilização da metionina como antioxidante, em sêmen de carneiro a 5°C melhorou a motilidade espermática em uma dose de 1 mM, após 72 horas de armazenamento (COVAN et al., 2010). Tais efeitos são explicados devido à metionina ser precursora da glutatona, o que gerou seu aumento no meio, favorecendo a motilidade. A glutatona ao ser adicionada ao sêmen tem seu nível de concentração intracelular aumentado, o que evita lesões à célula, causadas pela peroxidação lipídica (GADEA et al., 2007).

Antioxidantes não enzimáticos

São denominados antioxidantes sintéticos, um grande número de compostos de baixo peso molecular (MAIA et al. 2010), incluindo o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipóico, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutatonas, betacaroteno, caroteno, vitamina C, Trolox C, dentre outros. Os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução são o ácido ascórbico e a vitamina E. A pentoxifilina por sua vez, tem sido utilizada em diversos trabalhos com diferentes espécies (ESTEVEZ et al., 2007; MILANI et al., 2010; TSUNODA et al. 2015).

Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico é encontrado nas células vegetais e animais, podendo estar unido a uma proteína ou na forma livre. É bastante solúvel em água e pertence ao grupo orgânico das lactonas, que são ácidos carboxílicos e apresentam uma estrutura molecular com $C_6H_8O_6$ (COULTATE, 2004). Ele encontra-se disponível para uma oxidação favorável, pois apresenta característica

hidrossolúvel, neutraliza as EROs e atua inibindo a peroxidação lipídica por redução (BARREIROS et al., 2006). Este processo ocorre na fase aquosa sobre os radicais livres. Por outro lado, estudos in vitro evidenciaram que estes antioxidantes em excesso ou na presença de metais de transição, como o ferro, podem atuar como pró-oxidantes, gerando radicais como o H_2O_2 e o OH (RAMALHO e JORGE, 2005).

O uso do ácido ascórbico minimiza os efeitos oxidativos e mantém a integridade do DNA de espermatozoides humanos criopreservados, elevando os níveis de fertilidade (BRANCO et al., 2010). A adição de 50 mg deste antioxidante no sêmen de caprinos, melhora a motilidade, a integridade estrutural da membrana e maior viabilidade espermática (CASTILHO et al., 2009). Neste contexto a utilização de concentrações mínimas de ácido ascórbico no sêmen, mantém parâmetros espermáticos ideais para fertilização do oócito, em detrimento da eficiente redução da produção de EROs, durante a conservação à baixas temperaturas (COSTA et al., 2015; MORAES et al., 20015).

Trolox C (6 – Hidroxi – 2,5,7,8 – tetrametilcroman – 2 – 2 ácido carboxílico)

Trata-se de um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, com propriedades antioxidante maiores que o α - e γ -tocoferol. Sabe-se que antioxidantes sintéticos, por não conseguirem ser estocados no corpo do animal, tornam-se menos efetivos, entretanto, esse análogo é hidrossolúvel e oferece a condição necessária para seu contato direto com a membrana (BORGES et al., 2011).

O trolox C é um excelente inibidor da lipoperoxidação por estar distribuído em ambas as camadas duplas de lipídeos das biomembranas, envolvendo o OH- fenólico e a remoção de radicais peroxil, bem como por obter uma cadeia de carbono e ser composto por um núcleo croman. Sua estrutura molecular se assemelha à do α tocoferol (ALBERTINI e ABUJA, 1999).

A adição de trolox C em sêmen de garanhões e carneiros, funcionou como agente inibidor de EROs, inibindo a liporexidação lipídica da membrana plasmática, melhorando a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática e a viabilidade (MAIA et al., 2009; MARQUES et al., 2002). Dados semelhantes foram obtidos por Peña et al. (2003) ao utilizarem o trolox C, em ejaculados de reprodutores suínos, constatando aumento na motilidade espermática das amostras tratadas. Observou-se, principalmente, aumento da velocidade espermática e do MIP (movimento individual progressivo), redução significativa de células com movimento circular e desvio lateral de cabeça e um elevado número de espermatozoides com alta atividade mitocondrial.

Pentoxifilina

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina, que inibe a adenosina cíclica 3'-5' monofosfato (AMP) fosfodiesterase e promove aumento das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativação da adenilciclase. Ela possui ação direta no controle flagelar do espermatozoide, como estimulador da motilidade progressiva e da sua capacidade fecundante (YOVICH et al., 1988).

Ela ainda promove um aumento da fosforilação de tirosina, liberando energia para a atividade da dineína ATPase e aumentando o batimento flagelar. O AMP cíclico exerce um papel fundamental na cinética do espermatozoide e na reação acrossômica, podendo inativar radicais livres e elevar as taxas de fertilidade (ESTEVEZ et al., 2007).

O uso da pentoxifilina (3,6 mM) como um indutor de funcionalidade, adicionada ao ejaculado equino diluído e resfriado a 5°C, minimiza o estresse térmico da refrigeração e melhora a maioria dos parâmetros espermáticos, provavelmente devido ao aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos, em especial a AMPC e a guanosina monofosfato cíclica (GMPc)

(GOULART et al., 2004). A adição da pentoxifilina (5 mM) ao sêmen humano criopreservado, melhora a motilidade total (40,5% x 55,5%) e progressiva (35,5% x 47%) após a descongelação (ESTEVEZ et al., 2007).

A criopreservação de sêmen pode permitir um bom desempenho do setor industrial, entretanto, as crioinjúrias que ocorrem durante esse processo, levam à disfunção espermática e à diminuição da capacidade de fertilização. Neste sentido, o uso de terapias antioxidantes, tem sido realizado no intuito de promover melhorias na biotécnica.

É notório que a adição de antioxidantes aos diluentes de sêmen dos animais domésticos vem atribuir uma melhora significativa na qualidade do material criopreservado, no que diz respeito à manutenção da motilidade, preservação da membrana, integridade de DNA e do acrossoma. Esta prática vem incrementando a inseminação artificial, pela obtenção de resultados mais promissores, o que levará à maximização do potencial genético dos rebanhos de forma satisfatória.

Todavia, ainda se faz necessário a realização de estudos mais aprofundados à cerca da ação destes antioxidantes, visando uma padronização de substâncias e suas possíveis concentrações, à serem utilizadas para reduzir/minimizar a ação das EROs no ejaculado das diferentes espécies de mamíferos domésticos.

REFERÊNCIAS

Albertini R, Abuja PM. 1999. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*. 30(3):181-188.

Álvarez AL, Serres C, Torres P. et al. 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 94(1-4):89-91.

Andrade ER, Melo -Sterza FA, Seneda MM. et al. 2010. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 34(2):79-85.

Barja G. 2007. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Research*. 10(2):215-223.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29(1):113-123.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. et al. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24(4):621-628.

BAUMBER J, Ball BA, GRAVANCE CG. et al. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*. 21(6):895-902.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA. et al. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 55(3):282-288.

Blier PU, Dufresne F, Burton RS. 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genetic*. 17(7):400-406.

Borges JC, Silva MS, Guimarães JD. et al. 2011. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(3):303-314.

Branco SC, Garcez EM, Pasqualotto F. F. et al. 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*. 60(2):235-237.

Bucak MN, Tekin N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 73(1-3):103-108.

Bucak MN, Ahin AA, Yuce A. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 75(1):128-134.

Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*. 67(30):580-589.

Câmara DR, Silva SV, Almeida FC. et al. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76(2):342-350.

Castilho FE, Guimarães DJ, Martins FL. et al. 2009. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38(12):2335-2345.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F. et al.. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121:395-401.

Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS. et al. 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International Brazilian Journal of Urology*. 33(5):603-621.

Costa JMS, Souza WL, Moraes EA. et al. 2015. Adding antioxidants to ram sperm improves sperm binding capability after cryopreservation. *Journal of Animal Science*. Orlando, Florida. 93(2):114-115.

Costa JMS, Souza WL, Moraes EA. et al. 2016. Effect of Trolox C and ascorbic acid on the binding capacity of sperm ram after cryopreservation. In: 42nd Annual Conference of the IETS. *Reproduction, Fertility and Development*. Louisville-KY. 28:154-155.

Coultate TP. 2004. *Alimentos: A química e seus componentes*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 368.

Coyan K, Pinar NB, Bucak MN. et al. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*. 89(3):426-431.

De Lamirande E, Lamonthe G. 2009. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radical Biology e Medicine*. 46(4):502-510.

Dowling DK, Simmons LW. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings the Royal Society of London*. 276:737-1745.

Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP. 2007. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40(7):985-992.

Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC. et al. 2008. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental and DNA integrity. *International Journal of Andrology*. 32(4):353-359.

Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43(1):1-16.

Foot RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 71(1-2):13-23.

Gadea J, Gumbao D, Cánovas S. et al. 2007. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 31(1):40-49.

Gavella M, Lipovac V. 1992. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isoenzyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology*. 28(2):1992.

Gharagozloo P, Aitken RJ. 2011. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significant of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*. 26(7):1628-1640.

Goulart HM, Silva AEDF, Manus MC, Papa FO. 2004. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33(1): 112-122.

Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC. 2004. The role of oxidants and antioxidants on andrology. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 28:187-195.

Guerra MMP, Câmara RD, Silva BCE. et al. 2012. Uso de antioxidantes em ovinos. *Ciência Animal*. 22(1):354-364.

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

Kawakami E, Takemura A, Sakuma M. et al. 2007. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normo zoospermic and as the no zoospermic Beagles. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 69(2):133-136.

Lapoint J, Bilodeau JF. 2003. Antioxidant defenses are modulated in cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 68(4):1157-1164.

Mahfouz R, Sharma R, Thiagarajan A. et al. 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in fertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*. 94(6):2141-2146.

Maia MS, Bicudo SD. 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamífero: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 33(4):183-193.

Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC. et al. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*. 85(2-3):85-90.

Maia MS, Bicudo SD, Sircherle CC. et al. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extender with antioxidants. *Small Ruminant Research*. 23(1-2):122-118.

Maneesh M, Jayalekshmi H. 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 21(2):80-89.

Marchesi DE, Feng HL. 2007. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of Andrology*. 28(4):481-489.

Marques A, Arruda RP, Celegghini ECC. et al. 2002. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*. 58:257-260.

Marti E, Marti JI, Muinõ-Blanco T. et al. 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immune localization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 29(4):459-467.

Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M. 2012b. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted a 37 °C up to 4 h. *Reproduction in Domestic Animals*. 78(6):907-914.

Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Olmo E. et al. 2012a. Quality, oxidative markers and DNA fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology*. 78(5):1005-1019.

Milane C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Gérard O, Romagnoli S. 2010. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. 74(1): 153-164.

Moraes EA, Costa JMS, Souza WL. 2015. Antioxidants improve membrane integrity and acrossome and sperm mitochondrial activity in ram sperm after cryopreservation. Joint Annual Meeting. *Journal of Animal Science*. Orlando, Florida. 98(2):427-428.

Neagu VR, García BM, Rodríguez AM. et al. 2011. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology*. 75(1):10-16.

Nogueira BG, Bitencourt JL, Sampaio BFB. et al. 2014. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamífero. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 15(1):1-15.

Nordberg J, Arnér ESJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*. 31(11):1287-1312.

O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT. 2003. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *International Journal of Andrology*. 26(2):109-114.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M. et al. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 78(1-2):85-98.

Ramalho VC, Jorge N. 2005. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. *Química Nova*, São Paulo, p. 97.

Rodello L, Bicudo SD, Falleiros M. et al. 2011. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio GGL sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. *Veterinária e Zootecnia*. 18(2):239-248.

Roy SC e Atreja SK. 2008. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 107(1-2):68-84.

Saalu LC. 2010. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 13(9):413-422.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* Chem Res Toxicol. 21(1):172-188.

Sicherle CC, Maia MS, Bicudo SD. et al. 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*. 95(1-2):144–149.

Silva SV, Soares AT, Batista AM. et al. 2011. 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*. 46(5):874-981.

Stedman TL. 2003. *Stedman: dicionário médico*. 27ª ed. Rio de Janeiro, p. 219.

Tsunoda RH, Arruda RP, Serrano-Recalde EC, Martins OBM, Florez-Rodriguez SA, Rodrigues AMB, Lanconi R, Nichi M, Celegghini CEC. 2015. Addition of Pentoxifylline to Skim Milk-Based Extender onv Frozen-Thawed Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 35(10): 823-829.

Valença RMB, Guerra MMP. 2007. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(1):47-53.

Yovich JM, Edirishinghe WR, Cummins JM. et al. 1988. Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 50(1):179-181.