

ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES NO DE SÊMEN DE PEIXES

(Oxidative stress and antioxidants in the fish semen)

Bruna Bitencourt DA COSTA*; Danilo Pedro STREIT Jr

Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Dpto de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS. CEP: 91.540-000. *E-mail: bruna.bitencourt@ufrgs.br

RESUMO

Danos causados pelo processo de criopreservação, como o estresse oxidativo, levam a produção excessiva de EROS, podendo comprometer a fertilidade. Neste sentido, diversos antioxidantes vêm sendo adicionados aos diluentes de congelação de sêmen com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios causados pelos radicais livres. Assim, esta revisão tem como objetivo debater os principais aspectos relacionados aos danos causados ao sêmen durante o processo de criopreservação, e o efeito do uso de antioxidantes sobre a viabilidade espermática de peixes.

Palavras-chave: Criopreservação, EROs, estresse oxidativo, antioxidantes.

ABSTRACT

Damage caused by the cryopreservation process, such as oxidative stress, leads to the overproduction of EROS, which can compromise fertility. In this sense, several antioxidants have been added to semen freezing diluents in order to minimize deleterious effects caused by free radicals. Thus, this review aims to discuss the main aspects related to the damage caused to semen during the cryopreservation process and the effect of the use of antioxidants on the sperm viability of fish.

Key words: Cryopreservation, EROs, oxidative stress, antioxidants.

INTRODUÇÃO

As técnicas de armazenamento de sêmen, dentre as biotécnicas reprodutivas, têm sido amplamente utilizadas, pois além de preservar recursos genéticos das espécies, possibilitam a prática de reprodução seletiva e hibridização (MAZUR *et al.*, 2008; YILDIZ *et al.*, 2013). Embora se tenha bons resultados na criopreservação de sêmen de peixes, a obtenção de resultados satisfatórios e homogêneos na pós-descongelação não é uma realidade, pois há uma falta de padronização das técnicas, devido as diferentes condições entre as espécies, levando a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos utilizados (THOMASSEN e FARSTAD, 2009). Além disso, o método ainda causa grandes perdas na viabilidade espermática pós-descongelação, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados dos procedimentos utilizados.

A criopreservação de sêmen de peixe é uma ferramenta valiosa à aquicultura, a qual possibilita algumas vantagens, tais como o transporte de material genético

*Endereço para correspondência:
bruna.bitencourt@ufrgs.br

(ÖGRET MEN *et al.*, 2015), a sincronização da disponibilidade de gametas (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012; ARAMLI *et al.*, 2016), a proteção de espécies ameaçadas de extinção (ÖGRET MEN *et al.*, 2015; ARAMLI *et al.*, 2016) e a economia de sêmen (ARAMLI *et al.*, 2016). No entanto, ainda é uma tecnologia pouco utilizada quando comparada a outras espécies de animais domésticos.

As técnicas de criopreservação envolvem a adição de crioprotetores, congelamento e descongelamento de amostras de sêmen, sendo que todos estes processos podem resultar em algum dano às células espermáticas, diminuindo o sucesso da fertilização (KOPEIKA *et al.*, 2003; ARAMLI *et al.*, 2016). Portanto, antes de se criopreservar os espermatozoides, é necessária uma avaliação completa das soluções crioprotetoras a serem utilizadas para cada espécie de peixe (YAVAS e BOZKURT, 2011).

A criopreservação em nitrogênio líquido permite o armazenamento de sêmen por um longo período. Porém, o sucesso depende da redução das crioinjúrias causadas às células espermáticas durante o processo de criopreservação. Os danos causados aos espermatozoides durante este processo promovem a redução da motilidade e da integridade dos mesmos, além da redução nos índices de fertilidade pela perda da capacidade fertilizante do espermatozoide, devido à produção excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROS) (TIRELLI *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema antioxidante dos espermatozoides, levando a distúrbios metabólicos e funcionais, promovendo a peroxidação dos fosfolipídios da membrana e oxidação das proteínas, além de dano ao DNA que compromete a motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e o potencial de fertilização (WATSON, 2000; BALL, 2008). As EROS causam danos a membrana celular, devido à alta susceptibilidade do espermatozoide a peroxidação lipídica em razão da alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (AITKEN e BAKER, 2004; AURICH, 2005; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012).

O sêmen possui diferentes antioxidantes em sua composição, que mantêm a viabilidade das células *in vivo* (LAHNSTEINER *et al.*, 2010; LAHNSTEINER e MANSOUR 2010). No entanto, durante a criopreservação é necessária a diluição do sêmen na solução crioprotetora, o que reduz a concentração desses antioxidantes, diminuindo sua proteção antioxidante (CABRITA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012). Com isso, antioxidantes têm sido adicionados aos diluentes de congelamento com o intuito de minimizar os efeitos danosos às membranas dos espermatozoides e visando melhorar a viabilidade espermática pós-descongelamento (LAHNSTEINER, 2009; LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER *et al.*, 2011; KLEDMANEE *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2013; KUTLUYER *et al.*, 2014; ÖGRET MEN *et al.*, 2015; ARAMLI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

Nesta revisão, serão abordados aspectos ligados aos danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo no sêmen, e as contribuições da adição de antioxidantes às soluções crioprotetoras na congelamento do sêmen.

DESENVOLVIMENTO

Criopreservação

A conservação pelo frio (criopreservação) pode ser conseguida através da utilização de dois métodos (lenta e rápida): a congelação e a vitrificação. A congelação é descrita como método largamente utilizado para a criopreservação de células germinativas (PEGG, 2002; JAIN e PAULSON, 2006). Este método utiliza baixas concentrações de agentes crioprotetores (ACP) e resfriamento de forma gradual (AMBROSINI *et al.*, 2006). Já a vitrificação, consiste em resfriamento ultrarrápido (em torno de 20.000°C/min), com a utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores (JAIN e PAULSON, 2006).

Durante o processo de criopreservação em nitrogênio líquido, podem ocorrer danos de diversas naturezas, que implicam no comprometimento da viabilidade das células reprodutivas. Os principais danos podem ser ocasionados por formação de gelo intracelular, efeito solução, choque osmótico, toxicidade dos agentes crioprotetores e estresse oxidativo (JAIN e PAULSON, 2006). Os danos causados pelo estresse oxidativo ocorrem, principalmente, através da peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular. A criopreservação também pode afetar a estrutura e o metabolismo celular (TIRELLI *et al.*, 2005) devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), comprometendo a sobrevivência celular após a descongelação.

O processo de criopreservação tem como princípio a utilização de temperaturas ultrabaixas, visando à preservação de forma eficiente da estrutura e função de células e tecidos vivos (BAUST, 2008). Para isso, é necessária a exposição destas células e/ou tecidos a substâncias crioprotetoras antes da redução da temperatura. Estas substâncias ou agentes crioprotetores substituem a água presente no meio intracelular através de um gradiente osmótico, conferindo desidratação e redução do metabolismo, e consequentemente, maior proteção à célula e/ou tecido (PEGG, 2007).

Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular, permeáveis que atuam no citoplasma e organelas, reduzindo a temperatura de congelação do seu interior. Estas substâncias criam ligações com a água, reduzindo a formação de gelo no interior da célula, e protegem a célula do efeito solução, reduzindo a concentração de eletrólitos no interior da célula (JAIN e PAULSON, 2006). As substâncias crioprotetoras intracelulares mais utilizadas são o dimetilsulfóxido (Me₂SO), o etilenoglicol, metanol e glicerol (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

Já os crioprotetores extracelulares são açúcares ou polímeros de alto peso molecular, não permeáveis e hidrofílicos, que recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana para evitar os danos causados pela congelação e diminuem a formação de cristais de gelo. Estes crioprotetores agem extraíndo a água livre da célula, desidratando o espaço intracelular, pois induzem ao aumento da osmolaridade no meio extracelular (JAIN e PAULSON, 2006). Os mais utilizados são a gema de ovo fresco, leite em pó, frutose, sacarose e glicose (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Os radicais livres são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, com um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, sendo assim altamente instáveis e

reativos. São intermediários químicos do metabolismo do oxigênio, sendo que os principais são: o radical superóxido ($O_2^{\circ-}$), o radical hidroxil (OH°) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA e BICUDO, 2009). Podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna, pelo próprio metabolismo (subprodutos da respiração celular), por reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou por enzimas. Essa energia ao atingir o átomo produz a perda de um elétron tornando essa molécula instável. O acúmulo de EROS na célula promove o estresse oxidativo (SIKKA, 1996; NORDBERG e ARNER, 2001).

O ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$) é um radical livre pouco reativo e sem habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas onde é produzido. É formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron, sendo gerado de forma espontânea, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e ciclooxigenases.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical OH° . O H_2O_2 é gerado a partir da dismutação enzimática do ânion $O_2^{\circ-}$ pela ação da superóxido dismutase (SOD). Após, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido ao radical OH° , através de uma reação catalisada por metais (principalmente Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton. O radical hidroxil (OH°) é o radical mais reativo em sistemas biológicos, reagindo rapidamente com biomoléculas (SIKKA, 1996; NORDBERG e ARNER, 2001).

O estresse oxidativo pode ser causado por diversos fatores relacionados com a redução da disponibilidade de antioxidantes, entre eles, a nutrição inadequada, a permanência dos animais em condições de estresse, a coleta de sêmen, e a geração de quantidades excessivas de EROS pelos próprios espermatozoides (PEÑA *et al.*, 2009). O estímulo à formação de EROS induzido pela congelação pode estar relacionado com alterações na respiração celular e/ou estado de repouso das células, assim como por células espermáticas defeituosas que morreram durante o processo de criopreservação (SIKKA, 1996; BAILEY *et al.*, 2000). Esta condição pode estar associada ao aumento da ocorrência de danos celulares, com consequente redução da fertilidade dos machos (WANG *et al.*, 2003).

Os radicais livres podem reagir com várias biomoléculas, subtraindo elétrons para sua estabilização. Os substratos mais frequentes para os radicais livres são os ácidos graxos, proteínas entre outros. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, os quais, em concentração elevada, determinam fluidez da membrana, possibilitando que o espermatozoide participe dos eventos de fusão de membranas durante a fertilização, o que torna a membrana plasmática dos espermatozoides o principal alvo das EROS (AURICH, 2005; BAUMBER *et al.*, 2002). Assim, espermatozoides com peroxidação lipídica apresentam redução da fluidez da membrana e da sua capacidade de fertilização (AITKEN e BAKER, 2004). Bilodeau *et al.* (2000) sugeriram que o balanço entre a produção de EROS e a desintoxicação dos mesmos, pode ser um importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides antes, durante e após sua criopreservação, exercendo influência direta sobre a fertilidade. Estes

autores observaram que as principais enzimas antioxidantes envolvidas na desintoxicação das EROS no sêmen bovino são glutathione peroxidase e a superóxido dismutase.

O impacto do estresse oxidativo durante o processo de criopreservação seria minimizado através da suplementação dos meios diluidores com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade ao sêmen (MICHAEL *et al.*, 2009). Nesse sentido, diversos antioxidantes como Vitamina C e E, aminoácidos como cisteína, hipotaurina, e enzimas como superóxido dismutase e glutathione peroxidase têm sido utilizados como estratégia para melhorar a viabilidade dos diluentes de congelação (DE GRAAF *et al.*, 2007).

Danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo

Sabe-se que a produção de EROS pelas células espermáticas é um fator importante para os seus processos fisiológicos (BAKER e AITKEN, 2004), pois, em concentrações reduzidas, elas participam de diversas vias de sinalização celular e intervêm em funções como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com o oócito (AITKEN e BAKER, 2004; AITKEN e BENNETTS, 2006). Embora a geração controlada de EROS tenha funções fisiológicas, altas concentrações destas são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (SIKKA, 1996, 2004; LAHNSTEINER *et al.*, 2011; HAGEDORN *et al.*, 2012; ARAMLI *et al.*, 2016).

Durante a criopreservação de células espermáticas pode ocorrer estresse oxidativo promovido pelas EROS, que é caracterizado por um distúrbio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes da célula, prejudicando o sistema de defesa antioxidante da mesma, o que acarreta mudanças físicas e químicas na membrana plasmática e acrossomal (BAUMBER *et al.*, 2000; AGARWAL *et al.*, 2005). Em situações que existe uma maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema tende para o lado pró-oxidante, o que pode afetar os níveis de antioxidantes intracelulares e, dependendo da severidade deste processo, pode ser letal à célula (WATSON, 2000; AITKEN e BAKER, 2004; BALL, 2008). Acredita-se que essa letalidade seja devido aos danos oxidativos, que as EROS podem reduzir motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e no potencial de fertilização (ROCA *et al.*, 2004; BALL, 2008).

As lesões oxidativas ao DNA mitocondrial e à estrutura da membrana representam os fatores de maior importância para explicar a redução da fertilidade e motilidade do sêmen criopreservado, pois as mitocôndrias são as responsáveis pela produção de ATP necessário para a motilidade espermática (PEÑA *et al.*, 2009). Estudos mostram que a geração de altas concentrações de EROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo energético do espermatozoide, na motilidade e na viabilidade espermática e à fragmentação do DNA em equinos, bovinos, ovinos, caprinos, humanos e peixes (ARMSTRONG *et al.*, 1999; DURU *et al.*, 2000; KRZYZOSIAK *et al.*, 2001; BAUMBER *et al.*, 2002; BILODEAU *et al.*, 2002; HAGEDORN *et al.*, 2012).

Outros estudos verificaram, em mamíferos, um maior percentual de células espermáticas com acrossoma reagido (PERIS *et al.*, 2004; JOSHI *et al.*, 2005), redução significativa na motilidade e no percentual de espermatozoides rápidos (BAUMBER *et al.*, 2000; BILODEAU *et al.*, 2001; KRZYZOSIAK *et al.*, 2001; JOSHI *et al.*, 2005), além de

interferência com o movimento flagelar (AITIKENS e BENNETTS, 2006) associados ao estresse oxidativo, culminando com a sobrevivência após criopreservação de, aproximadamente, 50-60% da população de células espermáticas (WATSON, 2000).

Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo a produção ou os efeitos deletérios dos radicais livres, protegendo as células de danos oxidativos (BALL *et al.*, 2001). Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar de forma preventiva, impedindo a formação e/ou a ação de radicais livres, ou reparando a lesão ocorrida (SIKKA, 1996 e 2004).

Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático, que podem ou não atuarem em conjunto. Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas também conhecidos como antioxidantes naturais e é o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, catalase (CAT) e pelo sistema glutathiona peroxidase (GPx)/glutathiona redutase (GR)/glutathiona s-transferase (GST) (HAGEDORN *et al.*, 2012). O sistema não enzimático são micromoléculas que podem ter origem endógena ou dietética e inclui vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitaminas, minerais (cofatores enzimáticos) e compostos fenólicos; entre estes últimos estão a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), vitamina A (β -caroteno), piruvato, cisteína, glutathiona, selênio, zinco, cobre, magnésio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001; LUBERDA, 2005). Os antioxidantes enzimáticos são o principal mecanismo de defesa intracelular dos espermatozoides contra as EROS, enquanto os componentes do plasma seminal, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, são responsáveis pela proteção extracelular dos espermatozoides (VAN OVERVELD *et al.*, 2000).

Antioxidantes enzimáticos

A SOD catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o H_2O_2 , por sua vez, sofre ação da glutathiona peroxidase e da catalase. A catalase atua de forma complementar à superóxido dismutase, convertendo o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, impedindo a formação de OH (SIKKA, 1996).

A GPx reduz o peróxido de hidrogênio a duas moléculas de água e uma da glutathiona oxidada, tendo como substrato a glutathiona reduzida. A ação desta enzima depende da manutenção da relação entre glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), o qual é garantido pela ação da enzima glutathiona redutase, que na presença de NADPH, transforma a glutathiona oxidada em glutathiona reduzida (SIKKA, 2004). O metabolismo da glutathiona ocorre da seguinte forma: duas moléculas de GSH, sob ação da GPx, reduzem o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de GSSG (glutathiona oxidada). A GSSG junto com uma molécula de hidrogênio e na presença de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzida (NADPH), sob ação da glutathiona redutase (GR), é

convertida a duas moléculas de GSH e uma de NADP (dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato) (SIKKA, 1996 e 2004).

Antioxidantes não enzimáticos

A cisteína capta radicais livres através de interações químicas diretas com eles, atuando na eliminação das EROS através da manutenção dos níveis de glutathione intracelular, por isso possui boa capacidade antioxidante (TUNCER *et al.*, 2010). A glutathione é um tiol tri-peptídeo (ácido glutâmico-cisteína-glicina) não proteico, capaz de agir diretamente em muitas EROS, sendo o grupo tiol da cisteína o sítio ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (LUBERDA, 2005; CÂMARA e GUERRA, 2011). A glutamina tem função antioxidante exercida pela glutathione, pois esta molécula quando catalisada pela enzima glutaminase, sofre hidrólise, dissociando-se em íon amônio e glutamato. O glutamato, por sua vez, é essencial para a síntese da glutathione (CRUZAT *et al.*, 2009).

A taurina é um aminoácido sulfurado essencial que atua como um estabilizador de membrana através de interações diretas com fosfolípidios. Já a hipotaurina é um captador de oxidantes, tais como o radical hidroxil, o peróxido de hidrogênio e radicais superóxido, e sua oxidação resulta na formação de taurina, estando indiretamente, relacionada à regulação osmótica e à proteção da membrana espermática (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2013).

A metionina, em sua forma reduzida, se liga as EROS, protegendo os espermatozoides do estresse oxidativo (LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010). O ácido úrico tem seu papel antioxidante por ser um forte agente redutor, sendo considerado um antioxidante extremamente importante no sêmen de peixes teleósteos, assim como o ácido ascórbico (SIKKA, 1996; CIERESZKO *et al.*, 1999; LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER *et al.*, 2010). Este último, por sua vez, neutraliza as EROS por meio de reações de redução, contribuindo com a inibição da peroxidação lipídica (CIERESZKO e DABROWSKI, 1995; SIKKA, 2004; LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010). As concentrações de ácido ascórbico no sêmen são reguladas pelos níveis alimentares (CIERESZKO e DABROWSKI, 1995). O α -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel capaz de prevenir a peroxidação lipídica, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos ao DNA e à membrana, podendo também atuar na restauração dos níveis de glutathione e, assim, inibir a peroxidação lipídica (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; SILVA e GUERRA, 2012).

Adição de antioxidantes ao sêmen

A adição de antioxidantes ao sêmen aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo após a descongelação, neutralizando os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BAUMBER *et al.*, 2000). Com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de EROS exógenas, estudos têm sido realizados adicionando substâncias antioxidantes aos diluentes de sêmen de equinos (BALL *et al.*, 2001; BAUMBER *et al.*, 2005), suínos (GADEA *et al.*, 2004; GADEA *et al.*, 2005), bovinos (BILODEAU *et al.*, 2001), ovinos (BUCAK *et al.*,

2008, 2009a e 2009b; CÂMARA e GUERRA, 2011), aves (BRÉQUE *et al.*, 2003), humanos (AGARWAL e SALEH, 2002) e peixes (LAHNSTEINER, 2009; LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER *et al.*, 2011; KLEDMANEE *et al.*, 2013; Martínez-Páramo *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2013; KUTLUYER *et al.*, 2014; ÖGRET MEN *et al.*, 2015; ARAMLI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

A ação antioxidante dos aminoácidos vem sendo testada em inúmeros estudos, pois são moléculas carregadas, sendo possível que eles interajam eletrostaticamente com os grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide, formando assim, uma camada sobre superfície da célula, protegendo-a contra possíveis choques térmicos (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2008). Isto pode contribuir para a manutenção da integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, durante o processo de criopreservação.

Combinações entre alguns aminoácidos também têm sido testadas para criopreservação de sêmen, como a glutamina, histidina, metionina, cisteína, alanina, prolina, betaína, taurina e glicina, verificando-se a eficácia de alguns destes aminoácidos na crioproteção celular (PEÑA *et al.*, 1998; LINDEBERG *et al.*, 1999; EL-SHESHTAWY *et al.*, 2008; DE MERCADO *et al.*, 2009; ÇOYAN *et al.*, 2010). Kundu *et al.* (2001) obtiveram êxito na congelação de espermatozoides caprinos utilizando apenas aminoácidos como crioprotetores, e relataram que os melhores resultados foram obtidos com a associação de 40 mM de alanina, 60 mM de glutamina, 20 mM de prolina ou 40 mM de glicina com glicerol e dimetilsulfóxido.

Antioxidantes em sêmen de peixes

O sêmen de peixes conta com a presença de diferentes tipos de antioxidantes importantes na manutenção da sua viabilidade. Estudos verificaram a presença de diversos antioxidantes no sêmen, entre eles, ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol, metionina e metionina redutase, glutathione reduzida, catalase, peroxidase e superóxido dismutase (CIERESZKO e DABROWSKI, 1995; CIERESZKO *et al.*, 1999; MANSOUR *et al.*, 2006; STEJSKAL *et al.*, 2008; LAHNSTEINER, 2009; LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER *et al.*, 2010). Lahnsteiner e Mansour (2010) e Lahnsteiner *et al.* (2010) demonstraram que o ácido úrico é o principal antioxidante não-enzimático encontrado no sêmen de peixe. Já Słowińska *et al.* (2013), sugerem que a proteção antioxidante varia entre as espécies de peixes, pois demonstraram uma grande variabilidade na capacidade antioxidante total (TAC) no plasma seminal de 13 espécies.

Lahnsteiner e Mansour (2010) testaram o uso de antioxidantes em sêmen de peixes teleósteos (*Lota*, *Perca fluviatilis*, *Alburnus*, *Salmo trutta*). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o ácido úrico, na concentração de 0,5 mmol/L, foi o antioxidante que apresentou os melhores resultados, melhorando a motilidade espermática e a integridade da membrana e diminuiu a peroxidação lipídica dos espermatozoides para todas as espécies investigadas. A metionina em sua forma oxidada (sulfóxido de metionina) também foi efetiva como antioxidante na concentração de 1,5-3 mmol/L. E a

catalase melhorou a motilidade espermática e a integridade da membrana em todas as espécies do estudo, com exceção de *A. alburnos*.

Lahnsteiner *et al.* (2011), testaram a adição de glutatona reduzida e a adição conjunta de glutatona reduzida e oxidada, metionina, e catalase na solução de diluição de *S. fontinalis* e *O. mykiss*. Em *O. mykiss* 1,5 mmol/L de metionina reduzida e a mistura de 1,5 mmol/L de glutatona oxidada e reduzida aumentou a velocidade espermática após a descongelação. Em *S. fontinalis*, a glutatona reduzida, na concentração de 1,5 mmol/L, elevou a taxa de fertilização e a adição de glutatona reduzida e oxidada, ambas na concentração de 1,5 mmol/L, proporcionou o aumento da velocidade espermática no sêmen criopreservado. Já a metionina também na concentração de 1,5 mmol/L, promoveu um aumento da velocidade espermática, taxa de fertilização e duração da motilidade espermática. E a catalase na concentração de 100 U/L, promoveu o aumento da taxa de fertilização.

Martínez-Páramo *et al.* (2012) testaram a adição de 0,1 mM de β -tocoferol ou 0,1 mM de ácido ascórbico à solução crioprotetora de sêmen de *Dicentrarchus labrax*. Os autores concluíram que a adição de β -tocoferol e ácido ascórbico melhorou a motilidade espermática do robalo, que é um dos parâmetros mais afetados pela criopreservação.

Taurina e hipotaurina foram testadas por Martínez-Páramo *et al.* (2013), ambas na concentração de 1 mM em *Dicentrarchus labrax*. A taurina promoveu melhora dos parâmetros de motilidade espermática, aumentando a velocidade e linearidade espermáticas, e a redução da fragmentação de DNA. Já a hipotaurina aumentou da motilidade total e reduziu na fragmentação de DNA.

Kledmanee *et al.* (2013) testaram a adição de L-cisteína a solução de diluição em sêmen de carpa comum (*Cyprinus carpio*) refrigerado, apresentando resultados positivos, verificando que a motilidade espermática, a duração da motilidade espermática e a viabilidade espermática nos tratamentos com L-cisteína (1 mM) foram significativamente superior ao tratamento controle. No entanto, em maior concentração (2 mM) L-cisteína apresentou efeitos tóxicos ao sêmen de carpa comum.

Sarosiek *et al.* (2014) avaliou a influência de antioxidantes no armazenamento de sêmen de *Perca fluviatilis*. Neste estudo, melhores efeitos foram observados após a adição de glutatona (5 mM) ao sêmen; e a adição de cisteína (5 mM) resultou no alongamento da vida útil das células.

Kutluyer *et al.* (2014) testaram a adição de catalase (250 U/L), superóxido dismutase (250 U/L), peroxidase (250 U/L), glutatona oxidada (1,5 mmol/L), glutatona reduzida (1,5 mmol/L), l-metionina (1,5 mmol/L), ácido úrico (0,25 mmol/L), ácido l-ascórbico (0,5 mmol/L), α -tocoferol (2,0 mmol/L), β -caroteno (0,5 mmol/L) e carnitina (0,5 mmol/L) na solução de congelamento de sêmen de *O. mykiss*. Os autores concluíram que a taxa de motilidade e a duração da motilidade pós-descongelação aumentaram com a utilização de ácido úrico, l-metionina, SOD, α -tocoferol e L-glutatona reduzida, e que o ácido ascórbico melhorou o movimento espermático, aumentando a linearidade e retilinearidade das células espermáticas.

Já Ögretmen *et al.*, (2015), testaram o efeito da adição de cisteína em sêmen de carpa comum congelado. Os autores verificaram que um aumento na concentração de cisteína (20 mM) causou um aumento significativo na taxa de motilidade e duração da

motilidade do sêmen, concluindo que a suplementação com cisteína aumentou a fertilização e a taxa de eclosão e diminuiu os danos no DNA.

Aramli *et al.* (2016) avaliaram o efeito da glutamina na motilidade do sêmen pós-descongelamento e o sucesso de fertilização em *Acipenser persicus*. Os resultados revelaram que um aumento na concentração de glutamina provocou um aumento significativo na porcentagem de motilidade, velocidade curvilínea (VCL) e também sucesso de fertilização, sendo 10mM a melhor concentração para motilidade espermática e taxa de fertilização.

Em sêmen de esturjão (*Acipenser dabryanus*, *Acipenser sinensis* e *Acipenser baerii*), Li *et al.* (2017) avaliaram a suplementação com ácido ascórbico, catalase, glutathione ou cisteína na proteção contra EROS durante a criopreservação de espermatozoides. Os autores concluíram que a catalase, a glutathione e o ácido ascórbico, mas não a cisteína, mostraram efeitos protetores no sêmen de esturjão durante a criopreservação, recomendando a adição de 25 U/mL de catalase, 0,25-0,5 mg/mL de glutathione ou 0,5 mg/mL de ácido ascórbico na solução crioprotetora para sêmen de esturjão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção excessiva de EROS no sêmen leva à redução da viabilidade espermática e à diminuição da capacidade de fertilização. No entanto, a susceptibilidade ao estresse oxidativo varia entre as espécies de peixes. Assim, o impacto do estresse oxidativo depende da presença ou ausência de oxidantes no sêmen, além dos níveis destes antioxidantes. O balanço entre produção e eliminação de EROS é que determina os efeitos das espécies reativas do metabolismo do oxigênio no espermatozoide. A criopreservação do sêmen reduz a concentração de antioxidantes presentes e expõe ao oxigênio, levando a um aumento na produção de EROS e redução das defesas antioxidantes contribuindo para o aumento nos danos oxidativos ao espermatozoide.

A adição de antioxidantes à solução de congelamento tem proporcionado melhorias na viabilidade espermática, reduzindo os danos ao DNA espermático. Entretanto, o conhecimento sobre a presença e as concentrações de antioxidantes naturalmente encontrados no sêmen das diferentes espécies de peixes ainda é escasso, o que torna muito difícil a escolha dos antioxidantes a serem utilizados nas soluções de congelamento. Apesar dos resultados serem promissores, constata-se a necessidade de mais pesquisas nessa área, a fim de determinar as concentrações dos antioxidantes presentes no sêmen, além do tipo e concentração ideal dessas substâncias para minimizar os danos aos espermatozoides para cada espécie.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, v.29, n.4, p. 817-827, 2002.
- 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, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and development*, v.16, n.5, p.581-588, 2004.

AITKEN, R.J.; BENNETTS, L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: DE JONGE, C.J.; BARRATT, C.L.R. *The Sperm Cell: Production, maturation, fertilization, regeneration*. New York:Cambridge University Press, p.170-193, 2006.

AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; POUUCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Oocytes cryopreservation: state of art. *Reproductive toxicology*, v.22, n.2, p.250-262, 2006.

ARAMLI, M.S.; GOLSHAHI, K.; NAZARI, R.M.; GOLPOUR, A.; ARAMLI, S. Influence of Glutamine Supplementation on Motility and Fertilization Success of Frozen–Thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Sperm. *Reproduction in domestic animals*, v.51, n.4, p.474-477, 2016.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, n.7, p.869-880, 1999.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.89, n.1, p.65-75, 2005.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, v.216, n.1, p.47-54, 2004.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology*, v.56, n.4, p.577-589, 2001.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3, p.257-267, 2008.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, v.21, n.6, p.895-902, 2000.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1025-1033, 2002.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American journal of veterinary research*, v.66, n.5, p.772-779, 2005.

BAUST, J.G. The management of mammalian cells at low temperature. *Cell Preservation, Technology*, v.6, n.2, p.111-112, 2008.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular reproduction and development*, v.55, n.3, p.282-288, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent $H_2O_2^-$ mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, n.2, p.275-286, 2001.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1105-1122, 2002.

BRÉQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J.P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.66, n.3, p.314-323, 2003.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process [Corrigendum: 2008 June, v.77, issue 1, p.89.]. *Small ruminant research*, 2008.

BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAR, 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, n.1, p.13-17, 2009a.

BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; ULUTAS, P.A.; AKÇADA, H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.81, n.2, p.90-95, 2009b.

CABRITA, E.; MA S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M.T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal reproduction science*, v.125, n.1-4, p.189-195, 2011.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.1, p.33-40, 2011.

CAROLSFELD J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.472-481, 2003.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, v.52, p.982-988, 1995.

CIERESZKO A.; DABROWSKI, K.; KUCHARCZYK, D.; DOBOSZ, S.; GORYCZKO, K.; GLOGOWSKI, J. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.21, p.313-315, 1999.

ÇOYAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M.N.; AKALIN, P.P.; ATAMAN, M.B.; ÖMÜR, A.D.; GÜNGÖR, S.; KÜÇÜKGÜNAY, S.; ÖZKALP, B.; SARIÖZKAN, S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in veterinary science*, v.89, n.3, p.426-431, 2010.

CRUZAT, V.F.; PETRY, E.R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Revista Brasileira de medicina do Esporte*, v.15, n.5, p.392-397, 2009.

DE 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, n.2, p.217-227, 2007.

DE MERCADO, E.; HERNANDEZ, M.; SANZ, E.; RODRIGUEZ, A.; GOMEZ, E.; VAZQUEZ, J.M. MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.115, n.1, p.149-157, 2009.

DURU, N.K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v.74, n.6, p.1200-1207, 2000.

EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinária*, v.2, n.4, p.146-150, 2008.

GADEA, J.; GARCIA-VÁZQUEZ, F.; GUMBAO, D.; RODRÍGUEZ, F.A.; E MATÁS, C. Addition of reduced glutathione to freezing medium improved the sperm functionality of thawed boar spermatozoa. *Reproduction, fertility and development*, v.17, n.2, p.192-193, 2004.

GADEA, J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS, S.E.; GUMBAO, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology*, v.26, n.3, p.396-404. 2005.

HAGEDORN, M.; MCCARTHY, M.; CARTER, V.L.; MEYERS, S.A. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *PloS One*, v.7, n.6, p.39397, 2012.

JAIN, J.K.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v.86, n.4, p.1037-1046, 2006.

JOSHI, A.; BAG, S.; NAQVI, S.M.K.; SHARMA, R.C.; MITTAL, J.P. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Ruminant Research*, v.56, n.1, p.231-238, 2005.

KLEDMANEE, K.; TAWEEDET, S.; THAIJONGRUK, P.; CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K. Effect of L-cysteine on chilled carp (*Cyprinus carpio*) semen qualities. The Thai Journal of Veterinary Medicine, v.43, n.1, p.91-97, 2013.

KOPEIKA, J.; KOPEIKA, E.; ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; HOLT, W.V. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. Cryobiology, v.46, n.1, p.43-52, 2003.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. Reproduction, Fertility and Development, v.12, n.6, p.251-261, 2001.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology, v.42, n.1, p.21-27, 2001.

KUTLUYER, F.; KAYIM, M.; ÖĞRETMEN, F.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. Cryobiology, v.69, p.462-466, 2014.

LAHNSTEINER F. The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. Journal of Fish Biology, v.75, p.816-833, 2009.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. Aquaculture, v.307, p.130-140, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, C. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. Animal Reproduction Science, v.119, p.314-321, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; KUNZ, F.A. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Theriogenology, v.76, p.882-890, 2011.

LI, P.; XI, M.D.; DU, H.; QIAO, X.M.; LIU, Z.G.; WEI, Q.W. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoa function in three sturgeon species. Reproduction in Domestic Animals, v.53, n.2, p.287-295, 2017.

LINDEBERG, H.; KURTEN, A.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. Transboundary and Emerging Diseases, v.46, n.2, p.87-90, 1999.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. Reproductive Biology, v.5, n.1, p.5-17, 2005.

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.

MANSOUR, N.; MCNIVEN M.A.; RICHARDSON, G.F. The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Artic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, v.66, p.373-382, 2006.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1129-1136, 2012.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; SOARES, F.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v.66, p.333-338, 2013.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL, J.R.G.E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biology of reproduction*, v.78, n.1, p.2-12, 2008.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.112, n.1, p.119-135, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B.E.; KUTLUYER, F.; KAYIM, M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*, v.83, n.9, p.1548-1552, 2015.

PEGG, D.E. Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers. *Cryobiology*, v.44, n.1, p.46-53, 2002.

PEGG, D.E. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and Freeze-drying Protocols*, New Jersey: 2^a ed., Humana Press, p.39-57, 2007.

PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.33, n.1, p.5-9, 1998.

PEÑA, F.J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; MACIAS GARCIA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, n.2, p.345-349, 2009.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, v.25, n.2, p.224-233, 2004.

ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, M.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, v.25, n.3, p.397-405, 2004.

SAROSIEK, B.; DRYL, K.; KUCHARCZYK, D.; ŻARSKI, D.E.; KOWALSKI, R.K. Motility parameters of perch spermatozoa (*Perca fluviatilis* L.) during short-term storage with antioxidants addition. *Aquaculture international*, v.22, n.1, p.159-165, 2014.

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers 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.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.107, p.143-149, 2012.

SŁOWIŃSKA, M.; NYNCA, J.; CEJKO, B.I.; DIETRICH, M.A.; HORVÁTH, Á.; URBÁNYI, B.E.; CIERESZKO, A. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, v.400, p.101-104, 2013.

STEJSKAL, K.; SVOBODOVA, Z.; FABRIK, I.; ADAM, V.; BEKLOVA, M.; RODINA, M.; KIZEK, R. Content of cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of Acipenseriformes (*Acipenser baerii* and *A. ruthenus*) as well as teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). *Journal of Applied Ichthyology*, v.24, n.4, p.519-521, 2008.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.190-199, 2009.

TIRELLI, M.; BASINI, G.; GRASSELLI, F.; BIANCO, F.; TAMANINI, C. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. *Domestic Animal Endocrinology*, v.28, n.1, p.17-33, 2005.

TUNCER, P.B.; BUCAK, M.N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENI, D.; EKEN, A.; GÜNDOĞAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, v.61, n.3, p.303-307, 2010.

VAN OVERVELD, F.W.; HAENEN, G.R.; RHEMREV, J.; VERMEIDEN, J.P.; BAST, A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemical-Biological Interactions*, v.127, p.151-161, 2000.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35, p.137-150, 2009.

YAVAS, I.; BOZKURT, Y. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Biotechnology e Biotechnological Equipment*, v.25, n.1, p.2254-2257, 2011.

YILDIZ, C.; BOZKURT, Y.; YAVAS, I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, v.67, n.1, p.91-94, 2013.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS JR, A.J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertility and Sterility*, v.80, p.844-850, 2003.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.481-492, 2000.