



Antioxidantes e crioprotetores na criopreservação do sêmen de ovinos

Aminoácidos, colesterol, congelação, sêmen.

Wildelfrancys Lima de Souza^{1*}

Elenice Andrade Morais²

Ricardo Toniolli³

¹Doutorando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus do Itaperi, Fortaleza. *E-mail: wilde@zootecnista.com.br.

²Professora no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf).

³Professor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus do Itaperi, Fortaleza.

RESUMO

Embora os avanços em aumentar a capacidade fecundante dos espermatozoides pós-descongelação sejam notáveis, a utilização desse tipo de sêmen ainda é limitado, devido aos danos parcialmente irreversíveis aos espermatozoides durante a criopreservação, com consequente redução no potencial fecundante pós-descongelação em comparação com o potencial de espermatozoides a fresco ou resfriados. Esta variação é induzida pela membrana mudando o seu estado de fluida para o estado de gel em baixas temperaturas. O colesterol desempenha um papel importante como regulador da função da membrana celular, mantendo a sua fluidez e a sua permeabilidade, favorecendo a fase de transição da membrana, por meio da manutenção do estado fluido em baixas temperaturas, reduzindo assim, os danos na membrana espermática. Todavia, alguns aminoácidos podem proteger as células de mamíferos contra as crioinjúrias causadas na congelação/descongelação. Os aminoácidos com suas propriedades ajudam a proteger as células dos espermatozoides contra os danos estruturais durante o estresse térmico. No entanto, durante o processo de criopreservação, também ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que em quantidades elevadas, tornam-se prejudiciais para célula dos espermatozoides. Desta forma, a proteção adicional nas células espermáticas, constitui um desafio durante os protocolos de criopreservação, quando as células necessitam manter a função e a fluidez da membrana, além de combater o estresse oxidativo e, ao mesmo tempo, manter a habilidade de produção de EROs para execução de seus processos fisiológicos.

Palavras-chave: aminoácidos, colesterol, congelação, sêmen.

Vol. 15, Nº 01, Jan/Fev de 2018

ISSN: 1983-9006

www.nutritime.com.br

A Nutritime Revista Eletrônica é uma publicação bimestral da Nutritime Ltda. Com o objetivo de divulgar revisões de literatura, artigos técnicos e científicos bem como resultados de pesquisa nas áreas de Ciência Animal, através do endereço eletrônico: <http://www.nutritime.com.br>.

Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

ANTIOXIDANTS AND CRYOPROTECTANTS IN CRYOPRESERVATION OF RAM SPERM

ABSTRACT

Although advances in enhancing the post-thawing spermatozoa ability to perform post-thawing are remarkable, the use of semen is still commercially limited due to partially irreversible damage to spermatozoa during cryopreservation, with a consequent reduction in post-thawing fertilization potential compared to the potential of fresh or cooled sperm. This variation is induced by the membrane changing its state of fluid to the gel state at low temperatures. Cholesterol plays an important role as a regulator of membrane function, maintaining fluidity and permeability in the cell membrane, favoring the transition phase of the membrane, by maintaining the fluid state at low temperatures, thus reducing membrane damage Sperm. However some amino acids may protect mammalian cells from cryo-injury caused by freezing/thawing. Amino acids with their properties help protect sperm cells against structural damage during thermal stress. However, during the cryopreservation process, also occurs the production of reactive oxygen species (ROS), which in high amounts, become harmful to sperm cells. Thus, the additional protection in sperm cells, constitutes a challenge during cryopreservation protocols, when cells need to maintain membrane function and fluidity, in addition to combating oxidative stress and, at the same time, maintaining production ability of ROS for the execution of their physiological processes.

Keyword: amino acids, cholesterol, freezing, semen.



INTRODUÇÃO

Buscando melhorar a qualidade dos espermatozoides durante a criopreservação, vários estudos buscam a otimização da técnica de congelação de espermatozoides nas diferentes espécies, como em suínos (TONIOLLI et al., 2009), bovinos (TASDEMIR et al., 2013), caninos (MOTA FILHO et al., 2014), peixes (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014), equinos (SANTOS et al., 2015), ovinos (SOUZA et al., 2016a) e caprinos (SOUZA & MORAES, 2017).

Embora os avanços em aumentar a capacidade fecundante dos espermatozoides pós-descongelação sejam notáveis, a solução ideal para o uso do sêmen congelado na espécie ovina ainda não foi obtida nem se popularizou com resultados reproduzíveis (MORAES, 2003). Os baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen congelado podem ser melhorados com os avanços positivos alcançados na técnica de inseminação artificial e, principalmente, com as melhorias que ainda podem ser implementadas nos protocolos e diluidores de preservação de sêmen (CSEH et al., 2012).

Os baixos índices de fertilidade são atribuídos aos danos parcialmente irreversíveis aos espermatozoides durante a criopreservação, com consequente redução no potencial fecundante pós-descongelação em comparação com o potencial de espermatozoides a fresco ou resfriados (MAZUR, 1984). Esses danos na estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides ocorrem quando são resfriados (MORAES et al., 2015; SOUZA et al., 2016b), e podem ser parcialmente responsáveis pela diminuição da capacidade fecundante dos espermatozoides (WATSON, 2000), uma vez que o processo de resfriamento induz rearranjos de lipídios e de proteínas dentro das membranas das células quando elas são arrefecidas (MOCÉ et al., 2010). Esta variação é induzida pela membrana mudando o seu estado de fluido para o estado de gel em baixas temperaturas (LEE et al., 2015).

O colesterol, principal constituinte estrutural da membrana plasmática, desempenha um papel importante como regulador da função da membrana (YEAGLE, 1985). Além disso, o colesterol tem de-

monstrado ser importante em manter a fluidez (HARTEL et al., 1998) e a permeabilidade (McGRATH, 1988) na membrana da célula, favorecendo a fase de transição da membrana, por meio da manutenção do estado fluido em baixas temperaturas, reduzindo assim, os danos na membrana espermática (AMANN & PICKETT, 1987).

Todavia, estudos tem relatado que além do colesterol, alguns aminoácidos podem proteger as células de mamíferos contra as crioinjúrias causadas na congelação/descongelação (LALONDE et al., 1991). Os aminoácidos com suas propriedades ajudam a proteger as células dos espermatozoides contra os danos estruturais durante o estresse térmico (SANGEETA et al., 2015).

No entanto, durante o processo de criopreservação, também ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e essas, em pequenas quantidades, exercem efeito fisiológico, por exemplo, medeiam funções como capacitação espermática, hiperativação, reação acrossomal e fusão dos pronúcleos do espermatozoide e oócito. Contudo, em quantidades elevadas, as EROs tornam-se prejudiciais para célula dos espermatozoides (AITKEN, 1997). Os danos provocados pelo estresse oxidativo, resulta na diminuição da motilidade espermática, alterações na membrana plasmática (GRIVEAU & LELANNOU, 1997), indução de danos ao DNA no núcleo da célula espermática, esgotamento da adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias, além da redução da viabilidade e da capacidade fecundante (AITKEN & MARSHALL, 2002).

Assim, a inibição dos danos que as EROs causam aos espermatozoides, especialmente, pode elevar a viabilidade dessa célula após o processo de criopreservação (SOUZA et al., 2016a). Desse modo, estudos realizados anteriormente com diferentes espécies de animais, provaram que a adição de antioxidantes no sêmen antes da congelação/descongelação, minimiza os efeitos deletérios do estresse oxidativo e, conseqüentemente, melhora a qualidade espermática após a criopreservação (GADEA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; SOUZA et al., 2016a; SOUZA et al., 2017).



Desta forma, a proteção adicional nas células espermáticas, constitui um desafio durante a maturação e o armazenamento, quando as células necessitam manter a função e a fluidez da membrana, além de combater o estresse oxidativo e, ao mesmo tempo, manter a habilidade de produção de EROs para execução de seus processos fisiológicos (REJRAJI et al., 2006).

Diante disso, existe um grande interesse no desenvolvimento de pesquisas com antioxidantes juntamente com os crioprotetores (colesterol e aminoácidos), buscando prevenir os espermatozoides da oxidação, e aumentar a sua capacidade fecundante após o protocolo de criopreservação.

REVISÃO DE LITERATURA

Membrana Plasmática

Sendo uma estrutura determinante na arquitetura do sistema biológico, a membrana celular é o elemento estrutural básico para manutenção dos fluidos intracelulares (JEYENDRAN et al., 1984). A membrana plasmática circunda todas as células (eucariontes ou procariontes) e define assim, sua delimitação, separando o conteúdo do meio que a circunda. A membrana plasmática também atua como barreira seletiva, determinando a composição do citoplasma celular (COOPER, 1996), e tem papel fundamental em grande parte dos fenômenos celulares (SINGER & NICOLSON, 1972).

A membrana plasmática é formada por fosfolípidios e esteróis, além de proteínas periféricas e integrais incrustadas na bicamada ou associadas a ela. As regiões apolares das moléculas dos lipídeos são orientadas para o centro da bicamada, e os grupos polares para a região extracelular ou em contato com o citoplasma (ANDRADE, 2009).

Os fosfolípidios, que possuem, em sua maioria, cadeias de ácidos graxos poliinsaturadas, ao serem submetidos à redução de temperatura assumem uma forma cônica, onde as extremidades hidrofóbicas são internas e as hidrofílicas externas, formando assim, uma estrutura denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana encontra-se em baixas temperaturas, a bicamada lipídica entra na fase cristalina, e quando

a temperatura aumenta, ela transita através de uma fase de gel para uma fase cristalina líquida. Dessa forma, a formação da micela invertida é transitória nos fosfolípidios, entretanto, para alguns fosfolípidios esta estrutura persiste, tendo como consequência, o aumento da permeabilidade na membrana plasmática, além da formação de canais que possibilitam a entrada de íons e pequenas moléculas que desestabilizam a membrana, causando assim, danos irreversíveis como reação acrossômica precoce e perda de viabilidade (AMANN & PICKET, 1987; PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

As modificações na membrana plasmática podem variar desde alterações na permeabilidade, mudança na organização, fluidez, e composição lipídica da bicamada à total ruptura de membrana (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Alterações na integridade da membrana plasmática estão associadas com a redução da capacidade fecundante dos espermatozoides após o processo de criopreservação (THOMAS et al., 2006). Com isso, o baixo potencial fecundante dos espermatozoides descongelados é atribuído, em grande parte, às alterações sofridas na estrutura das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial durante as etapas de refrigeração, congelamento e descongelamento (PARKS & GRAHAM, 1992).

Portanto, a membrana plasmática desempenha um papel importante para que os espermatozoides mantenham a capacidade fecundante, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, de trânsito até o armazenamento no epidídimo, na ejaculação, e no depósito no trato genital feminino e, finalmente, na capacitação e penetração no oócito (HOLT, 1995; WATSON, 1995; LENZI et al., 1996). Por isso a membrana plasmática deve apresentar-se íntegra, tanto física como funcionalmente, para que assim, a célula espermática tenha viabilidade e capacidade fecundante (PARKS & GRAHAM, 1992; KUMI-DIAKA, 1993). Desta forma, maiores estudos são necessários sobre conhecimentos biofísicos desta estrutura celular, visando propor soluções para aumentar a sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação (HOLT, 2000).

Função do colesterol na membrana espermática

O colesterol tem grande importância na célula



espermática, desde a proteção da integridade das membranas até o processo de capacitação espermática (CROSS, 1998). A produção do colesterol começa cedo na formação da célula espermática, onde primariamente, ocorre a expressão de genes colesterogênicos nas células germinativas dos machos (TERUYA et al., 1991; STROMSTEDT et al., 1998). Estudos sugerem que sua síntese se inicia em espermatócitos na fase de paquíteno e espermatídes redondas (POTTER et al., 1981).

As mudanças que ocorrem durante o processo de capacitação são extremamente dependentes do rearranjo do colesterol na membrana plasmática (CROSS, 1998). Uma das hipóteses aceitáveis é que o colesterol excretado pelas células do epidídimo contribui para a maturação dos espermatozoides em trânsito (SAEZ et al., 2011). Durante o transporte pelo epidídimo, o conteúdo de colesterol na membrana plasmática diminui aproximadamente 50%, em ovinos (PARKS & HAMMERSTEDT, 1985), hamsters (AWANO et al., 1993) e murinos (REJRAJI et al., 2006), porém, em algumas espécies o teor de colesterol aumenta durante a maturação dos espermatozoides, como nos caprinos (RANA et al., 1991), ou permanece inalterado, como nos suínos (NIKOLOPOULOU et al., 1985).

O colesterol é um potente decapacitante que serve para estabilizar a membrana plasmática do espermatozoide durante o trânsito do epidídimo e evitar as interações intermoleculares responsáveis para alcançar um estado capacitado (DAVIS, 1980). A perda de colesterol aumenta a fluidez da membrana plasmática, como é visto em espermatozoides humanos (HAIDL & OPPER, 1997), o que é necessário para os passos finais da maturação do espermatozoide no trato reprodutivo feminino. Contudo, essa remoção do colesterol está restrita à fração da membrana.

Apesar da importância da remoção do colesterol da membrana plasmática para o processo de capacitação ter sido extensamente estudada, pode ser que a fase de separação dos fosfolípidos de membrana e colesterol (migração lateral destas moléculas dentro da bicamada lipídica para formar os

domínios), e não a remoção completamente do colesterol da membrana, seja mais importante para a capacitação. Há relatos que a fluidez dos lipídeos da cabeça dos espermatozoides e da cauda da membrana plasmática altere-se como resultado da capacitação, sendo a movimentação do colesterol responsável em parte por tais mudanças (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE & GADELLA, 2000).

Espermatozoides de espécies como humanos, leporinos e primatas tem menor sensibilidade ao choque térmico durante o processo de congelação, acredita-se que essa maior resistência suceda de uma maior quantidade na proporção colesterol/fosfolípidos e uma maior quantidade de ácidos graxos saturados em suas membranas, quando comparados com espécies mais suscetíveis como bovinos, ovinos e suínos (LADBROOK & CHAPMAN, 1969; WATSON, 1981; HOLT & NORTH, 1991).

Espécies reativas de oxigênio

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produz EROs, sendo a membrana mitocondrial o local de maior formação intracelular, mas a maior parte delas são originadas do metabolismo normal da célula (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al., 2009).

As EROs são moléculas e radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) altamente reativas, que possuem um elétron desemparelhado (STRYER, 1996) e, que ao serem produzidas de forma excessiva (desequilíbrio entre a produção e eliminação) (ALVAREZ et al., 1987), ocorre a indução a danos nos fosfolípidos da membrana plasmática e no DNA dos espermatozoides, sendo correlacionados com a infertilidade (OLLERO et al., 2001).

Estas EROs resultantes do metabolismo celular desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, que em cavalos, touros, carneiros e homens, as altas concentrações de EROs levam à redução do metabolismo energético, da motilidade e da viabilidade, e a ruptura da membrana plasmática dos espermatozoides (ARMSTRONG et al., 1999; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002;



SOUZA et al., 2016a), além de causar danos ao acrossoma e ao potencial de atividade da membrana mitocondrial (BAUMBER et al., 2003), sendo exemplo de danos oxidativos às membranas celulares, lipoproteínas e outras estruturas que contêm componentes lipídicos, além de acompanhar diversos processos degenerativos (GIROTTI, 1998).

Todavia, nos protocolos de criopreservação do sêmen ovino, ocorre uma elevação dos níveis de EROs em virtude da diluição do sêmen, ocasionado pela redução da qualidade e quantidade de antioxidantes contido no sêmen durante a congelação (BILODEAU et al., 2001). Esse aumento na produção de EROs provavelmente ocorre devido a danos nas mitocôndrias, fonte principal de produção de EROs (PEÑA et al., 2009). Assim, as EROs geradas pelas mitocôndrias provocam a liberação de proteínas pré-apoptóticas, como a citocromo c, que são indispensáveis na cadeia respiratória mitocondrial, atuando como transportador de elétrons, mas quando níveis de EROs aumentam, a citocromo c atua como ativador da morte celular (MISHRA & SHANA, 2005).

Além da diluição do sêmen, durante o protocolo de criopreservação ocorre estresse associado às diferenças de temperatura as quais as células espermáticas são submetidas, além de sofrer com os efeitos adversos dos componentes do meio diluente e com os efeitos muitas vezes tóxicos dos crioprotetores utilizados durante o processamento do sêmen, assim como os efeitos da descongelação (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Além disso, os espermatozoides danificados pelo processo de congelação-descongelação geram uma maior quantidade de EROs do que os espermatozoides morfológicamente normais (BALL & VO, 2001).

Os espermatozoides são suscetíveis às crioinjúrias o que pode ser atribuído, em parte, à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana plasmática (WHITE, 1993) o que o torna mais propenso à peroxidação lipídica na presença das EROs. As EROs podem causar danos severos aos espermatozoides, quando os seus mecanismos de defesa encontram-se reduzidos, no entanto, o impacto do estresse oxidativo durante o processo de criopreservação pode ser minimizado por meio da adição de agentes antioxidantes nos meios

diluentes, garantindo maior proteção e qualidade dos espermatozoides pós-descongelação (SOUZA et al., 2016a). Além do que, as EROs são necessárias em processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica, permitindo que o espermatozoide penetre na zona pelúcida para realizar a fecundação (DE LAMIRANDE et al., 1998; O'FLAHERTY et al., 1999).

Antioxidantes

Após o processo de criopreservação dos espermatozoides, ocorre a redução da motilidade, integridade acrossomal, viabilidade espermática e potencial fecundante em função da peroxidação lipídica desencadeada pelas EROs, tendo em vista que o espermatozoide dos mamíferos possui altos níveis de fosfolipídeos e ácidos graxos saturados e poliinsaturados (BALL, 2008).

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias que retardam a velocidade da oxidação inibindo a produção ou os efeitos deletérios dos radicais livres (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006), são capazes de converter as EROs em água, com a finalidade de prevenir a sua superprodução (AGARWAL et al., 2005).

Os agentes antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: enzimático e não enzimático (SIES & STAHL, 1995). Os espermatozoides das espécies animais possuem um sistema intracelular que consiste, principalmente, das enzimas SOD, GSH-Px, GSH-Red e catalase (CAT), bem como os antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol ou vitamina E (AITKEN et al., 1995).

Os antioxidantes agem de diferentes formas na proteção do organismo: 1) atuam impedindo a formação de EROs; 2) interceptam as EROs produzidas pelo metabolismo celular ou fontes exógenas, impedindo que ataquem os lipídeos, aminoácidos, as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases de DNA; 3) reparam lesões, processo relacionado à remoção de danos ao DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Atividade antioxidante na célula espermática



A defesa antioxidante primária que protege os espermatozoides da ação das EROs e da peroxidação lipídica é de origem citoplasmática. No entanto, as células espermáticas descartam grande parte de seu citoplasma durante o processo de diferenciação, perdendo junto, grande quantidade de antioxidante. Isso faz com que essas células sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo (AITKEN & FISHER, 1994).

As células espermáticas de mamíferos sendo ricas em ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana plasmática e deficientes em antioxidantes citoplasmáticos são naturalmente mais susceptíveis a peroxidação lipídica. Essas características conferem a redução da integridade de suas membranas, diminuição funcional, perda de integridade genômica e de motilidade (BUCAK et al., 2007). Em contrapartida, para suprir a escassez de antioxidante celular e proteger contra os efeitos das EROs, o plasma seminal possui sistemas antioxidantes que desenvolvem papel importante na manutenção espermática (AITKEN & BAKER, 2002).

Os antioxidantes que estão presentes no plasma seminal protegem os espermatozoides dos danos oxidativos, no entanto, a diluição seminal, adotada durante o processamento do sêmen de ovinos, promove a redução desta capacidade protetora dos antioxidantes do plasma, devido o desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade antioxidante, a partir da marcante redução de suas concentrações após diluição, quanto pelo o aumento na produção de EROs, durante a criopreservação (WATSON, 2000). Tal desequilíbrio, favorecendo os oxidantes, promove efeitos tóxicos e o comprometimento funcional da célula espermática, o que conduz, frequentemente, à morte celular e redução do potencial fecundante dos espermatozoides (PURDY, 2006).

Além disso, durante o processamento do sêmen também pode haver a contaminação nos meios de diluição seminal com íons de metais de transição, como o Cu^+ ou Fe^{++} , que desencadeiam as reações químicas que geram EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Uso de antioxidantes no diluente

Ao longo dos últimos anos, vários pesquisadores buscam a melhoria da qualidade do sêmen após a

criopreservação seja por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo, através da adição de antioxidantes nos diluentes seminais em diversas espécies, como é o caso da ovina (KHERADMAND et al., 2006; SOUZA et al., 2016a; SOUZA et al., 2017). Com destaque entre os antioxidantes já estudados com este fim a hipotaurina (LOPES et al., 1998), o resveratrol (SARLÓS et al., 2002), a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH-Red) (MARTÍ et al., 2008), a melatonina (SOUZA et al., 2016a), e a associação entre ácido ascórbico, trolox e a melatonina (SOUZA et al., 2017).

Neste contexto, foi observado que a ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozoides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática, onde posteriormente se decompõem para formar o malondialdeído (MDA) (JANERO, 1990), e que os antioxidantes exógenos favorecem a redução das concentrações de MDA no sêmen em decorrência da diminuição da peroxidação lipídica e, em virtude disto, a célula espermática sofre menos danos, obtendo assim, uma melhor conservação dos espermatozoides (SARLÓS et al., 2002). Contudo, apesar dos antioxidantes minimizarem os níveis de peroxidação dos fosfolípidos endógenos na membrana dos espermatozoides, a terapia com os antioxidantes pode resultar em efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada, devendo o seu uso ser administrado com moderação, até mesmo pelo fato que podem inibir a produção das EROs que exercem as funções fisiológicas (CARVALHO et al., 2002).

Assim, a inclusão de antioxidantes no diluente seminal para criopreservação, em pequenas concentrações, pode melhorar a qualidade dos parâmetros espermáticos após as etapas de congelação-descongelação (SOUZA & MORAES, 2016).

Ação crioprotetora dos aminoácidos

Os aminoácidos não são apenas blocos naturais de construção das proteínas e peptídeos, são também moléculas carregadas, que interagem eletrostaticamente com os grupos fosfato dos fosfolípidos da membrana plasmática do espermatozoide, formando assim uma camada sobre a superfície da célula, protegendo-a contra choques



térmicos (EL-SHESHTAWY et al., 2008).

A descoberta do papel biológico dos aminoácidos na prevenção de danos à célula durante o estresse térmico surgiu a partir de observações em plantas que são capazes de acumular o aminoácido prolina em resposta à temperatura fria (CHU et al., 1974) e, também tem sido relatado que alguns aminoácidos protegem diversos tipos de células animais contra o estresse oxidativo durante a redução de temperatura, incluindo a célula espermática (KRUUV & GLOFCHESKI, 1992; ALI AL AHMAD et al., 2008), contribuindo para que os espermatozoides mantenham a integridade da membrana acrossomal, durante o processo de criopreservação (FAGUNDES, 2008).

Alguns aminoácidos, como a glutamina e a glicina, são formados em quantidade substancial de glicose dentro dos túbulos seminíferos (BUSTAMANTE & SETCHELL, 2000). O fluido da rete testis tem 17 vezes mais aminoácidos do que o fluido dos túbulos seminíferos, sendo que o glutamato contribui com 90% dos aminoácidos totais no fluido epididimal (HINTON, 1990).

Vários aminoácidos (glutamina, glicina, prolina e histidina) foram detectados no plasma seminal e utilizado com sucesso como agentes crioprotetores não penetrantes na criopreservação de espermatozoides de muitas espécies de mamíferos, incluindo a de caprino, ovino e equino (KUNDU et al., 2001; KHLIFAUI et al., 2005; ALI AL AHMAD et al., 2008), e como exemplo dos aminoácidos estudados têm a prolina (PEÑA et al., 1998), betaína (LINDEBERG et al., 1999), cisteína (EL-SHESHTAWY et al., 2008), glutamina (MERCADO et al., 2009), metionina (ÇOYAN et al., 2010), alanina e glicina (FAGUNDES et al., 2010).

A capacidade dos aminoácidos em melhorar a criosobrevivência dos espermatozoides tem sido relacionada com suas propriedades metabólicas, crioprotetoras, oxidantes ou osmorregulativas (MARTINS-BESSA et al., 2007). Uma vez que os aminoácidos não podem penetrar a membrana do espermatozoide, então, mecanismos osmóticos podem explicar, em parte, a sua ação (TRIMECHE et al., 1999).

Com destaque entre os aminoácidos já estudados a glutamina, que demonstrou melhorar a motilidade dos espermatozoides de humanos e equinos (RENARD et al., 1996; KHLIFAUI et al., 2005). A prolina, melhorando a viabilidade e a motilidade espermática, além de preservar a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática durante a congelação-descongelação, inibindo assim a formação de gelo intracelular (HEBER et al., 1971; CROWE & CROWE, 1986; SCANCHEZ-PARTIDATA et al., 1998), além de proteger a célula espermática do dano induzido pelas EROs, uma vez que a prolina, atua como antioxidante, tendo a capacidade de reduzir a peroxidação lipídica (SMIRNOFF & CUMBES, 1989).

Os antioxidantes juntamente com a ação da molécula do colesterol somados as propriedades antioxidantes dos aminoácidos podem ajudar a proteger os espermatozoides de ovinos contra o choque térmico durante o processo de criopreservação (Tabela 1), no entanto, apesar de ter sido verificado o efeito crioprotetor sobre espermatozoides em diversas espécies, os mecanismos de crioproteção espermática conferidos pelos aminoácidos, assim como a função de aminoácidos livres na fisiologia do espermatozoide, ainda não foram totalmente esclarecidos (FAGUNDES et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse âmbito, mesmo diante das vantagens da criopreservação e das décadas de pesquisa, a continuidade dos estudos voltados à criopreservação espermática é de grande relevância para o entendimento das características básicas dessas células. As modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucidam possíveis lesões e diminuição da capacidade fecundante deste gameta e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a inclusão de moléculas que elevem as taxas de fecundidade do sêmen, sem a necessidade de modificação dos protocolos convencionais de criopreservação, sendo um atrativo a mais para a difusão desta tecnologia nas centrais de inseminação.

Dessa forma, esses danos na membrana plasmática podem ser minimizados pela combinação da adição



de antioxidantes e aminoácidos ao diluente de congelação com a incorporação do colesterol carreado com a ciclodextrina na membrana espermática, apresentando-se como método promissor para elevar a resistência dos espermatozoides às variações de temperatura, aumentando a viabilidade, as taxas de sobrevivência, a longevidade e a qualidade dos parâmetros espermáticos do sêmen após o processo de criopreservação.

Evidências com a utilização do colesterol sobre a modificação da fluidez de membrana e a possibilidade de melhoria nas taxas de capacitação de espermatozoides descongelados são indícios de que a técnica pode ser aperfeiçoada para alcançar maior efetividade. Pesquisas devem ser realizadas no intuito de verificar a ação da molécula do colesterol juntamente com antioxidantes e aminoácidos, determinando as concentrações a serem adicionadas ao diluente a fim de beneficiar ainda mais os resultados observados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, visando à obtenção da combinação ideal para proteção da membrana espermática contra os efeitos deletérios ocasionados pela criopreservação, sem, entretanto, prejudicar os processos de capacitação espermática e reação acrossomal necessários para a fecundação.

TABELA 1. Efeitos benéficos sobre os espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes antioxidantes e crioprotetores ao diluente de congelação

Antioxidantes/Crioprotetores	Efeitos	Referência
Trealose/Taurina/ Cisteamina/ Hialuronano	Melhora a motilidade progressiva, a membrana plasmática e a integridade do acrossoma.	<i>Bucak et al., 2007</i>
Metionina	Melhora a motilidade dos espermatozoides.	<i>Çoyan et al., 2010</i>
Glutathione redutase/Troxol	Protege os espermatozoides durante a criopreservação.	<i>Mata-Campuzano et al., 2015</i>
Solução de aminoácidos não essenciais	Melhora a qualidade do sêmen e reduz as crioinjúrias.	<i>Badr et al., 2015</i>
L-alanina/ L-glutamina/L-prolina	Reduz as crioinjúrias e melhorou as características do sêmen pós-descongelação.	<i>Sangeeta et al., 2015</i>
Melatonina	Reduz as crioinjúrias e o estresse oxidativo.	<i>Souza et al., 2016</i>
Ácido Ascórbico/ Trolox/Melatonina	Protege das crioinjúrias, melhora o potencial fecundante <i>in vitro</i> após a criopreservação.	<i>Souza et al., 2017</i>
Colesterol carreado com ciclodextrina	Aumenta a tolerância ao choque térmico e ao estresse osmótico, melhorando a criopreservação.	<i>Salmon et al., 2017</i>
Trealose/Cisteína	Mantém os parâmetros espermáticos durante a criopreservação.	<i>Gungor et al., 2017</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **J. Androl.**, v.26, p.654-660, 2005.
- AITKEN, R.J.; BARKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **Int. J. Androl.**, v.25, p.191-194, 2002.
- AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, p.259-267, 1994.
- AITKEN R.J.; MARSHALL G.J. Human spermatozoa: The future of sex. **Nature**, p.415:963, 2002.
- AITKEN R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function, **Mol. Hum. Reprod.**, v.3, p.169-173, 1997.
- AITKEN, R.J.; PATTERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **J. Cell Sci.**, v.108, p.2017-2025, 1995.
- ALI AL AHMAD, M., CHATAGNON, G., AMIRAT-BRIAND, L., MOUSSA, M., TAINURIER, D., ANTON, M., FIENI, F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. **Reprod. Domest. Anim.**, 43, 429-436, 2008.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as



- major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J. Androl.**, v.8, n.5, p.338-348, 1987.
- AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, 7,145–173, 1987.
- ANDRADE, A.F.C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozoides criopreservados de eqüinos. 2009.** 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, p.869-880, 1999.
- AWANO, M.; KAWAGUCHI, A.; MOHRI, H. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.99, p.375-383, 1993.
- BADR, M.R.; RAWASH, Z.M.; GHADA, H.ABD EL RAHMAN; ASSI, M.M.; HASAN, H.M. Effect of amino acids on ram sperm freezability, biochemical ultrastructure changes and fertilizing potentials. **Assiut Vet. Med. J.**, v.61, n.146, 2015.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, v.22, n.6, p.1061-1069, 2001.
- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Anim. Reprod. Sci.**, v.107, n.3, p.257-267, 2008.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.1239-1247, 2003.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v.12, p.123-130, 1999.
- BILODEAU, J.; BLANCHETTE, F.S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, 256, 275–86, 2001.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, 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, p.1105-1122, 2002.
- BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.
- BUSTAMANTE, C.L.; SETCHELL, B.P. The uptake of amino acids, in particular Leucine, by isolated perfused testes of rats. **J. Androl.**, v.21, p.452-463, 2000.
- CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.38, n.1, p.33-38, 2002.
- CHU, T.M.; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. Stress metabolism: Part 6. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. **Aust. J. Plant. Physiol.**, v.1, p.87-97, 1974.
- COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach.** Washington: ASM Press, 1996. 673p.
- 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. **Res. Vet. Sci.**, v.89, p.426-431, 2010.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v.59, p.7-11, 1998.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.H. **Stabilization of membranes anhydrobiotic organism.** In: Leopold, A.C. (Ed.), Membranes, Metabolism and Dry Organisms. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London, pp.188–209, 1986.
- CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health



- management of small ruminants. **Ani. Reprod. Sci.**, v.130, p.187-192, 2012.
- DAVIS, B.K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Arch. Androl.**, v.5, p.249-254, 1980.
- DE LAMIRANDE, E.; TASI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultra filtrates. **J. Androl.**, v.19, p.585-594, 1998.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema-caroteno/ácido linoléico e métodos de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S. Use of selects aminoacids to improve buffalo bull semen cryopreservation. **Glob. Vet.**, v.2, p.146-150, 2008.
- FAGUNDES, B. Adição de aminoácidos e insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **J. Bras. Cienc. Anim.**, v.1, n.1, 2008.
- FAGUNDES, B.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; CUNHA, I.C.N. DA; SOUZA, G.V, DE; TILBURG, M.F. VAN. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Rev. Bras. Zoot.**, v.39, n.2, p.279-284, 2010.
- FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.
- GADEA, J.; GUMBAO, D.; CANOVAS, S.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; GRULLON, L.A.; GARDON, J.C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v.31, p.40-49, 2008.
- GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J. Lipid Res.**, v.39, p.1529-1542, 1998.
- GRIVEAU, J.F.; LELANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. **Int. J. Androl.**, v.20, p.195-200, 1997.
- GUNGOR, S.; OZTURK, C.; OMUR, A.D. Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. **Vet. Med.**, v. 62, n.05, p. 245–252, 2017.
- GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.D.L.; CARVAJAL, S.U.; ORTEGA, M.E.T. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. **Cryobiology**, v.58, p.287–292, 2009.
- HAYDL, G.; OPPER, C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. **Hum. Reprod.**, v.12, p. 2720-2723, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 936p. 1999.
- HARTEL, S.; DIEHL, H.A.; OJEDA, F. Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. **Anal. Biochem.**, v.258, p.277-284, 1998.
- HEBER, U.; TYANKOVA, I.; SANTARIUS, K.A. Stabilization and inactivation of biological membranes during in the presence of amino acids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.241, p.578, 1971.
- HINTON, B.T. The testicular and epididymal luminal amino acids microenvironment in the rat. **J. Androl.**, v.11, p.498-505, 1990.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000.
- HOLT, W.V. **The sperm plasma membrane**. In: International Symposium on Human Sperm Acrosome Reaction, Physiological and Pharmacological Induction and Transduction Pathways, 1995, Collioure, France. Proceedings... Collioure, France: International Society of Andrology, 1995.
- HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.91, p.451-461, 1991.
- JANERO, D.J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and



- peroxidative injury. *Free Radic Biol Med.*, v.9, p.515-540, 1990.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PALAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, v.70, p.219-225, 1984.
- KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. *Iran. J. Vet. Res.*, v.7, n.4, p.40-45, 2006.
- KHLIFAOU, M.; BATTUT, I.B.; BRUYAS, J.F.; CHATAGNON, G.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, v.63, p.138-149, 2005.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J. Protective effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology*, v.29, p.291-295, 1992.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39, p.1279-1289, 1993.
- 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, p.21-27, 2001.
- LADBROOK, B.; CHAPMAN, D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. *Chem. Phys. Lipids*, v.3, p.304, 1969.
- LALONDE, R.J.; LEPOCK, J.R.; KRUUV, J. Site of freeze-thaw damage and cryoprotection by amino acids of the calcium ATPase sacroplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1079, p.128-38, 1991.
- LEE, Y.S.; LEE, S.; LEE, S.H.; YANG, B.K.; PARK, C.K. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.159, p.124-30, 2015.
- LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum. Reprod. Update*, v.2, p.246-256, 1996.
- LINDEBERG, H.; KURTEN, A.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. *J. Vet. Med. Serie A*, v. 46, p. 87-90, 1999.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.13, n.4, p.896-900, 1998.
- MARTÍ, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.*, v.29, n.4, p.459-467, 2008.
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology*, v.68, p.1088-1096, 2007.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, L.; de PAZ, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, v.83, n.4, p.520-8, 2015
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanism and implications. *Am. J. Physiol.*, v.247, p.125-142, 1984.
- McGRATH, J.J. **Membrane transport properties, in Low temperature biotechnology:** Emerging applications and engineering contributions, McGrath, J.J.. and Diller, K.R., Eds., American Society of Mechanical Engineers, New York, p.273–330, 1988.
- MERCADO, E.D.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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.115, p.149-157, 2009.



- MISHRA, D.P.; SHAHA, C. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.6181-6196, 2005.
- MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: presente moment and perspectives to future. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, n.1 2, p.57-66, 2010.
- MONTEIRO, J.C.; GONCALVES, J.S.; RODRIGUES, J.A.; LUCIO, C.F.; SILVA, L.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.; VANNUCCI, C.I. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reprod. Domest. Anim.**, v.44, p.359-362, 2009.
- MORAES, J.C.F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Ani.**, v.27, n.4, p.613-619, 2003.
- MORAES, E.A.; MATOS, W.C.G.; GRAHAM, J.K.; FERRARI JUNIOR, W.D. Cholesterol-loaded-cyclodextrin improve the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.**, p.19-24, 2015.
- MOTA FILHO, A.C.; SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; SOUZA, M.B.; FREITAS, L.A.; ARAÚJO, A.A.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. **Cryobiology**, p.17-21, 2014.
- NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D.A.; VARY, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.815, p.486-498, 1985.
- OLLERO, M.; GIL-GUZMÁN, E.; LÓPEZ, M.C.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVERSON, D. THOMAS, A.J.Jr.; ALVAREZ, J.G.. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Hum. Reprod.**, v.16, p.1912-1921, 2001.
- O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirement for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v.52, p.289-301, 1999.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biol. Reprod.**, v.32, p.653-668, 1985.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Proline and Glycine Betaine in a Diluent for Freezing Canine Spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.**, v.33, p. 5-9, 1998.
- PEÑA, F. J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA., J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; MACIAS GARCIA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reprod. Domest. Anim.**, v.44, p.345-349, 2009.
- POTTER, J.E.R.; MILLETTE, C.F.; JAMES, M.J.; KANDUTSCH, A.A. Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. **J. Biol. Chem.**, v.256, p.7150-7154, 1981.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin. Res.**, v.63, p.215-225, 2006.
- RANA, A.P.; MAJUMDER, G.C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1061, p.185-196, 1991.
- REJRAJI, H.; SION, B.; PRENSIER, G.; CARRERAS, M.; MOTTA, C.; FRENOUX, J.M.; VERICEL, E.; GRIZARD, G.; VERNET, P.; DREVET, J.R. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. **Biol. Reprod.**, v.74, p. 1104-1113, 2006.
- RENARD, P.; GRIZARD, G.G.; SION, J.F.; BOUCHER, B.; LANNOU, D.D.L. Improvement of motility and fertilization potential of post thaw human sperm using glutamine. **Cryobiology**, v.33, p.311-319, 1996.
- SAEZ, F.; OUVRIER, A.; DREVET, J.R. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. **Asian J. Androl.**, v.13, p.11-17, 2011.
- SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; PINHEIRO, J.P.S.; ALMEIDA, P.S.; LOPES, J.T.; LEITE, L.V. Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish. **Acta Vet. Bras.**, v.8, p.343-350, 2014.



- SALMON, V.M.; CASTONGUAY, F.; DEMERS-CARON, V.; LECLERC, P.; BAILEY, J.L. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. **Anim Reprod Sci.**, v.177, p.1-11, 2017.
- SANGEETA, S.; ARANGASAMY, A.; KULKARNI, S.; SELVARAJU, S. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.161, p.82-88, 2015.
- SANTOS, M.A.M.; GRADELA, A.; MORAES, E.A.; SOUZA, W.L.; ALVES, N.G.; COSTA, J.M.S.; MATOS, W.C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.35, p.925-932, 2015.
- SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Vet. Hung.**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- SCANCHEZ-PARTIDATA, L.G.; MAXWELL, W.M.C.; SETCHELL, B.P. Effect of compatible solutes and diluents composition on the post-thaw motility of ram sperm. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.10, p.347-357, 1998.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.
- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v.28, p.1057-1060, 1989.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E. A. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. **Rev. Eletron. Nutritime.**, v.13, p.4831-4839, 2016.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.. Dimetilformamida adicionada no sêmen de caprinos e seu efeito sobre a longevidade e funcionalidade da membrana espermática após criopreservação. **Semiário de Visu**, v.5, p.11-20, 2017.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; SOUSA, P.H.F.; LOPES JUNIOR, E.S.; OLIVEIRA, R.P.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.36, n.7, p.657-664, 2016a.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrin in fresh goat sperm improves cryosurvival rates. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, v.23, p.93-98, 2016b.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.37, p.471-478, 2017.
- STROMSTEDT, M.; WATERMAN, M.R.; HAUGEN, T.B.; TASKEN, K.; PARVINEN, M.; ROZMAN, D. Elevated expression of lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats. **Endocrinology**, v.139, p.3771-3771, 1998.
- STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996. 408p.
- TAŞDEMİR, U.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P.B.; COŞKUN, E.; ÖZGÜRTAŞ, T.; AYDIN, F.N.; BÜYÜKLEBLEBICI, O.; GÜRCAN, İ.S. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. **Cryobiology**, v.66, p.38-42, 2013.
- TERUYA, J.H.; SALIDO, E.C.; EDWARDS, P.A.; CLARKE, C.F. Testis-specific transcripts of rat farnesyl pyrophosphate synthetase are developmentally regulated and localized to haploid germ cells. **Biol. Reprod.**, v.44, p.663-671, 1991.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.
- TONIOLLI, R.; TONIOLO, G.H.; FRANCESQUINI, P.H.; Morato, F.M.A.C. Avaliação de diferentes técnicas e diluentes utilizados no processo de congelamento do sêmen do varrão. **Cienc. Anim.**, v.19, p.53-62, 2009.
- TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-191, 1999.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.23-53, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the



- assessment of their post-thawing functions. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F. **The effects of cold shock on sperm cell membranes.** In: CLARKE, A. (Ed.). Effects of low temperatures on biological membranes. London : Academic Press, 1981. p. 189-218.
- WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.5, p.639-658, 1993.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil A, Neill JD, editors. **The physiology of reproduction.** New York: Raven Press, p.189-317, 1994.
- YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.822, p.267-287, 1985.