



Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação

Plasmatic membrane of bovine spermatozoa: effect of the species oxygen reactive, antioxidant and cryopreservation

J.C. Borges^{1,3}, M.R. Silva¹, J.D. Guimarães², C.R. Esper¹, P.H. Franceschini¹

¹Universidade Estadual Paulista UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Universidade Federal de Viçosa UFV, Viçosa, MG, Brasil.

³Correspondência: julicborges@fcav.unesp.br

Resumo

A membrana plasmática é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação, e sua integridade é fundamental para que os espermatozoides estejam viáveis no momento da fecundação. Sua composição, tipo de fosfolípidos e quantidade de proteínas são variáveis e influenciam a sensibilidade ao choque térmico. Durante o processo de capacitação, alterações na membrana plasmática são necessárias para que os espermatozoides sejam capazes de efetuar a reação acrossomal e, conseqüentemente, a fecundação. A presença de metabólitos do oxigênio é necessária para esse processo. No entanto, em excesso, eles são prejudiciais e comprometem a fluidez e a integridade da membrana. Enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal e no próprio espermatozoide neutralizam esses metabólitos, evitando estresse oxidativo. Porém, a criopreservação causa desequilíbrio entre produção e neutralização de metabólitos do oxigênio, comprometendo a viabilidade da célula espermática. Na tentativa de amenizar as perdas celulares, diluidores de diferentes composições, inclusive contendo antioxidantes, têm sido testados para a preservação da viabilidade espermática. Esta revisão enfoca a composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide e a produção de metabólitos do oxigênio, relacionando-as com a qualidade espermática de bovinos após o processo de criopreservação e a utilização de diluidores contendo antioxidante.

Palavras-chave: capacitação espermática, componentes lipídicos, estresse oxidativo, reação do acrossoma, sêmen.

Abstract

The plasmatic membrane is the part of the spermatozoa structure which is the most susceptible to change during cryopreservation and its integrity is fundamental for spermatoc viability in the moment of fertilization. Its composition, type of phospholipids and quantity of proteins, is variable and affects the sensibility to thermal shock. During capacitation, alterations occurs in the plasmatic membrane, these alterations are necessary for the spermatozoa to be able to perform the acrosome reaction and hence the fertilization. The presence of free radicals are necessary in this process, however, ROS are harmful in excess and interfere in the fluidity and integrity of the membrane. Antioxidants enzymes in the seminal plasma and in the spermatozoa neutralize these radicals preventing oxidative stress, but the cryopreservation causes imbalance between production and neutralization, compromising the cell's viability. With the Objective of minimizing cells loss, extenders with different composition, including antioxidants, have been tested for sperm viability preservation This review focuses in the plasmatic membrane composition and species oxygen reactive production, related with quality sperm bovine after cryopreserved process and the use extender containing antioxidant.

Keywords: acrosome reaction, lipid components, oxidative stress, semen, sperm capacitation.

Introdução

A inseminação artificial em bovinos é a biotécnica aplicada à reprodução com maior difusão e impacto no melhoramento genético de animais de exploração zootécnica. Essa técnica possui importantes vantagens como: melhoramento do rebanho em menor tempo e baixo custo por meio da utilização de sêmen de reprodutores de comprovada eficiência na produção de leite e carne; controle de doenças que, pela monta natural, poderiam ser transmitidas às vacas; utilização de touros com problemas adquiridos e impossibilitados de efetuar a monta; obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; padronização do rebanho; nascimento de filhos após a morte do pai, face à possibilidade da congelação e estocagem de sêmen; entre outras. Com isso, a utilização da inseminação artificial apresenta inúmeras vantagens, tornando a relação custo/benefício bastante lucrativa.

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da técnica, por

isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose (Amann e Pickett, 1987; Watson, 1995), e uma das injúrias ocasionadas aos espermatozoides é a peroxidação lipídica das membranas (Jones e Mann, 1977) causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de metabólitos do oxigênio (ROS), os quais estão associados com o declínio da fertilidade espermática após o período de estocagem (Maxwell e Watson, 1996). Sendo assim, buscando melhorar a preservação da integridade celular, a associação de componentes antioxidantes tem sido utilizada nos meios de congelamento de sêmen de várias espécies, incluindo a espécie bovina, no intuito de reduzir as alterações causadas à membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de refrigeração e congelamento (Beconi et al., 1993).

Ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que comprometa a viabilidade espermática, haverá a possibilidade de melhorar os índices reprodutivos e difundir o uso das biotecnologias, como transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e utilização do sêmen sexado, já que todas utilizam o sêmen criopreservado.

Nesta revisão, serão abordadas características da composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide e sua função fisiológica no processo de fecundação, bem como os aspectos relacionados à geração e degradação de metabólitos do oxigênio no sêmen bovino.

Componentes lipídicos da membrana espermática e suas funções

Quando se trata da estocagem dos espermatozoides para uso em qualquer biotecnologia aplicada à reprodução, é mais relevante considerá-los como constituídos de núcleos, mitocôndrias e estruturas membranosas, devido à resposta diferenciada destes componentes estruturais ao choque térmico, redução de temperatura ou criopreservação (Ochsendorf, 1999; Agarwal et al., 2008). As estruturas membranosas são mais importantes sob a perspectiva do choque térmico (Amann e Graham, 1993; Watson, 1995; Vishwanath e Shannon, 1997) e do estresse oxidativo (Sikka et al., 1995, O'Flaherty et al., 1997, 1999; Khosro Beygi e Zarghami, 2007; Desai et al., 2010).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é o componente mais externo. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozoides e com sua natureza diferindo regionalmente (Flesh e Gadella, 2000; Khosro Beygi e Zarghami, 2007), é uma estrutura fina, flexível, autosselante e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de apenas 7,5 a 10nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (Guyton e Hall, 1997), sendo que proporções relativas desses componentes são distintas em diferentes tipos de membranas (Lehninger et al., 2000). A composição lipídica, característica para cada reino, espécie, tecido e organela de certo tipo celular, consiste em três zonas: a bicamada lipídica, a superfície de contato entre os fosfolipídios e a água e o glicocálice (Scott, 1973). Além disso, proteínas se encontram adsorvidas na superfície da membrana ou em seu interior, fazendo parte da estrutura (Amann e Graham, 1993; Lehninger et al., 2000). As proteínas interligadas com os lipídios são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são liberadas da membrana apenas por solventes ou detergentes, sendo essenciais para sua estrutura (Amann e Graham, 1993). As proteínas periféricas, por outro lado, são solúveis em diluidores seminais e água, sendo facilmente removidas. As proteínas integrais agem como poros ou canais através da membrana, como receptores para outras moléculas, ou são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (Amann e Pickett, 1987).

O modelo mosaico da membrana é fluido, pelo fato de as interações entre os lipídios e as proteínas não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas movam-se lateralmente no plano da membrana. Os lipídios de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora a assimetria, ao contrário daquela das proteínas da membrana, não seja absoluta. Na membrana plasmática, certos lipídios são tipicamente encontrados na face externa da camada (esfingomielina e fosfatidilcolina) e outros na face interna, região citoplasmática (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol; Lehninger et al., 2000), sendo o principal constituinte que confere à membrana a característica de fluidez, a qual depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores. O conteúdo esteroide da membrana também é um determinante importante desta temperatura de transição. A estrutura plana rígida do grupo esteroide, inserida entre as cadeias laterais dos ácidos graxos, tende a moderar os extremos de solidez e fluidez das membranas (Alberts et al., 1997).

Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poli-insaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma "hexagonal II" ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória; entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e, assim, causar danos irreparáveis

(Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Watson, 1995; Vishwanath e Shannon, 1997; Khosro Beygi e Zarghami, 2007).

Embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolípidios, 25% de lípidios neutros e 5% de glicolípidios (em base molar) (Flesh e Gadella, 2000).

Os fosfolípidios parecem ser a fonte principal de substrato para respiração endógena dos espermatozoides. Segundo Scott (1973), os tipos de fosfolípidios presentes nos espermatozoides variam consideravelmente de uma espécie para outra, sendo que plasmalogencolina é o principal fosfoglicerídio dos espermatozoides dos ruminantes domésticos. Esses fosfoglicerídios são hidrolisados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, promovendo, desta maneira, energia celular (Mills e Scott, 1969; Aitken, 1995). O principal ácido graxo poli-insaturado dos fosfolípidios colina é o ácido docosa-hexaenoico (22:6), enquanto da fração fosfolipídica etanolamina o ácido linoleico (18:2) é o principal ácido graxo insaturado. Durante sua fase de maturação no epidídimo, ocorre aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados dos espermatozoides, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (Vandenheuvel, 1971). Assim, qualquer mudança que ocorra em cada fosfolípidio, ou na composição de seus ácidos graxos, altera a estrutura e a função da membrana dos espermatozoides (Khosro Beygi e Zarghami, 2007).

O colesterol é o principal esteroide dos espermatozoides ejaculados (Cross, 1998) e parece ser importante regulador da função espermática (Langlais e Roberts, 1985; Scott, 2000). *In vitro*, a adição de colesterol ao meio previne os espermatozoides de se tornarem capazes de iniciar a reação acrossomal (Zarintash e Cross, 1996) e fertilizar oócitos (Go e Wolf, 1985), porém, geralmente, promove a fusão da membrana (Chernomordik et al., 1995).

Um ejaculado *in natura* possui relação elevada de colesterol/fosfolípidio. Durante a capacitação espermática, o colesterol se move da membrana para “solubilizar proteínas e receptores”, enquanto os fosfolípidios se movem para dentro da membrana espermática (Cross, 1998). A relação baixa de colesterol/fosfolípidio diminui a microviscosidade da membrana, expondo os fosfolípidios e, talvez, permitindo aumentar o influxo de cálcio, resultando na reação acrossomal. Em algumas espécies, a concentração de colesterol na membrana plasmática se altera com a passagem dos espermatozoides pelos epidídimos. A relação colesterol/fosfolípidio da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros e bodes aumenta durante o trânsito epididimário (Parks e Hammerstedt, 1985; Rana et al., 1991), mas diminui em ratos e garanhões (Hall et al., 1991) e não se altera em cachorros (Nikolopoulou et al., 1985). Os espermatozoides emitidos no ejaculado podem obter colesterol adicional do plasma seminal. O colesterol é encontrado nas lipoproteínas e em qualquer tipo de células de um ser vivo (Cross, 1998).

Capacitação espermática e reação acrossomal

Vários autores demonstraram que a geração de ROS pelos espermatozoides é fundamental para que ocorram os processos fisiológicos como: maturação espermática, capacitação, reação acrossomal, estabilização da mitocôndria dentro da peça intermediária e fusão do espermatozoide/ovócito (Agarwal et al., 2008; Desai et al., 2009; Gonçalves et al., 2010; Kothari et al., 2010).

A capacitação espermática é um requisito necessário para que ocorra a fertilização e resulta de alterações na membrana plasmática as quais tornam os espermatozoides capazes de efetuar a reação acrossomal verdadeira, que, em condições fisiológicas, ocorre durante exposição a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do ovócito (Bleil e Wassarman, 1983; Gadella et al., 2008). Entre as principais mudanças durante o processo de capacitação estão: depleção da relação colesterol/fosfolípidio na superfície espermática (Thérien et al., 1998; Wolfe et al., 1998; Flesh e Gadella, 2000; O’Flaherty et al., 2006; Kothari et al., 2010); maior fluidez da membrana, principalmente determinada pelo aumento da concentração de fosfatidilcolina e pela desestabilização da membrana. Ocorrem também alterações nas glicosaminoglicanas, influxo de íons cálcio, aumento da concentração de AMP cíclico e modificações de algumas atividades enzimáticas, principalmente a proteína quinase C (Bilodeau et al., 2000; O’Flaherty et al., 2006; Suarez, 2008; Kothari et al., 2010).

O efluxo de colesterol começa logo após a separação dos espermatozoides do plasma seminal. Parece ser determinado pela ação de moléculas lipofílicas do meio, como albumina e lipoproteínas. A perda do colesterol permite o aumento do pH intracelular (de 6,7 para 6,92), promovendo a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossomal. Há elevação das concentrações de bicarbonato intracelular, implicando aumento da concentração de íons de cálcio e ativação da adenilato ciclase, que converte o ATP em AMPc, ativando a PKA e fosforilizando a tirosina (Flesh e Gadella, 2000; Gadella et al., 2008; Kothari et al., 2010).

Os agentes indutores da capacitação *in vitro* mais utilizados são o cálcio (Lapointe e Sirand, 1996) e os glicosaminoglicanos, destacando-se a heparina como mais eficiente dentro deste grupo (Parrish e Susko-Parrish, 1988).

Os mecanismos da indução da capacitação pela heparina envolvem ligações reversíveis e exotérmicas com os espermatozoides, alterações das proteínas da membrana plasmática e dos sítios de ligação de proteínas,

como as lecitinas (Mahmoud e Parrish, 1996), por ativação dos canais iônicos para elevação de cálcio, pH e AMP cíclico (Thérien et al., 1998), além de acelerar a conversão da proacrosina em acrosina (Yanagimachi, 1994). A proacrosina é uma proteína localizada na vesícula acrossomal, sendo liberada provavelmente por proteólise (Kim et al., 2001).

Há indícios de que os processos de capacitação espermática sejam estimulados por lipoproteínas de alta densidade (HDL), provenientes do fluido folicular ou do oviduto, além de que proteínas do plasma seminal bovino (BSP's) aceleram a capacitação (Thérien et al., 1995; Scott, 2000). Embora os metabólitos do oxigênio sejam prejudiciais aos espermatozoides, vários autores (O'Flaherty et al., 2006; Kothari et al., 2010) demonstraram que quantidades controladas do ânion superóxido (O_2^-) são necessárias para a ocorrência dos processos de hiperativação/capacitação e que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) participa como indutor da reação acrossomal no espermatozoide bovino. Desta maneira, De Lamirande e Gagnon (1993) e De Lamirande e O'Flaherty (2008) mencionaram que a capacitação é parte de um processo oxidativo.

A capacitação espermática termina com o evento de exocitose chamado de reação acrossomal, que tem como objetivo permitir que os espermatozoides penetrem na zona pelúcida do ovócito (Yanagimachi, 1994; O'Flaherty et al., 2006; Gadella et al., 2008; Kothari et al., 2010). A reação acrossomal envolve múltiplas funções entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, possibilitando que o conteúdo do acrossomo seja liberado através de canais de membrana (Thérien et al., 1995). Os locais onde estas fusões se iniciam são aqueles onde a membrana acrossomal externa é menos estável e onde há maior quantidade de sítios de ligação com o cálcio (Yanagimachi, 1994).

O influxo de cálcio é uma etapa essencial para a reação acrossomal nos espermatozoides de mamíferos (Bailey e Buhr, 1993; Kothari et al., 2010), por inativar a bomba de sódio-potássio-ATPase, resultando em rápido aumento de sódio intracelular, efluxo do íon hidrogênio e aumento do pH intracelular. O aumento da concentração intracelular de cálcio e HCO_3^- também ativa as fosfolipases da membrana que produzem substâncias fusogênicas, como o ácido aracônico e os lisofosfolípidios (Yanagimachi, 1994; De Lamirande e O'Flaherty, 2008).

A criopreservação eleva as concentrações de cálcio intracelular, assim como a capacitação espermática (Watson, 2000; Chatterjee e Gagnon, 2001). Conseqüentemente, a reação acrossomal em espermatozoides provenientes de sêmen congelado pode ser realizada em tempo menor do que o necessário para sua indução em amostras de sêmen *in natura* no trato genital da fêmea (O'Flaherty et al., 1999; Watson, 2000).

Falsa reação acrossomal é possível de ocorrer porque íons intracelulares podem sair de dentro das células, permitindo a entrada de outros íons extracelulares e desencadeando processos de desestabilização da membrana. Assim, a proacrosina pode ser convertida em acrosina, que promoverá a digestão da matriz acrossomal e, conseqüentemente, a fusão das membranas (Yanagimachi, 1994; O'Flaherty et al., 2006; Gadella et al., 2008).

Os espermatozoides dos mamíferos são extremamente sensíveis a danos oxidativos induzidos por concentração elevada de oxigênio (Kim e Parthasarathy, 1998; O'Flaherty et al., 2006; Kothari et al., 2010), ocasionando a peroxidação lipídica das membranas (Jones e Mann, 1977; Aitken, 1995) e a desestabilização da bicamada fosfolipídica, permitindo a ativação acrossomal (Chatterjee e Gagnon, 2001) e diminuindo a viabilidade do sêmen (Ochsendorf, 1999; Sanocka e Kurpisz, 2004; Khosro Beygi e Zarghami, 2007).

Metabólitos do oxigênio e antioxidantes

Quimicamente, os metabólitos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, as quais são, portanto, altamente energéticas e instáveis, podendo ser formadas pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna (próprio metabolismo) de reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou enzimas. Essa energia, ao atingir o átomo, induz a que um elétron seja removido do seu orbital, formando novo átomo contendo um elétron extra, denominado ROS, o qual, para se tornar novamente estável, precisa liberar essa energia acumulada (Araújo, 2001; Sanocka e Kurpisz, 2004; Valko et al., 2005; Kefer et al., 2009).

O organismo produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio decorrente do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Concentrações reduzidas de ROS são importantes para processos bioquímicos normais como: sinalização e controle do crescimento celular, ataque de patógenos invasores, síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclo-oxigenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeo), e detoxificação de substâncias estranhas. Porém, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras (Ford, 2001; Agarwal et al., 2004).

O termo espécies reativas de oxigênio (ROS) representam uma categoria de moléculas que se referem aos radicais livres (íon hidroxil, superóxido, óxido nítrico, peroxil, etc.), aos não radicais (ozônio, oxigênio singlete, peroxidases lipídicas, peróxido de hidrogênio) e aos derivados do oxigênio (Agarwal e Prabakaran,

2005). Espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, íon nitroxil, peróxido de nitrito, etc.) são consideradas radicais livres de nitrogênio e são subclasse das ROS (Darley-Usmar et al., 1995; Sikka, 2001). Todas essas moléculas podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas transmembrana e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (Ochsendorf, 1999).

Os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelas ROS, provocando reação propagadora de auto-oxidação, ou seja, efeito cascata na formação de novos metabólitos oxidantes (Sharma e Agarwal, 1996; Araújo, 2001; Fig. 1). Uma vez que a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (Zalata e Depuydt, 1998), torna-se altamente sensível às ROS (Comhaire et al., 1999; Ochsendorf, 1999).

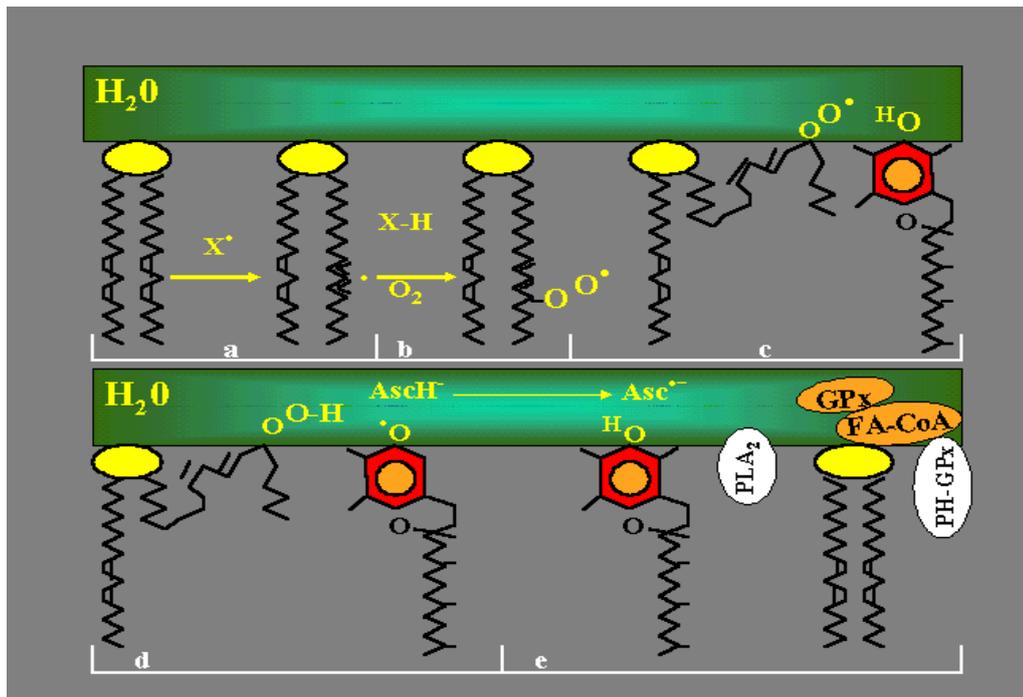


Figura 1. Desenho esquemático da membrana plasmática (apenas uma camada lipídica) destacando a região hidrofóbica e hidrofílica dos fosfolípidos. Adaptado de Buettner (1993).

- ^aCadeia de ácidos graxos poli-insaturados atacada pelo radical livre.
- ^bFormação de um novo radical livre.
- ^cDesestruturação da membrana plasmática que assume nova configuração (micela invertida).
- ^dEfeito antioxidante da vitamina E (doação do hidrogênio).
- ^eReestruturação da membrana plasmática; reciclagem da vitamina E pela ação da vitamina C.

O estresse oxidativo é um fator associado à diminuição da fertilidade durante o processamento do sêmen (Trincheri et al., 1990; Sikka et al., 1995; Sikka, 1996; O'Flaherty et al., 1997; Bilodeau et al., 2000; Ortega et al., 2003). A produção de ROS em excesso parece estar envolvida com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (Ochsendorf, 1999; Chatterjee e Gagnon, 2001), em condições hipotérmicas de estocagem (Maxwell e Watson, 1996), resultando em perda da motilidade espermática e indução de apoptoses, devido à lipoperoxidação (Sharma e Agarwal, 1996; Bucak et al., 2010a, b).

Leucócitos e células espermáticas imaturas são as principais fontes de ROS (Garrido et al., 2004), sendo a peroxidação lipídica gerada espontaneamente dentro da membrana plasmática e liberada pela ação da fosfolipase A₂ (Twigg et al., 1998). Em bovinos, ROS são geradas por espermatozoides mortos, via reação catalisada da oxidação de um aminoácido aromático (Sariözkan et al., 2009).

Embora os espermatozoides dos bovinos não sofram facilmente peroxidação, quando comparados com os espermatozoides do homem, do garanhão e do bode, o sêmen congelado e descongelado é mais susceptível à peroxidação lipídica do que o sêmen *in natura* (Trincheri et al., 1990). Entretanto, no sêmen de garanhões, o peróxido de hidrogênio é a principal ROS responsável pelas alterações que determinam a perda da motilidade espermática (Baumber et al., 2000).

A maioria dos seres vivos possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas ROS formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. Diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo: a superóxido dismutase remove o radical superóxido, convertendo-o

em peróxido de hidrogênio; a catalase destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; a glutathione peroxidase é a mais importante na remoção de peróxido das células. Outros antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), participam desse sistema bloqueando a ação das ROS envolvidas na oxigenização de ácidos graxos poli-insaturados e, conseqüentemente, na formação de peróxidos (Araújo, 2001; Agarwal et al., 2005).

Segundo Araújo (2001), a ROS produzida no interior hidrofóbico da membrana se combina com o oxigênio que lá se encontra dissolvido, formando o radical peroxil (Fig. 1a). O radical resultante ataca as proteínas e oxida novamente os ácidos graxos poli-insaturados adjacentes (Fig. 1b). Os hidroperóxidos formados pela oxidação, por serem mais hidrofílicos, migram para a superfície da membrana para interagir com a água, provocando sua ruptura e alterando sua fluidez (Fig. 1c). A proteção da membrana é obtida por remoção das ROS, sendo que, nas membranas, o principal removedor é o α -tocoferol. Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que estes oxidem os ácidos graxos adjacentes ou as proteínas. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido (Fig. 1d). Desta forma, as enzimas catalase e glutathione peroxidase atuam na remoção dos novos radicais formados (Fig. 1e).

Essas enzimas antioxidantes estão presentes no plasma seminal e nos espermatozoides dos animais, sendo que, na espécie bovina, foram encontradas no plasma seminal glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (em baixa concentração), e nos espermatozoides foram encontrados principalmente superóxido dismutase e baixa concentração de glutathione peroxidase. Verificou-se ausência da catalase nos espermatozoides bovinos, diferindo de outras espécies, como humana e ovina, nas quais foi detectada a atividade da catalase (Bilodeau et al., 2000), embora a catalase presente no plasma seminal esteja relacionada, em ovinos e bovinos, ao controle do estresse oxidativo nas células (Bucak et al., 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e sinérgicos ou secundários. Os primários atuam inibindo a fase inicial da reação pela interação com os radicais livres, ou na etapa de propagação da reação, reagindo com os radicais alcóxil ou peroxil, ou ainda, na formação do complexo antioxidante-peroxil. Compõem este grupo os compostos fenólicos poli-idroxilados (Galatos), os fenóis (Butilhidroxianisol - BHA, Butilhidroxitolueno - BHT, Butilhidroxiquinona - TBHQ) e os tocoferóis. Os antioxidantes sinérgicos são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o principal do grupo (Araújo, 2001; Agarwal et al., 2005). Estas substâncias podem atuar na regeneração do radical fenóxil, doando hidrogênio e, conseqüentemente, regenerando o antioxidante primário. Essa interação entre os vários antioxidantes com a habilidade de regenerar outras espécies oxidadas (vitamina E, vitamina C e glutathione) é, talvez, mais importante do que a concentração destes no organismo (Buetner, 1993; Fig. 1e).

Os tocoferóis ou vitamina E têm como função a manutenção da integridade e da funcionalidade dos sistemas reprodutivo, muscular, circulatório, nervoso e imune. Algumas dessas funções podem também ser realizadas inteiramente ou parcialmente pelo selênio ou certos antioxidantes sintéticos. A vitamina E está relacionada a reações normais de fosforilação (ATP); proteção das vitaminas A e C contra oxidação; síntese de ubiquinona; metabolismo de aminoácidos sulfurosos; metabolismo de vitamina B₁₂, uma vez que a deficiência afeta a conversão da vitamina em coenzima (injúrias neurológicas); e metabolismo da vitamina D no fígado e rins, visto que a deficiência reduz a atividade das hidroxilases (Araújo, 2001).

A vitamina E natural está sujeita à destruição por oxidação, que pode ser acelerada pelo calor, umidade, gordura rancificada, luz, álcali e microminerais (cobre e ferro). A esterificação da vitamina E aumenta sua estabilidade. Por isso, formas comerciais usualmente contêm acetato, sendo muito estáveis à oxidação e possuindo atividade antioxidante *in vitro* (McDowell, 2000).

O tocoferol está presente na dupla camada lipídica de membranas celulares. Supõe-se que a cadeia lateral do tocoferol mistura-se com os ácidos graxos de cadeia longa da membrana celular. Neste local, o tocoferol atua como antioxidante para proteger a membrana celular dos efeitos nocivos de ROS. Os ácidos graxos poli-insaturados contêm a configuração de $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, em que o hidrogênio no átomo de carbono central é facilmente removido, resultando na formação de ROS (Bansal e Bilaspuri, 2009, 2010). Os elétrons livres reajustam-se, e é adicionado oxigênio para formar um peróxido. Os peróxidos podem romper-se para formar dois oxidantes, resultando numa reação de cadeia autopropagadora. Os antioxidantes fornecem hidrogênio para as ROS e as estabilizam. O antioxidante torna-se um radical livre, mas tem a propriedade de poder reajustar-se em um conjunto estável e, dessa maneira, interromper a reação de propagação (Miller et al., 1993; Kumar e Mahmood, 2001).

A ação do tocoferol como antioxidante é suplementada pela presença de glutathione-peroxidase no componente solúvel da célula. A glutathione-peroxidase catalisa a conversão de peróxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em álcoois ou água, evitando, assim, que os peróxidos lesem componentes celulares. A glutathione-peroxidase contém selênio em sua estrutura ativa e explica a eficiência do selênio na prevenção de algumas condições de deficiência, também evitadas pelo tocoferol. Assim, o selênio atua como estoque adicional de vitamina E, retardando os sinais de deficiência desta vitamina (Araújo, 2001).

Segundo Seoungsoo e Nohyoung (2000), a utilização de selênio na dieta melhorou a viabilidade e a motilidade espermática. Por sua vez, a adição de superóxido dismutase (SOD) no diluente reduziu a quantidade

de espermatozoides com capacitação espermática, indicando que ânions superóxidos podem despolarizar membranas celulares e, desta forma, modular a interação entre gradientes iônicos e funções celulares (Scott, 1973).

Antioxidantes sintéticos não são tão efetivos quanto a vitamina E, pois não são estocados no corpo do animal. A vitamina E é um inibidor reconhecido da peroxidação de lipídios em membranas biológicas (Ernster, 1993) e tem efeito de proteção na atividade metabólica e na viabilidade celular de espermatozoides bovinos criopreservados (Beconi et al., 1993).

Bilodeau et al. (2000) sugeriram que o balanço entre a produção de ROS e a desintoxicação delas pode ser importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides antes, durante e após sua criopreservação, exercendo influência direta sobre a fertilidade. Estes autores notaram que os espermatozoides bovinos são pouco adaptados a metabolizar o tóxico H_2O_2 . Observaram, ainda, que as principais enzimas antioxidantes envolvidas na desintoxicação das ROS no sêmen bovino são glutathione peroxidase e superóxido dismutase. A glutathione, que é um cofator das enzimas, também possui papel antioxidante. Segundo Beconi et al. (1993) e Bilodeau et al. (2000), as concentrações de glutathione e SOD, respectivamente, são afetadas significativamente no processo de criopreservação de sêmen bovino.

Muitos antioxidantes têm promovido efeito benéfico contra os danos causados por ROS na motilidade e nos defeitos oxidativos (Yousef et al., 2003; Bansal e Bilaspuri, 2010).

Criopreservação espermática e estresse oxidativo

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, por estabilizar o pH do meio, neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, protegê-los contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e a pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides, atuar como fonte de energia, estabilizar sistemas enzimáticos e ainda inibir o crescimento bacteriano (England, 1993; Pickett e Amann, 1993). Estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver um meio que atenda a todas essas qualidades, fazendo com que o mínimo de espermatozoides seja perdido durante o processo de criopreservação.

Como visto anteriormente, existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluente aos espermatozoides de um determinado indivíduo (Holt, 2000), sendo que aqueles cujo sêmen tolera os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (Watson, 2000).

Um dos principais fatores que contribuem para baixa qualidade seminal é o estresse oxidativo. A criopreservação induz extensivas modificações biofísicas e bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide, as quais acarretam diminuição do potencial de fertilidade da célula, associado com a redução de motilidade e viabilidade espermática, integridade de membrana, quantidade de antioxidante e funções espermáticas (Bucak et al., 2010a, b).

É durante o período de resfriamento (20°C e 5°C) que mudanças irreversíveis ocorrem à membrana plasmática dos espermatozoides, devido à ruptura e às perdas de seus arranjos celulares (Quinn et al., 1980; Watson, 1995). Essa fase de transição caracteriza-se pela passagem da membrana plasmática do estágio líquido para o estágio cristalino (gel), sendo o período principal de entrave no sucesso da congelação. Diminuição da produção de energia (movimento circular ou perda prematura de motilidade) e aumento da permeabilidade da membrana estão associados a essas alterações (Watson, 1995).

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação dos espermatozoides, com a espécie e com a qualidade e quantidade do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos (Watson, 1981).

O tipo de fosfolipídios e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática também influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que possuem maior proporção de fosfatidilcolina: fosfatidil etanolamina são mais resistentes, enquanto espécies que possuem maior conteúdo de proteína são menos resistentes (Parks e Lynch, 1992).

A curva de congelação é de extrema importância na manutenção da integridade celular, pois se ela for muito rápida, não há tempo para que ocorra a desidratação dos espermatozoides, possibilitando a formação de gelo intracelular, prejudicial à célula. Em casos de curva de congelação lenta, haverá a desidratação dos espermatozoides impedindo a formação de gelo intracelular, porém a alta concentração de solutos também pode causar danos à célula (Watson, 1995).

Com o objetivo de manter a integridade da membrana e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (vitamina E, vitamina C, catalase, superóxido dismutase, entre outros), como componente do diluente, têm sido empregados em várias espécies: bovino (Beconi et al., 1993; O'Flaherty et al., 1997, 1999; Bilodeau et al., 2000; Borges, 2003, 2008; Uysal et al., 2007; Bucak et al., 2010b; Tuncer et al., 2010), bubalino (Andrabi et al., 2008; Ansari et al., 2010; Reddy et al., 2010), equino (Aguero et al., 1995; Aurich et al., 1997; Ball et al., 2001), suíno (Breininger et al., 2005; Szczesniak-Fabianczyk et al., 2006;

Kaeoket et al., 2008; Malo et al., 2010; Vallorani et al., 2010), ovino (Upreti et al., 1997, 1998; Uysal e Bucak, 2007; Bucak et al., 2008, 2009; Maia et al., 2009), caprino (Bucak e Uysal, 2008; Anghel et al., 2010; Bucak et al., 2010a), felino (Thuwanut et al., 2010) e canino (Michael et al., 2009; Neagu et al., 2010), sendo que eles inibem ou diminuem a produção de radicais livres, mas algumas vezes não interferem nos parâmetros de viabilidade espermática.

A trealose e a taurina são aminoácidos sulfurados e possuem papel na proteção de espermatozoide contra ROS quando exposto em condições aeróbicas e em processo de congelação/descongelação (Reddy et al., 2010). A trealose possui ação protetora relacionada tanto ao efeito osmótico quanto a interações específicas com os fosfolípidios, o que torna o meio hipertônico, causa desidratação osmótica da célula antes da congelação, diminui os danos celulares decorrentes da cristalização e melhora a capacidade fertilizante dos espermatozoides de ovino, bovino e rato (Bucak et al., 2007). A propriedade antioxidante da taurina é observada pela elevação da concentração de catalase em resposta ao aumento da concentração de SOD nos espermatozoides de ovino, coelho e bovino (Reddy et al., 2010).

O inositol e a glutamina possuem efeito crioprotetor e antioxidante e no aumento do número de células com membrana plasmática íntegra.

Tióis como a glutatona e a cisteína preveniram a perda de motilidade espermática do sêmen congelado/descongelado bovino, ovino, caprino e suíno, aumentando sua viabilidade (Uysal e Bucak, 2007).

O ácido hialurônico, componente essencial da matriz extracelular, está envolvido em importantes funções fisiológicas como: motilidade e capacitação espermática, manutenção da viabilidade celular e estabilização da membrana plasmática *in vitro* (Bucak et al., 2007). A albumina sérica bovina (BSA) também é conhecida por eliminar metabólitos do oxigênio gerados pelo estresse oxidativo, mantendo a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides canino durante o processo de congelação/descongelação (Uysal e Bucak, 2007).

Borges (2003) verificou que a suplementação de antioxidantes (vitaminas C e E) manteve a integridade da membrana plasmática no sêmen congelado/descongelado de bovino, avaliado por testes complementares, embora não tenha alterado a motilidade espermática. Esse mesmo autor, em 2008, verificou que touros com maior número de patologias espermáticas tiveram maior taxa de prenhez utilizando-se diluidor contendo antioxidante (Trolox), durante o processo de criopreservação, sugerindo que houve efeito protetor do antioxidante na manutenção da viabilidade das células espermáticas.

Além das lesões sofridas pela membrana plasmática durante a congelação, também ocorrem danos durante o processo de reaquecimento da célula após a descongelação, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lípidios e proteínas, e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar o rompimento das membranas (Watson, 1995; Holt, 2000). Assim, a fase de descongelação é tão importante quanto a de congelação, na formação de metabólitos do oxigênio e na manutenção da viabilidade celular.

Considerações finais

O tipo de fosfolípidios e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática variam entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluente aos espermatozoides de um determinado indivíduo, sendo que espécies que possuem maior proporção de fosfatidilcolina:fosfatidil etanolamina são mais resistentes.

A capacitação espermática é um requisito necessário para que ocorra a fertilização e é parte de um processo oxidativo, no entanto a produção excessiva de metabólitos do oxigênio no sêmen (estresse oxidativo) é um fator associado com a diminuição da fertilidade durante o processamento do sêmen. Um dos principais fatores que contribuem para baixa qualidade seminal é o estresse oxidativo, originado durante o processo de criopreservação.

Referências bibliográficas

- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3, p.28, 2005. Disponível em: <http://www.rbej.com/content/3/1/28>. Acesso em 1 nov. 2010.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, v.59, p.2-11, 2008.
- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*, v.8, p.616-627, 2004.
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, v.43, p.963-974, 2005.
- Aguero A, Miragaya MH, Mora NG, Chaves MG, Neild DM, Beconi MT. Effect of vitamin E addition on equine preservation. *Com Biol*, v.13, p.343-356, 1995.



- Aitken RY.** Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.659-668, 1995.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.** *Biologia molecular da célula*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 506p.
- Amann RP, Graham JK.** Sperm function. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.735-736.
- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Afzal M.** Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. *Pakistan Vet J*, v.28, p.159-162, 2008.
- Anghel A, Zamfirescu S, Dragomir C, Nadolu D, Elena S, Florica B.** The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Roman Biotechnol Lett*, v.15, p.26-32, 2010.
- Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Andrabi SMH, Iqbal S, Khalid M, Akhter SA.** Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Anim Sci Pap Rep*, v.28, p.235-244, 2010.
- Araújo JMA.** *Química de alimentos*. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 416p.
- Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C.** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.185-192, 1997.
- Bailey JL, Buhr MM.** Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci*, v.74, p.45-51, 1993.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.
- Bansal AK, Bilaspuri GS.** Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Anim Sci Pap Rep*, v.27, p.5-14, 2009.
- Bansal AK, Bilaspuri GS.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, v.2011, 2011. Article ID686137. 7p. doi:10.4061/2011/686137, 2010.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel CG.** The effect of reactive oxygen species on equine motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, v.21, p.895-902, 2000.
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG.** Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v.40, p.841-851, 1993.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA.** Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.
- Bleil JD, Wassarman PM.** Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of acrossome reaction by a zone glycoprotein. *Dev Biol*, v.95, p.317-324, 1983.
- Breining E, Beorlegui NM, O'flaherty CM, Beconi MT.** Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.2126-2135, 2005.
- Borges JC.** *Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro*. 2008. 70f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.
- Borges JC.** *Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificantes na criopreservação de sêmen bovino*. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 2003.
- Bucak MN, 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.
- Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A.** Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*, v.75, p.128-134, 2008.
- Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M.** The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res*, v.89, p.24-30, 2010a.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sarlıözkan S, Baspınar N, Taspınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalln PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroglu A, Öztuna D.** Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 2010b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WD5511C0341/2/244b4ac4f7200ca4ef9130bd2f25282e>. Acesso em 01 nov. 2010.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutas PA.** Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res*, v.81, p.13-17, 2009.
- Bucak MN, Uysal O.** The role of antioxidants in freezing of saanen goat semen. *Indian Vet J*, v.85, p.148-150, 2008.

- Buettner GR.** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, v.300, p.535-543, 1993.
- Chatterjee S, Gagnon C.** Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.59, p.451-458, 2001.
- Chernomordik L, Kozlov MM, Zimmerberg J.** Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol*, v.146, p.1-14, 1995.
- Comhaire FH, Mahmoud AMA, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB.** Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod*, v.5, p.393-398, 1999.
- Cross NL.** Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, v.59, p.7-11, 1998.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B.** Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*, v.369, p.131-135, 1995.
- De Lamirande E, O'Flaherty CM.** Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, v.1784, p.106-115, 2008.
- De Lamirande E, Gagnon C.** A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*, v.16, p.21-25, 1993.
- Desai NR, Mahfouz R, Sharma R, Gupta S, Agarwal A.** Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertil Steril*, v.94, p.1541-1543, 2010.
- Desai NR, Sharma R, Maker K, Sabnegh E, Agarwal A.** Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertil Steril*, v.92, p.1626-1631, 2009.
- England GCW.** Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert*, v.47, p.243-255, 1993.
- Ernster L.** Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: Yagi K (Ed). *Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants*. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.1-38.
- Flesh FM, Gadella BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys*, v.1469, p.197-235, 2000.
- Ford WC.** Reactive oxygen species and sperm. *Hum Fertil*, v.4, p.77-78, 2001.
- Gadella BM, Tsai PS, Bourke A, Brewis IA.** Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*, v.52, p.473, 2008.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J.** Prooxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. *Asian J Androl*, v.6, p.59-65, 2004.
- Go KJ, Wolf DP.** Albumin – mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod*, v.32, p.145-153, 1985.
- Gonçalves F, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingoti GZ.** Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.129-135, 2010.
- Guyton AC, Hall JE.** *Tratado de fisiologia médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
- Hall JC, Hadley J, Doman T.** Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl*, v.12, p.76-87, 1991.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- Jones R, Mann T.** Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J Reprod Fert*, v.50, p.255-260, 1977.
- Kaeket K, Tantiparinyakul K, Kladkaew W.** Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Thai J Agricul Sci*, v.41, p.1-9, 2008.
- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E.** Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*, v.16, p.449-457, 2009.
- Kim JG, Parthasarathy S.** Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol*, v.16, p.235-239, 1998.
- Kim KS, Foster JA, Gerton GL.** Differential release of guinea pig sperm acrossosomal components during exocytosis. *Biol Reprod*, v.64, p.148-156, 2001.
- Khosro Beygi A e Zarghami N.** Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.77, p.117, 2007.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS.** Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*, v.48, p.425-435, 2010.
- Kumar H, Mahmood S.** The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis. *Indian J Anim Sci*, v.71, p.650-653, 2001.
- Langlais L, Roberts KD.** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrossome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam Res*, v.12, p.183-224, 1985.
- Lapointe S, Sirand MA.** Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.44, p.234-240, 1996.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM.** *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 838p.

- Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L.** Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res*, v.85, p.85-90, 2009.
- Mahmoud AI, Parrish JJ.** Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Mol Reprod Dev*, v.43, p.554-560, 1996.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, Espinosa E.** Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, v.61, p.142-147, 2010.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55-65, 1996.
- McDowell LR.** *Vitamins in animal and human nutrition*. 2.ed. Ames: Iowa University Press, 2000. 793p.
- Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscos CM.** Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.119-135, 2009.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC.** Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci*, v.76, p.2812-2823, 1993.
- Mills SC, Scott TW.** Metabolism of fatty acids by testicular and ejaculated ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.18, p.367-369, 1969.
- Neagu VR, García BM, Sandoval CS, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Fernández LG, Tapia JA, Peña FJ.** Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, v.73, p.645-650, 2010.
- Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC.** Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys*, v.815, p.486-498, 1985.
- Ochsendorf FR.** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, v.5, p.399-420, 1999.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT.** Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrology*, v.29, p.269-275, 1997.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT.** Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrossome reation. *Theriogenology*, v.52, p.289-301, 1999.
- O'Flaherty CM, De Lamirande E, Gagnon C.** Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*, v.41, p.528-540, 2006.
- Ortega AM, Izquierdo AC, Gómez JJH, Corichi IMO, Torres VMM, Méndez JJV.** Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciencia*, v.28, p.699-704, 2003.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- Parks JE, Hammerstedt RH.** Developmental changes occurring in lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membranes. *Biol Reprod*, v.32, p.653-668, 1985.
- Parks JE, Lynch DV.** Lipid composition and thermotropic phase behavior of boars, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, v.38, p.1171-1180, 1988.
- Pickett BW, Amann RP.** Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. 789p.
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG.** Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, v.60, p.403-407, 1980.
- Rana AP, Majumder GC, Misra S, Ghosh A.** Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys*, v.1061, p.185-196, 1991.
- Reddy NSS, Mohanarao GJ, Atreja SK.** Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.119, p.183-190, 2010.
- Sanocka D, Kurpisz M.** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p.12-26, 2004.
- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A.** The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, v.58, p.134-138, 2009.
- Sharma RK, Agarwal A.** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v.48, p.835-850, 1996.
- Sikka SC.** Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*, v.8, p.851-862, 2001.
- Sikka SC.** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, v.1, p.78-86, 1996.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG.** Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl*, v.16, p.464-468, 1995.
- Scott MA.** A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.337-348, 2000.

- Scott TW.** Lipid metabolism of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.18, p.65-76, 1973.
- Seoungsoo L, Nohyoung P.** Effects of selenium and vitamin E administration on semen characteristics in Hanwoo young bulls. *Korean J Vet Res*, v.40, p.403-414, 2000.
- Suarez SS.** Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*, v.14, p.647-657, 2008.
- Szczesniak-Fabianczyk B, Bochenek M, Smorag Z, Silvestre MA.** Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatine structure. *Reprod Biol*, v.3, p.81-87, 2006.
- Thérien I, Dleau G, Manjunath P.** Phosphatidylcholine - binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod*, v.52, p.1372-1379, 1995.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.59, p.768-776, 1998.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, Bergqvist AS, Söderquist L, Axné E.** Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology*, v.73, p.1076-1087, 2010.
- Trincherro, GD, Affranchino MA, Shang LM, Beconi MT.** Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Com Biol*, v.8, p.339-350, 1990.
- Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, Akalın PP, Kinet H, Avdatek F, Fidan AF, Gündoğan M.** The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, v.61, p.3030-307, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WD5-517J2BG-1/2/3fd622dced228bd59fd254ed02ed2034>. Acesso em 01 nov. 2010.
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ.** Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod*, v.13, p.1429-1436, 1998.
- Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF.** Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci*, v.51, p.275-287, 1998.
- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF.** Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.269-278, 1997.
- Uysal O, Bucak MN.** Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno*, v.76, p.383-390, 2007.
- Uysal O, Bucak MN, Yavas I.** Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv*, v.6, p.1362-1366, 2007.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, v.12, p.1161-1208, 2005.
- Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G.** Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.58-65, 2010.
- Vandenheuvel FA.** Structure of membranes and role of lipids therein. *Adv Lipid Res*, v.9, p.161-248, 1971.
- Vishwanath R, Shannon P.** Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fert Dev*, v.9, p.321-331, 1997.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, v.62, p.483-492, 1981.
- Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R.** Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, v.59, p.1506-1514, 1998.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (Ed.). *The Physiology of reproduction*, 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.198-317.
- Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI.** Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci*, v.76, p.99-111, 2003.
- Zalata AA, Depuydt CE.** While blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl*, v.21, p.154-162, 1998.
- Zarintash RJ, Cross NL.** The unesterified cholesterol content of human sperm regulates response of the acrossome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod*, v.55, p.19-24, 1996.
-