



## Estresse oxidativo na preservação do sêmen suíno: como lidar com ele?

*Oxidative stress in pig semen preservation: How to deal with it?*

Diego Bucci<sup>1</sup>, Arlindo Alencar Moura<sup>2</sup>, Ivan Cunha Bustamante-Filho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum e University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, BO, Itália

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, RS, Brasil

### Resumo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a atuação de sistemas antioxidantes da própria célula e tecido. O espermatozoide de mamíferos apresenta metabolismo oxidativo e por isso é um potencial produtor destas espécies reativas que podem causar danos a estrutura lipídicas, proteínas e mesmo ao DNA espermático. Na espécie suína, o plasma seminal confere importante proteção antioxidante ao espermatozoide ejaculado no útero da fêmea, onde os desafios à sua sobrevivência são inúmeros. Contudo, esta defesa natural do plasma seminal não é suficiente para garantir o máximo de resultado de fertilidade com o sêmen submetido a processos de refrigeração ou congelamento e utilizado na inseminação artificial. Na presente revisão, serão abordados os temas estresse oxidativo e metabolismo espermático, bem como apresentados alguns dados sobre a aplicação de antioxidantes na andrologia suína.

**Palavras-chave:** antioxidante, espermatozoide, diluente, redox, inseminação artificial.

### Abstract

*Oxidative stress is characterized by an imbalance between the production of reactive oxygen species and the action of antioxidant systems present in the cell and tissue. Mammalian sperm have oxidative metabolism and are therefore a potential producers of these reactive species which can lead to damage to lipids, proteins and even sperm DNA. In the swine species, seminal plasma provides an important antioxidant protection to spermatozoa that are ejaculated and deposited in the uterus, where the challenges to their survival are numerous. However, this natural seminal plasma defense is not sufficient to guarantee maximum fertility when semen is processed for artificial insemination, and later used after preservation by refrigeration or freezing. In this review, the topics related to oxidative stress and sperm metabolism will be addressed, and results about the application of antioxidants in swine andrology will be presented as well as.*

**Keywords:** antioxidants, spermatozoa, extender, redox, artificial insemination

### Introdução

A inseminação artificial (IA) é peça chave no manejo reprodutivo da cadeia produtiva suína, de forma que praticamente toda a logística de produção de leitões está calcada na correta produção, processamento, refrigeração, transporte e armazenamento das doses de sêmen (Bortolozzo et al., 2008). Isto ocorre devido ao arranjo produtivo majoritariamente determinado pela produção de doses em unidades de difusão genética (UDG) geograficamente equidistantes das granjas de matrizes (Alkmin, 2019). Com o contínuo aperfeiçoamento dos diluentes para sêmen refrigerado, viabilizando a manutenção das doses em estado líquido por até 10 dias (Pezo et al., 2019), a inseminação artificial com sêmen refrigerado deve continuar a ser a biotecnologia reprodutiva mais utilizada na suinocultura.

Um dos aspectos cruciais da preservação dos espermatozoides em meio líquido refrigerado, é a manutenção da viabilidade celular, obtida pela minimização de danos celulares e moleculares, além da preservação das funções celulares (Strzezek et al., 1998). Tais condições são determinantes na garantia de que, após o período de armazenamento, os espermatozoides estarão em condições de enfrentar os desafios impostos pelo percurso ao longo do trato reprodutivo feminino e, finalmente, fertilizar o oócito.

<sup>1</sup>Correspondência: diego.bucci3@unibo.it

Recebido: 03 de novembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



Desde os primeiros estudos com a criopreservação de gametas, compreendeu-se a necessidade de “desacelerar” o metabolismo celular para “economizar” as fontes de energia e evitar “gastar” a célula antes do momento da IA (Wilmot e Polge, 1971; Wilmot e Polge, 1977). Com o tempo, pesquisas trouxeram uma nova compreensão sobre metabolismo oxidativo e sobre como subprodutos da respiração e metabolismo celular podem causar danos às células em diferentes condições. Este fenômeno foi chamado “estresse oxidativo”, uma condição prontamente associada a processos patológicos, em especial aqueles que envolvem inflamação (Sies, 2018).

Estudos demonstraram que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*, ROS), também chamadas de radicais livres, resulta em danos importantes em biomoléculas e, consequentemente, nas células e nos tecidos. O estresse oxidativo instala-se quando a produção de ROS suplanta a capacidade natural (endógena) antioxidante da própria célula ou tecido, caracterizando assim um desequilíbrio redox (Aitken *et al.*, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2006). Porém, com o tempo, estas moléculas, em muitos casos, também atuam em condições fisiológicas, participando de processos bioquímicos como sinalizadores celulares (Davydov *et al.*, 2018). Entendeu-se, então, que o estresse oxidativo está relacionado com um desequilíbrio redox e não com a produção de ROS *per se*. Nesta revisão, será explorado o papel do estresse oxidativo na preservação de espermatozoides suínos, sendo discutida sua influência na qualidade das doses inseminantes, e abordando as estratégias já validadas para minimização dos danos oxidativos pelo uso de antioxidantes exógenos enzimáticos e não enzimáticos.

### Metabolismo espermático como fonte geradora de ROS

Os espermatozoides de mamíferos em geral, apresentam a via metabólica oxidativa, tendo como fonte principal de energia a frutose, porém a glicose também é utilizada (Jones *et al.*, 1992; Jones e Gillan, 1996). O processamento de monossacarídeos e a subsequente metabolização de compostos derivados de açúcares através da fosforilação oxidativa mitocondrial, constitui a principal forma de produção de energia nos espermatozoides das espécies domésticas (Mann, 1967).

A presença de transportadores de glicose (do inglês *glucose transporters*, GLUT) em espermatozoides suínos foi demonstrada, com destaque para a diversidade de tipos de transportadores desta família, evidenciando a complexidade do mecanismo de captação de hexoses para o ambiente intracelular (Bucci *et al.*, 2011). Uma vez dentro da célula, as hexoses utilizadas na via glicolítica serão metabolizadas, gerando a produção de NADH e FADH<sub>2</sub>, que contribuirão para produção de ATP nas mitocôndrias alocadas na peça intermediária do espermatozoide (Tait e Green, 2012). Contudo, a produção de ATP no espermatozoide suíno e murino não parece acontecer como resultado do equilíbrio entre vias glicolíticas e mitocondriais (oxidativas) (Marin *et al.*, 2003; Mukai e Okuno, 2004).

A incubação de um inibidor da ATP sintase não resultou na redução de ATP em espermatozoides suínos (Ramio-Lluch *et al.*, 2014) de modo que se questiona, assim, a hipótese de que as mitocôndrias do espermatozoide suíno teriam algum outro papel, além da produção de energia, já que fornecem apenas uma parte desta. Um indicativo importante veio de estudos que apontaram que as mitocôndrias podem controlar a motilidade e capacitação de espermatozoides nesta espécie (Ramio-Lluch *et al.*, 2014). Recentemente, foi evidenciado a importância da fosforilação oxidativa mitocondrial para a motilidade total e progressiva rápida de espermatozoides suínos, o que demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados para se aumentar a compreensão sobre a real influência das mitocôndrias na função espermática (Nesci *et al.*, 2020).

As mitocôndrias espermáticas em suínos, também produzem ROS como subproduto da fosforilação oxidativa, mas tal produção é relativamente menor quando comparada com a de outras espécies (Yeste *et al.*, 2013). Este fato é importante uma vez que a composição da membrana plasmática do espermatozoide suíno a torna mais suscetível a dano oxidativo (Cerolini *et al.*, 2000). De qualquer forma, é importante compreender que a fosforilação oxidativa não é uma reação química única. Ela envolve centenas de proteínas e moléculas carreadoras de prótons e elétrons, constituindo uma complexa cascata de reações bioquímicas que não são estequiometricamente balanceadas (Halliwell e Gutteridge, 2006).

O oxigênio atua comoceptor final de elétrons na cadeia transportadora, mas a formação de H<sub>2</sub>O resultante nem sempre é obtida de forma equilibrada, o que acaba gerando a produção de radicais reativos não balanceados como o radical hidroxila [OH] e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Halliwell e Gutteridge, 2006). Estes radicais, se não neutralizados, irão reagir com biomoléculas diversas, causando danos estruturais em lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Um excesso destes danos moleculares pode levar ao comprometimento funcional das estruturas formadas por estas moléculas, o que no caso do

espermatóide normalmente está associada a danos na membrana plasmática, fragmentação do DNA e inativação de proteínas relacionadas à fertilização (Aitken *et al.*, 2016; Aitken *et al.*, 1998).

### Proteção endógena contra o estresse oxidativo

Os espermatozoides são células especializadas em transportar o conteúdo genético masculino através do trato reprodutivo feminino e realizar a fecundação, promovendo assim, a formação de um embrião. Durante a espermatogênese, ocorre a perda de volume celular e de organelas nas células espermáticas que naturalmente possuem um sistema de proteção contra danos oxidativo (Ball, 2011). Como resultado, os espermatozoides possuem baixos níveis de defesa antioxidantes, moléculas capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011a). Assim, cabe ao fluido epididimário e plasma seminal fornecer complexos sistemas enzimáticos antioxidantes, além de outras moléculas capazes de realizar tal neutralização (Argenti *et al.*, 2018; Bustamante-Filho *et al.*, 2009; Bustamante-Filho *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que o plasma seminal pode ser considerado suficiente para proteger os espermatozoides de ataques oxidativo em condições fisiológicas (Jeletzarsky *et al.*, 2008), no qual destaca-se a presença de catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase (Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011a), muitas destas já presentes tanto no espermatozoide como no fluido epididimário (Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011a). Chama-se atenção também para outras proteínas e pequenas moléculas que podem contribuir para formar a denominada capacidade antioxidante total do plasma seminal (Barranco *et al.*, 2015). Até o presente momento não foi definido se as defesas antioxidantes do sêmen suíno apresentam variação sazonal em virtude dos diferentes resultados obtidos em pesquisas com reprodutores na Polônia e Brasil (Argenti *et al.*, 2018; Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011b).

O processamento do sêmen para IA impõe novos desafios na garantia de que a maior parte dos gametas que constituem as doses inseminantes não sejam danificados pelo estresse oxidativo a ponto de perderem sua integridade estrutural e funcional (Figura 1). Inclusive com relação as defesas antioxidantes endógenas, que demonstraram ser reduzidas em situações na quais o processamento seminal é demasiado longo (Barranco *et al.*, 2021). A seguir, serão discutidas as estratégias antioxidantes empregadas para minimizar o estresse oxidativo no espermatozoide suíno processado para IA.

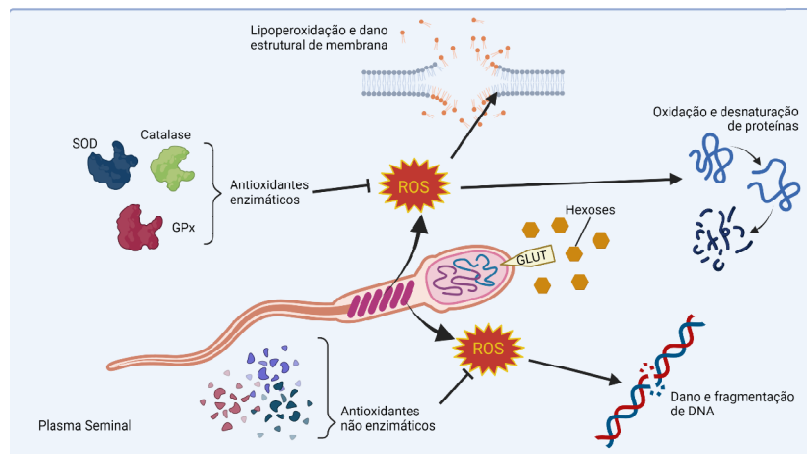


Figura 1.– Representação esquemática dos principais agentes envolvidos com o estresse oxidativo no sêmen suíno.

O espermatozoide suíno utiliza hexoses (frutose e glicose) como fonte metabólica para glicólise, ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa mitocondrial para produção de ATP. Estes processos bioquímicos geram espécies reativas de oxigênio que, quando em maior quantidade que as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, resultam em danos moleculares e estruturais no espermatozoide. Esquema elaborado com a plataforma Biorender (<https://biorender.com/>).

### Uso de antioxidantes em andrologia suína

Diversos estudos avaliaram como a adição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos



podem contribuir com a preservação do sêmen suíno e alguns destes resultados estão compilados na revisão sistemática elaborada por Ribas-Maynou e colaboradores (Ribas-Maynou *et al.*, 2021). Alguns dos compostos que contribuíram para melhoria da qualidade espermática do sêmen refrigerado foram hidroxitolueno butilado (BHT) (Bamba e Cran, 1992), alfa-tocoferol (Cerolini *et al.*, 2000; Zakosek Pipan *et al.*, 2017), fumarato de magnésio (Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2003), albumina sérica bovina (Zhang *et al.*, 2015), taurina (Li *et al.*, 2017), glutatona reduzida (GSH) (Zhang *et al.*, 2016), resveratrol (Sun *et al.*, 2020) e ácido clorogênico (Pereira *et al.*, 2018). Com relação a enzimas antioxidantes, observou-se que a adição de SOD melhorou a motilidade espermática, a viabilidade, a integridade acrossomal, além de reduzir a lipoperoxidação, típica de dano oxidativo em membranas lipídicas de espermatozoides suínos (Zhang *et al.*, 2016).

Os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos também vêm sendo testados nos protocolos de congelamento de sêmen suíno, uma vez que esta é uma biotecnologia ainda mais desafiadora (Torres *et al.*, 2019). Os antioxidantes que apresentaram resultados positivos sobre qualidade do sêmen descongelado ou sobre os índices de fertilidade foram SOD, catalase, cisteína, extratos de alecrim e *Salvia miltiorrhiza*, a-lipoic acid, BHT and *Salvia miltiorrhiza*, N-acetil-LCisteína, BHT e ácido clorogênico (Shen *et al.*, 2015; Trzcinska e Bryla, 2015; Yamaguchi e Funahashi, 2012; Yang *et al.*, 2016). Não obstante, cabe ressaltar que não apenas o tipo de antioxidante suplementado é importante, mas também a concentração utilizada (Ribas-Maynou *et al.*, 2021). A suplementação em doses excessivamente altas pode ser deletéria à fisiologia espermática, uma vez que diferentes processos bioquímicos deste gameta dependem de níveis adequados de ROS (Bansal e Bilaspuri, 2010).

### Considerações finais

Atualmente, todas as formulações comerciais de diluentes para refrigeração e congelamento do sêmen possuem componentes com alguma atividade antioxidante. Infelizmente, devido a questões de proteção intelectual, não se tem acesso à composição completa dos principais diluentes comerciais em uso na suinocultura nacional. Em especial nas formulações para preservação do sêmen de curta, média e longa duração, que são utilizadas com base em necessidades diferentes de proteção e manutenção da viabilidade dos espermatozoides.

Em resumo, técnicos e pesquisadores dedicados à andrologia suína, lidam com o seguinte cenário: a preservação seminal a 17 °C não inibe completamente o metabolismo espermático; logo a produção e concentração de ROS no diluente são potencialmente deletérios à integridade da membrana plasmática, proteínas e DNA espermático (Szymanowicz *et al.*, 2019; Yeste, 2017). Da mesma forma, a criopreservação seminal causa alterações bioquímicas e ultraestruturais nas mitocôndrias dos espermatozoides, resultando em danos oxidativos em organelas como o axonema (Gualtieri *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Assim, a presença de antioxidantes no meio diluente é chave para minimizar ou mesmo evitar os danos dos agentes oxidativos oriundos de mitocôndrias danificadas. Tais exemplos demonstram a importância da suplementação com antioxidante em diluentes de sêmen na espécie suína.

### Referências

- Bortolozzo F, Bernardi M e Bennemann P.** Inseminação Artificial em Suínos. In: Gonçalves PB, Figueiredo JR e Freitas VJF (Ed.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução Animal*, 2008, p.125-145.
- Alkmin DV.** Central de IA em suínos: Uma análise prática do processo de produção de sêmen de alta qualidade. In: XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2019, Gramado. Anais.Gramado, CBRA, p.327-330, 2019.
- Pezo F, Romero F, Zambrano F e Sanchez RS.** Preservation of boar semen: An update. *Reprod Domest Anim*, 54. p.423-434, 2019.
- Strzezek J, Fraser L, Holody D e Wysocki P.** Biochemical properties and usefulness of boar semen for liquid preservation following atropine administration. *Zentralbl Veterinarmed A*, 45. p.459-70, 1998.
- Wilmot I e Polge C.** Recent progress in the deep-freeze preservation of boar semen. *J Reprod Fertil*, 25. p.301-2, 1971.
- Wilmot I e Polge C.** The low temperature preservation of boar spermatozoa. 3. The fertilizing capacity of frozen and thawed boar semen. *Cryobiology*, 14. p.483-91, 1977.
- Sies H.** On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7. p.122-126, 2018.
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J e Gharagozloo P.** Causes and consequences of oxidative



- stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 28. p.1-10, 2016.
- Halliwell B e Gutteridge JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine. p. 2006.
- Davydov VV, Shestopalov AV e Grabovetskaya ER.** Physiological significance of oxidative stress and its role in adaptation of the human body to deleterious factors. *Frontiers in Biology*, 13. p.19-27, 2018.
- Jones AR, Chantrill LA e Cokinakis A.** Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 94. p.129-34, 1992.
- Jones AR e Gillan L.** Metabolism of glycerol 3-phosphate by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 106. p.321-7, 1996.
- Mann T.** Sperm Metabolism. In: Metz Charles B. e Monroy Alberto (Ed.) *Fertilization: Comparative Morphology, Biochemistry, and Immunology*, 1. 1967, p.99-116.
- Bucci D, Rodriguez-Gil JE, Vallorani C, Spinaci M, Galeati G e Tamanini C.** GLUTs and mammalian sperm metabolism. *J Androl*, 32. p.348-55, 2011.
- Tait SW e Green DR.** Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*, 125. p.807-15, 2012.
- Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WN, Boros LG, Fernandez-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodriguez-Gil JE e Cascante M.** Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*, 554. p.342-6, 2003.
- Mukai C e Okuno M.** Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, 71. p.540-7, 2004.
- Ramio-Lluch L, Yeste M, Fernandez-Novell JM, Estrada E, Rocha L, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Concha, II, Ramirez A e Rodriguez-Gil JE.** Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. *Reprod Fertil Dev*, 26. p.883-97, 2014.
- Nesci S, Spinaci M, Galeati G, Nerozzi C, Pagliarani A, Algieri C, Tamanini C e Bucci D.** Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology*, 144. p.82-88, 2020.
- Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, Rigau T e Rodriguez-Gil JE.** Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reprod Fertil Dev*, 25. p.1036-50, 2013.
- Cerolini S, Maldjian A, Surai P e Noble R.** Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, 58. p.99-111, 2000.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z e Irvine DS.** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 59. p.1037-46, 1998.
- Ball BA.** Oxidative stress in sperm. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. e Varner D.D. (Ed.) *Equine Reproduction*, 1, p.991-995, 2011.
- Koziorowska-Gilun M, Koziorowski M, Fraser L e Strzezek J.** Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod Domest Anim*, 46. p.527-33, 2011a.
- Argenti LE, Parmeggiani BS, Leipnitz G, Weber A, Pereira GR e Bustamante-Filho IC.** Effects of season on boar semen parameters and antioxidant enzymes in the south subtropical region in Brazil. *Andrologia*, 50. p. e12951, 2018.
- Bustamante-Filho IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra-Filho CS, Jobim MIM e Mattos RC.** I.C. Bustamante Filho, C.D. Pederzoli, A.M. Sgaravatti, R.M. Gregory, C.S. Dutra Filho, M.I.M. Jobim, R.C. Mattos. *Animal Reproduction*, 6. p.392-399, 2009.
- Bustamante-Filho IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Mattos RC, Dutra-Filho CS e Jobim MIM.** Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 94. p.70-73, 2006.
- Jelezarsky L, Vaisberg C, Chaushev T e Sapundjiev E.** Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology*, 69. p.139-45, 2008.
- Barranco I, Tvarijonavičiute A, Perez-Patino C, Parrilla I, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H e Roca J.** High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci Rep*, 5. p.18538, 2015.
- Koziorowska-Gilun M, Koziorowski M, Strzezek J e Fraser L.** Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reproductive Biology*, 11. p.37-47, 2011b.
- Barranco I, Tvarijonavičiute A, Padilla L, Rodriguez-Martinez H, Roca J e Lucas X.** Delays in



- processing and storage of pig seminal plasma alters levels of contained antioxidants. *Res Vet Sci*, 135. p. 416-423, 2021.
- Ribas-Maynou J, Mateo-Otero Y, Delgado-Bermudez A, Bucci D, Tamanini C, Yeste M e Barranco I.** Role of exogenous antioxidants on the performance and function of pig sperm after preservation in liquid and frozen states: A systematic review. *Theriogenology*, 173. p. 279-294, 2021.
- Bamba K e Cran DG.** Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Reproduction*, 95. p. 69-77, 1992.
- Zakosek Pipan M, Mrkun J, Nemeč Svete A e Zrimsek P.** Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with alpha-tocopherol. *Anim Reprod Sci*, 186. p. 52-61, 2017.
- Szczesniak-Fabianczyk B, Bochenek M, Smorag Z e Ryszka F.** Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol*, 3. p. 81-7, 2003.
- Zhang XG, Yan GJ, Hong JY, Su ZZ, Yang GS, Li QW e Hu JH.** Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17 degrees C. *Reprod Domest Anim*, 50. p. 263-269, 2015.
- Li H, Zhang XG, Fang Q, Liu Q, Du RR, Yang GS, Wang LQ e Hu JH.** Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17 degrees C. *Anim Sci J*, 88. p. 1692-1699, 2017.
- Zhang XG, Liu Q, Wang LQ, Yang GS e Hu JH.** Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. *Anim Sci J*, 87. p. 1195-1201, 2016.
- Sun L, Fan X, Zeng Y, Wang L, Zhu Z, Li R, Tian X, Wang Y, Lin Y, Wu e Zeng W.** Resveratrol protects boar sperm in vitro via its antioxidant capacity. *Zygote*, p. 1-8, 2020.
- Pereira BA, Chaves BR, Teles MC, Pontelo TP, Oliveira CR, de Souza RV, Rodriguez-Gil JE e Zangeronimo MG.** Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15 degrees C. *Andrologia*, 50. p. e12978, 2018.
- Trzcinska M e Bryla M.** Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol J Vet Sci*, 18. p. 473-80, 2015.
- Torres MA, Monteiro MS, Passarelli MS, Papa FO, Dell'Aqua JA, Jr., Alvarenga MA, Martins S e de Andrade AFC.** The ideal holding time for boar semen is 24h at 17 degrees C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology*, 86. p. 58-64, 2019.
- Shen T, Jiang ZL, Liu H e Li QW.** Effect of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on boar spermatozoa during freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*, 159. p. 25-30, 2015.
- Yamaguchi S e Funahashi H.** Effect of the addition of beta-mercaptoethanol to a thawing solution supplemented with caffeine on the function of frozen-thawed boar sperm and on the fertility of sows after artificial insemination. *Theriogenology*, 77. p.926-32, 2012.
- Yang SM, Wang T, Wen DG, Hou JQ e Li HB.** Protective effect of *Rhodiola rosea* polysaccharides on cryopreserved boar sperm. *Carbohydr Polym*, 135. p.44-7, 2016.
- Bansal AK e Bilaspuri GS.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010. p.2010.
- Szymanowicz J, Schwarz T, Murawski M, Malopolska M, Oszczeda Z, Tuz R, Nowicki J e Bartlewski PM.** Storage of boar semen at 16-18 degrees C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater. *Animal Reproduction*, 16. p.864-870, 2019.
- Yeste M.** State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14. p.69-81, 2017.
- Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK e Talevi R.** Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants (Basel)*, 10. p. 2021.
- Zhang B, Wang Y, Wu C, Qiu S, Chen X, Cai B e Xie H.** Freeze-thawing impairs the motility, plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS. *BMC Vet Res*, 17. p.127, 2021.
-