

Importância da adição de antioxidantes ao sêmen criopreservado de carneiros

Matheus Batista de Oliveira^a , Heder Nunes Ferreira^{bc}

^aGraduando em Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo (FPD), Aracaju, SE, Brasil.

^bDocente do curso de Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo (FPD), Aracaju, SE, Brasil.

^cMédico Veterinário do Hospital Veterinário Dr. Vicente Borelli (HVVB), Faculdade Pio Décimo - FPD, Aracaju, SE, Brasil.

RESUMO A criopreservação do sêmen é uma biotécnica da reprodução que permite o armazenamento de recursos genéticos por longos períodos em baixas temperaturas. Esse processo reduz os níveis de antioxidantes endógenos do sêmen, devendo-se adicionar antes da congelação na tentativa de minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio, que são fisiologicamente envolvidas na manutenção da capacidade fertilizante e responsável pela capacitação espermiática, sendo produzidas normalmente pelo metabolismo energético do espermatozoide ou devido adição exógena. Antioxidantes são importantes na redução dos danos causados pela criopreservação, preservando a integridade física e química das células espermiáticas. O objetivo dessa revisão bibliográfica foi identificar as principais classificações dos antioxidantes e verificar metodologias atuais sobre a adição de antioxidantes ao sêmen ovino criopreservado, destacando a importância do uso na redução da lipoperoxidação. As diferentes classes de antioxidantes fornecem resultados satisfatórios para os parâmetros espermiáticos pós-descongelamento de carneiros, quando usados em concentrações ideais, além da análise realizada com ferramentas tecnológicas antigamente não-disponíveis. Conclui-se que pesquisa com antioxidantes no sêmen ovino são realizadas há muito tempo e permanece até os dias atuais, com uma perspectiva de inovação e utilizando substratos antigamente não testados.

PALAVRAS-CHAVE criopreservação; espécies reativas de oxigênio; ovinos; peroxidação lipídica; viabilidade espermiática

Recebido 09 de junho de 2019 Aceito 14 de junho de 2019 Publicado online 22 de junho de 2019

Cite este artigo: Oliveira MB, Ferreira HN (2019) Importância da adição de antioxidantes ao sêmen criopreservado de carneiros. *Multidisciplinary Reviews* 2: e2019010, DOI: 10.29327/multi.2019010

Importance of antioxidant addition in cryopreserved ram sperm

ABSTRACT Semen cryopreservation is reproductive biotechnology that allows the storage of genetic resources for long periods at low temperatures. This process reduces the levels of endogenous semen antioxidants and it should be added before freezing in an attempt to minimize the production of reactive oxygen species, which are physiologically involved in maintaining of fertilizing capacity and responsible for the sperm capacitation, and they are normally produced by the energy metabolism of spermatozoa or due to exogenous addition. Antioxidants are important in reducing the damage caused by the cryopreservation, preserving the physical and chemical integrity of sperm cells. The aim of this literature review was to identify the main antioxidant classifications and to verify current methodologies on the addition of antioxidants to cryopreserved semen of sheep, highlighting the importance of the use in reducing lipoperoxidation. The different classes of antioxidants provide satisfactory results for post-thawed sperm parameters of ram when used at optimum concentrations, in addition to the analysis performed with previously unavailable technological tools. It is concluded that research with antioxidants in sheep semen has been carried out for a long time and remains until the present day, with a perspective of innovation by using previously untested substrates.

KEYWORDS: cryopreservation, reactive oxygen species, sheep, lipid peroxidation, sperm viability

Introdução

Os espermatozoides de carneiros são conhecidos por serem células particularmente sensíveis ao choque frio, devido aos danos induzidos pela formação de cristais de gelo intracelular (Arando et al 2019). Essa susceptibilidade é corroborada pelo baixo número de espermatozoides que sobrevivem após o processo de congelamento-descongelamento e

pela baixa capacidade de fertilização dessas células (Curry e Watson 1994), ou pode ser atribuída ao baixo nível de colesterol, composição fosfolipídica e alta proporção de ácidos graxos insaturados (Evans e Maxwell 1989). Dessa forma, a célula espermática pode sofrer danos causados pela peroxidação lipídica (Nascimento et al 2018), causado pelo desequilíbrio de substâncias antioxidantes e concentrações fisiológicas de oxidantes, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Guerra et al 2004). Altos níveis de ERO em espermatozoides foram associados à diminuição da motilidade (Peris et al 2007; Agarwal et al 2014) resultantes da peroxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática (Gomez et al 1998).

Os espermatozoides e o plasma seminal possuem antioxidantes que auxiliam na viabilidade espermática, entretanto, ao submeter o sêmen à diluição para congelamento, a capacidade defensiva é limitada (Câmara e Guerra 2011).

Existem diferentes classes de antioxidantes, como os naturais e os análogos sintéticos, que a partir do uso isolado ou associado, oferecem resultados satisfatórios nos parâmetros espermáticos de carneiros pós-descongelamento.

Normalmente as ERO são produzidas nas mitocôndrias durante o consumo de oxigênio, quando a água se reduz sequencialmente (Ruiz et al 2007). O espermatozoide é uma célula germinativa que necessita de oxigênio para a manutenção do seu metabolismo. Entretanto, algumas situações podem impor inúmeros danos quando as concentrações dos metabólitos oxidativos estão elevadas. Esses defeitos são resultantes do excesso de ERO, que afetam diretamente a qualidade do sêmen, desde diminuição da motilidade irreversivelmente, inibição do processo respiratório, danos ao DNA espermático e mitocondrial, resultando na redução do potencial fertilizante do espermatozoide (Irvine et al 2000; Valença e Guerra 2007). Para reduzir o quadro de estresse oxidativo, é necessário minimizar a produção de ERO ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis (Andrade et al 2010).

Nesse contexto a realização de estudos que identifiquem a importância da adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros pré-criopreservação é essencial para promover um aumento na qualidade espermática, melhorando viabilidade, capacidade fertilizante e redução dos defeitos ao DNA espermático e mitocondrial.

O objetivo dessa revisão bibliográfica é identificar as principais classificações dos antioxidantes e verificar a eficiência da sua adição ao sêmen ovino criopreservado em pesquisas recentes, destacando a implicação do uso na redução das espécies reativas do oxigênio.

Antioxidantes enzimáticos

As defesas antioxidantes atuam de forma coordenada e balanceada, a fim de proteger o organismo dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo. Especificamente, vão atuar na primeira como redutores na prevenção da formação das ERO e protegendo os espermatozoides da ação tóxica do oxigênio (Chabory et al 2009). Entre os antioxidantes enzimáticos, destaca-se a Superóxido desmutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase.

Superóxido desmutase (SOD)

A SOD tem ação enzimática e desempenha um importante papel antioxidante, catalisando a desmutação do radical superóxido na presença do próton H (Ferreira e Matsubara 1997). Comumente, o processo de criopreservação está associado à diminuição dos níveis orgânicos da SOD (Stefanov et al 2004).

Há uma redução de 65% na atividade da SOD no sêmen ovino criopreservado, quando comparado ao sêmen *in natura* e refrigerado (Marti et al 2008). Em estudo que analisava atividade antioxidativa da SOD em três concentrações diferentes (30, 60 e 120 U/mL) que Stefanov et al (2004) verificaram que a maior concentração foi mais efetiva quando comparada à concentração de (30 U/mL), evidenciando a importância da adição de antioxidantes externos ao meio diluente antes do processo de criopreservação. Similarmente, foi observado que ao adicionar os antioxidantes conhecidos como tempo e tempol em diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 2,5 mM) e temperaturas (35; 25; 15; 10 e 5°C) uma menor intensidade na diminuição da motilidade e viabilidade naqueles com concentrações de 0,5 e 1,0 mM e na temperatura de 5°C, considerada mais crítica para as células espermáticas, além de reduzir à capacitação prematura dos espermatozoides (Santiani et al 2014).

Quadro 1 Efeitos da adição de antioxidantes ao sêmen ovino criopreservado.

Autores/ano de publicação	Título	Objetivo	Desfecho
Arando et al 2019	Efeito de diferentes antioxidantes derivados do azeite (Hidrotirosol/HT e 3,4-dihidroxifenilglicol/DHPG) sobre a qualidade do sêmen de carneiro congelado-descongelado.	Analisar a influência da adição de diferentes concentrações de HT, DHPG e a mistura de ambos para o espermatozoide, a fim de melhorar a qualidade do sêmen de carneiro congelado-descongelado	Os resultados sugerem que a adição de antioxidantes derivados do azeite para congelação em extensor a base Tris oferece proteção significativa contra Peroxidação Lipídica (LPO) da membrana plasmática, com valores semelhantes ao sêmen fresco.
Banday et al 2017	Uso de antioxidantes reduz a peroxidação lipídica e melhora a qualidade espermática em carneiros mestiços durante criopreservação.	Investigar o efeito antioxidante na peroxidação lipídica (LPO) e qualidade do sêmen de carneiro durante a criopreservação.	A taurina, na concentração de 40mM, reduziu a peroxidação lipídica e melhorou a qualidade espermática pós-descongelação de carneiro mestiço, podendo ser recomendada com componentes permanente do extensor à base Tris.
Bucak et al 2013	A refinose e a hipotaurina melhoram os parâmetros espermáticos pós-descongelação de carneiro Merino.	Determinar o efeito da refinose e da hipotaurina em extensores à base de Tris nos parâmetros espermáticos de carneiros durante o processo de congelação-descongelação.	Em comparação ao grupo controle a suplementação com refinose e hipotaurina apresentaram os parâmetros espermáticos mais satisfatórios.
Çoyan et al 2011	Efeito da cisteína e ergotioneina antes da criopreservação nos parâmetros bioquímicos do sêmen de carneiros Merinos.	Determinar o efeito da cisteína e ergotioneina antes da criopreservação nos parâmetros espermáticos e bioquímicos do sêmen congelado-descongelado de carneiros Merino.	A ergotioneina e a cisteína melhoraram os parâmetros espermáticos pós-descongelação de motilidade e atividade mitocondrial, respectivamente.

Catalase (CAT)

A catalase (CAT) é considerada uma heme-proteína responsável pela catálise do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, atuando na detoxificação de diferentes substratos. Sua função antioxidante é minimizar a produção da radical hidroxila (Nordberg e Arnér 2001).

Normalmente, a adição da CAT no processo de criopreservação objetiva a redução dos efeitos deletérios resultantes da técnica, obtendo-se maior quantidade de células viáveis após o armazenamento em nitrogênio líquido (Luz et al 2011). Em estudo realizado por Bucak et al (2008), no qual, verificava o uso da cisteína, observaram que a motilidade do espermática pós-descongelação melhorou a partir da elevação da enzima catalase.

Glutathione peroxidase

A glutationa peroxidase encontra-se no organismo dos mamíferos em quatro formas (GSH-Px1; GSH-Px2; GSH-Px3; GSH-Px4), apenas com função espermiática a unidade GSH-Px4 (Imai e Nakagawa 2003; Alvarez et al 2006).

Esta unidade pode atuar reagindo com o peróxido de hidrogênio, sendo responsável pela preservação da integridade da membrana plasmática contra os danos oxidativos (Alvarez et al 2006), porém todas participam da inibição da peroxidação lipídica (Maneesh e Jayalekshmi 2006).

Antioxidantes não enzimáticos

A relação do uso de álcool com menor adesão ao tratamento em pacientes hipertensos, quando vista na literatura, é majoritariamente confirmada. Embora apresente um considerável número de estudos a respeito, ainda não é uma questão totalmente elucidada e apresenta limitações a respeito da metodologia de análise e possíveis distratores que possam influenciar a pesquisa.

Ácido ascórbico (Vitamina C)

Vitaminas são substâncias orgânicas que, mesmo em pouca quantidade, agem em múltiplos processos metabólicos. O ácido ascórbico ou Vitamina C, é um antioxidante do grupo das lactonas, comumente encontrado nas células animais na forma de ascorbato, e por meio de suas reações de redução, neutraliza as ERO e atua inibindo a peroxidação lipídica (Barreiros et al 2006).

Nesse contexto, a utilização de antioxidantes em diluidores de sêmen, pode melhorar a eficiência contra o dano oxidativo e a criopreservação seminal, haja vista que a alta geração de ERO pode diminuir as defesas antioxidantes.

Peixoto et al. (2008) com intuito de avaliar a eficácia do período de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade espermiática do sêmen de ovinos criopreservados em diluente Tris-Gema que foram suplementados com o ácido ascórbico e Trolox (análogo hidrossolúvel da Vitamina E), concluíram que o ácido ascórbico (600 mM/L) demonstrou menor percentual de células espermiáticas com estresse oxidativo avaliado pelo teste Nitroblue Tetrazolium.

Sonmez e Demirci (2004) estudaram o uso do ácido ascórbico como antioxidante com o objetivo de melhorar as taxas de criopreservação de sêmen ovino, e observaram que a utilização de 5% de glicerol + 1 mg do ácido ascórbico apresentou eficácia na criopreservação do sêmen, aumentando a taxa de motilidade total, assim como a preservação da integridade de membrana acrossomal, resultando em maiores índices de espermatozoides com qualidade estrutural.

α -Tocoferol (Vitamina E)

O α -Tocoferol, também chamado de Vitamina E, é o nome dado a um grupo de antioxidantes naturais lipossolúveis, que tem uma importante função na prevenção dos danos causados pelas ERO e atua removendo uma molécula que os peroxiradicais geralmente reagem ao invés das membranas biológicas, evitando, assim, a degradação lipídica e também o extravasamento de material intracelular (Wolf et al 1998; Batista et al 2007).

O Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2- ácido carboxílico) é um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, geralmente utilizado na preservação de óleos e gorduras animal e vegetal com propriedades antioxidantes (Scott et al 1974). A utilização do Trolox C em sêmen ovino foi eficaz na inibição da lipoperoxidação da membrana plasmática (Sarlos et al 2002). Similarmente, Mata-Campuzano et al (2015) ao analisarem o efeito antioxidante da glutationa redutase, Trolox, crosin ou cisteamina de 1mM em extensor a base de Tris-frutose concluíram que o uso do Trolox pode ser benéfico para o processo de criopreservação. A adição desse análogo do α -Tocoferol em concentrações de 60 e 120 μ M favoreceu maior integridade de membrana plasmática e mitocondrial, assim como melhorando a cinética dos espermatozoides de carneiros pós- descongelamento (Silva et al 2013).

Coenzima Q

A coenzima Q é um antioxidante que atua nas mitocôndrias sobre a cadeia transportadora de elétrons, estando presente em concentrações reduzidas no plasma e em membranas, prevenindo a lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge 1999).

Considerações finais

A adição de antioxidantes no processo de criopreservação garante maior viabilidade e melhora os parâmetros espermáticos em carneiros, mantendo a integridade celular e reduzindo as crioinjúrias. Contudo, o uso em concentrações incorretas pode, ainda assim, promover o estresse oxidativo, contrariando sua finalidade. A inclusão de antioxidantes nas soluções de criopreservação pode minimizar os efeitos deletérios das ERO, reduzindo os efeitos negativos nas membranas plasmática e acrossomal, no potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA. Pesquisas com antioxidantes no sêmen ovino são realizadas há muito tempo e permanece até os dias atuais, com uma perspectiva de inovação e utilizando substratos antigamente não testados.

Referências

- Agarwal AL, Tvrda E, Sharma R (2014) Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12:2-9.
- Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfierim AA (2010) Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 34:79-85.
- Álvarez AL, Serres C, Torres P, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétara C (2006) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 94:89-91.
- Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior A, León JM, Bermúdez-Oria A, Nogales S, Pérez-Marín CC (2019) Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* 86:33-39.
- Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shikari A (2017). Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology* 74:5-30.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29:113-123.
- Batista ES, Costa AGV, Pinheiro-Sant'ana HM (2007) Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Revista de Nutrição* 20:37-43.
- Bucak MN, Ahin AA, Yuce A (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research* 75:128-134.
- Bucak MN, Keskin N, Taşpinar M, Çoyan K, Başpinar N, Cenariu MC, Bilgili A, Öztürk C, Kurşunlu AN (2013) Raffinose and Hypotaurine Improve the Post-Thawed Merino Ram Sperm Parameters. *Cryobiology* 67:34-39.
- Câmara DR, Guerra MMP (2011) Ram semen cooling and criopreservação: damage inherent to technique and influence of medium supplementation with antioxidants at the sperm quality. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 35:33-40.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119:2074-2085.
- Çoyan K, Başpinar N, Bucak MN, Akalin PP (2011) Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology* 63:1-6.
- Curry MR, Watson PF (1994) Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31:39-46.
- Evans G, Maxwell WMC (1989) Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, España: Acribia, S.A. 192p.
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43:61-68.
- De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MMP, Maxwell WMC, O'Brien JK (2007) The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 67:217-227.

- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998) Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology* 21:81-94.
- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC (2004) Role of oxidants and antioxidants in andrology: a review. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 28:187-195.
- Halliwel B, Gutteridge MC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. New York: Oxford University.
- Imai H, Nakagawa Y (2003) Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine* 34:145-169.
- Irvine DS, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology* 21:33-44.
- Luz HKM, Wanderley LS, Faustino LR, Silva CMG, Figueiredo JR, Rodrigues APR (2011) Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 39:1-13.
- Maneesh M, Jayalekshmi H (2006) Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21:80-89.
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, Paz P, Martínez-Pastor F (2015) Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology* 83:520-528.
- Marti E, Marti JI, Muinõ-Blanco T, Cebrián-Pérez JÁ (2008) Effect of the cryopreservation process on the activity and immune localization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Journal of Andrology* 29:459-467.
- Nascimento ALC, Santos ADF, Azevedo HC, Velarde, JMDS, Lima CA, Pereira MA, Gomes LC (2018) Use of aqueous extract of noni in extender for sheep semen freezing. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 70:1547-1556.
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 31:1287-1312.
- Peixoto ALVA, Monteiro Jr PLJ, Câmara DR, Valença RMB, Silva MMG, Guerra MMP (2008) Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. *Ciência Veterinária nos Trópicos* 11:16-24
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL (2007). Impact of Cryopreservation and Reactive Oxygen Species on DNA Integrity, Lipid Peroxidation, and Functional Parameters in Ram Sperm. *Molecular Reproduction and Development* 74:878-892.
- Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N, Risopatrón J, Villegas J, Sánchez R (2014). Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 82:884-889.
- Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor GY, Rátky J (2002) Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica* 50:235-245.
- Scott JW, CORTW M, Harley H, Parrish DR, saucy G (1974) 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 51:200-203.
- Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP (2013) Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 137:37-44.
- Sonmez JL, Dermici MJ (2004) The Effect of Ascorbic Acid on the Freezability of Ram Semen Diluted with Extenders Containing Different Proportions of Glycerol. *Turk Journal Veterinary Animal Science* 28:893-899.
- Stefanov R, Angelova M, Stefanova T, Subev M, Dolashka P, Voelter W, Zachariev Z (2004) Cu / Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions *in vitro*. *Andrologia* 36:51-56.
- Ruiz LG, Santiani AA, Sandoval RM, Huanca WL, Delgado AC, Coronado LS, Alzamora CP (2007) Efecto De Dos Antioxidantes (Tempo Y Tempol) En La Criopreservación De Semen Ovino Empleando Un Dilutor En Base a Tris. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 18:99-106.
- Wolf R, Wolf D, Ruocco V (1998) Vitamin E: the radical protector. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology* 10:103-117.
- Valença, RMB, Guerra MMP (2007) Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31:47-53.