

**Efeito da adição de diferentes antioxidantes em diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen e a produção *in vitro* de embriões bovinos**

**Effect of adding different antioxidants in cryopreservation diluents on semen quality and *in vitro* production of bovine embryos**

**Efecto de agregar diferentes antioxidantes en diluyentes de crioconservación sobre la calidad del semen y la producción *in vitro* de embriones bovinos**

Recebido: 31/05/2020 | Revisado: 25/06/2020 | Aceito: 13/07/2020 | Publicado: 30/07/2020

**Natália do Carmo Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3709-9844>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Brasil

E-mail: nataliazootec@hotmail.com

**Thaísa Campos Marques**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-6699>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Brasil

E-mail: thaisacm@hotmail.com

**João Teodoro Pádua**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0888-7972>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: teodoro@ufg.br

**Karen Martins Leão**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5236-7558>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Brasil

E-mail: karen.leao@ifgoiano.edu.br

**Resumo**

A qualidade das amostras de sêmen é fundamental para o sucesso dos programas de inseminação artificial em bovinos. Torna-se imprescindível a manutenção das características dos espermatozoides por meio de adequado processo de criopreservação. No entanto, os processos de criopreservação resultam na formação contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são prejudiciais aos espermatozoides, pois induz a apoptose com consequente redução da qualidade espermática. Dessa forma, têm sido acrescidos aos crioprotetores substâncias antioxidantes como a glutatona e a melatonina, as quais tem como

intuito minimizar os efeitos deletérios causados pelas EROS aos espermatozoides, resultando em melhor qualidade espermática, com conseqüente aumento das taxas de fertilização *in vitro*. Diante disso, a presente revisão tem por objetivo analisar os efeitos da adição dos antioxidantes glutatona e melatonina em diferentes meios de criopreservação e a produção *in vitro* de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Espermatozoides; Estresse oxidativo; Fertilização; Touro.

### **Abstract**

The quality of semen samples is extremely important for the success of artificial insemination programs in cattle. Thus, it is essential to maintain the characteristics of spermatozoa through an adequate cryopreservation process. However, cryopreservation processes result in the continuous and excessive formation of reactive oxygen species (EROS), which are harmful to sperm, as it induces apoptosis with a consequent reduction in sperm quality. Thus, cryoprotectants have been added to antioxidant substances such as glutathione and melatonin which aim to minimize the deleterious effects caused by EROS to sperm, resulting in better sperm quality, with a consequent increase in *in vitro* fertilization rates. Therefore, the present review aims to analyze the effects of the addition of antioxidants glutathione and melatonin in different media of cryopreservation and *in vitro* production of bovine embryos.

**Keywords:** Sperm; Oxidative stress; Fertilization; Bull.

### **Resumen**

La calidad de las muestras de semen es extremadamente importante para el éxito de los programas de inseminación artificial bovina. Por lo tanto, es esencial mantener las características de los espermatozoides a través de un proceso de crioconservación apropiado. Sin embargo, los procesos de crioconservación dan como resultado la formación continua y excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROS), que son perjudiciales para los espermatozoides, ya que inducen la apoptosis con la consiguiente reducción en la calidad de los espermatozoides. Por lo tanto, se han agregado crioprotectores a sustancias antioxidantes como el glutatión y la melatonina que tienen como objetivo minimizar los efectos nocivos causados por EROS al esperma, lo que resulta en una mejor calidad del esperma, con el consiguiente aumento de las tasas de fertilización *in vitro*. Por lo tanto, la presente revisión tiene como objetivo analizar los efectos de la adición de antioxidantes glutatión y melatonina en diferentes medios de criopreservación y producción *in vitro* de embriones bovinos.

**Palabras clave:** Esperma; Estrés oxidativo; Fertilización; Toro.

## 1. Introdução

Amostras de sêmen de boa qualidade são fundamentais para o sucesso nas biotécnicas da reprodução. Para isso, é necessária adequada manutenção da viabilidade espermática por meio dos processos de criopreservação (diluição, refrigeração, congelamento, armazenamento e descongelamento), especialmente da diluição seminal (Chaveiro et al., 2006).

A gema de ovo que é um dos constituintes mais utilizados para congelação do sêmen bovino, tem sua utilização discutida por possuir substâncias que inibem a respiração das células espermáticas podendo levar a redução da motilidade, e ao grande risco de contaminação microbiológica, por se tratar de um produto de origem animal (Najafi et al., 2013). Em decorrência disso, atualmente tem sido avaliada a sua substituição por produtos de origem vegetal como a lecitina de soja que, apesar de ser amplamente utilizada, necessita de maiores estudos, pela menor capacidade de manutenção da viabilidade espermática (Forouzanfar et al., 2010).

Durante o processo de criopreservação das amostras de sêmen, há produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são prejudiciais aos espermatozoides, pois induz a lipoperoxidação, apoptose, danos ao DNA com conseqüente redução da qualidade espermática, uma vez que a membrana espermática possui altas concentrações de lipídios e proteínas que são altamente susceptíveis as EROS (Asma-ul-husna et al., 2017). Em contrapartida, baixas concentrações de EROS são responsáveis pela regulação de eventos fisiológicos das células (Kothari et al., 2010).

Substâncias antioxidantes vêm sendo acrescentadas aos meios diluentes com o intuito de minimizar os efeitos deletérios causados pelas EROS aos espermatozoides de várias espécies, inclusive a bovina. Antioxidantes, tais como a glutathione e melatonina retardam a velocidade de oxidação por meio da manutenção da produção de EROS em níveis fisiológicos (Ashok et al., 2014).

A glutathione é um dos antioxidantes mais estudados na criopreservação do sêmen bovino, e reduz os danos causados à membrana do espermatozoide pelos radicais livres aumentando a viabilidade da célula, com conseqüente, melhora do potencial de fertilização. Também têm sido observados melhores resultados de viabilidade espermática com a adição de outros antioxidantes, como a melatonina, que é um hormônio secretado pela glândula pineal que desempenha importante função na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais (Reiter et al., 2013).

Várias pesquisas tem sido realizadas buscando maior qualidade espermática, mas também há uma preocupação com o desenvolvimento de estudos que visem a maior produção embrionária *in vitro*, sendo de suma importância amostras de sêmen de melhor qualidade. De acordo com Alomar et al. (2008) o gameta masculino é responsável por uma diferença significativa no desenvolvimento embrionário e possui alta influência no sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Estudos recentes avaliaram a adição de antioxidantes nas etapas da PIVE, na tentativa de reduzir os danos causados aos ovócitos pelas EROS durante as fases de desenvolvimento. Desse modo, é necessário também avaliar o potencial fertilizante *in vitro* das células espermáticas criopreservadas com diferentes antioxidantes (Remião et al., 2016).

Deste modo, objetiva-se revisar estudos referentes a ação dos antioxidantes melatonina e glutathiona em diferentes crioprotetores sobre a qualidade do sêmen e a produção *in vitro* de embriões bovino. Além disso, apresentar diversos resultados que demonstrem que a adição de antioxidantes e diferentes crioprotetores podem reduzir as injúrias causadas pelo processo de criopreservação submetido aos espermatozoides, resultando em alta qualidade espermática e melhor produção de embriões bovinos.

## **2. Metodologia**

A metodologia utilizada para a elaboração deste estudo trata-se de uma revisão qualitativa descritiva, pois inclui informações relevantes para interpretação dos dados coletados de modo a contribuir com o saber na área do conhecimento (Pereira et al., 2018).

A pesquisa para esta revisão iniciou-se a partir de uma seleção e organização bibliográfica a respeito dos diferentes crioprotetores e antioxidantes adicionados aos meios para redução dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio resultantes do processo de criopreservação. Além disso, incluiu literaturas científicas que buscam diferentes metodologias e técnicas para o maior conhecimento dos fenômenos que ocorrem nas diversas áreas científicas. O artigo apresenta também dados atuais importantes, contendo referências de estudos internacionais e nacionais.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1 A célula espermática

Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos dos testículos por meio da divisão e transformação das células germinativas (Chenoweth et al., 2014). São células altamente polarizadas e especializadas que perdem a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese, tornando-se apta à fecundação do ovócito e formação do zigoto (Alberts et al., 2010).

Os espermatozoides são divididos morfológicamente em cabeça, peça intermediária e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e um conjunto de elementos citosólicos reduzido, dividindo região acrossomal, região pós-acrossomal e segmento equatorial. A cauda é subdividida em peça intermediária, principal e final (Varner et al., 2015).

A membrana plasmática do espermatozoide é a estrutura mais susceptível a modificações durante os processos de criopreservação, sendo de extrema importância a integridade para que os espermatozoides estejam aptos à fecundação (Borges et al., 2011).

A mesma engloba toda a célula espermática e define os limites mantendo a diferença entre citosol e ambiente extracelular. É composta por camadas lipídicas e proteicas unidas por ligações não covalentes, permitindo assim que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas se movam lateralmente no plano da membrana. Dentre os constituintes estão fosfolipídios, colesterol, glicolipídios, carboidratos e diferentes tipos de proteínas (Flesh & Gadella, 2000).

A membrana exerce papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide, pois é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase e resultar em morte celular (Alberts et al., 2010).

Os fosfolipídios quando submetidos a redução de temperatura, assumem forma cônica, em que as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma hexagonal II e/ou micela invertida. Quando a membrana está em transição, passando da fase fluida para fase cristalina, as micelas presentes nos lipídios são invertidas, 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 (Khosrowbeygi et al., 2007).

A proporção de colesterol:fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. A resistência ao choque frio é maior nas espécies em que a proporção colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática são altos. O colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, estabilizando a membrana, enquanto os glicolipídios estão localizados na superfície da membrana, sendo responsáveis pela transição das fases de congelação e descongelação (Pinho et al., 2016).

De acordo com todas as características da membrana do espermatozoide é de fundamental importância a manutenção da integridade, pois é um fator determinante no potencial de fecundação.

### **3.2 Criopreservação**

O processo de criopreservação espermática possibilita o uso de amostras de sêmen por períodos relativamente longos, reduz riscos e custos com aquisição de reprodutores, além de favorecer a rápida difusão do material genético (Castelo et al., 2008). O uso do sêmen congelado permite maior aproveitamento de animais com alto potencial genético, transporte do sêmen para várias localidades, formação de bancos de germoplasma tanto de animais que correm risco de extinção como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução, por danos ocasionados durante o manejo dos animais, e também possibilita replicar características de determinados grupos genéticos ao longo do tempo (Leite et al., 2011).

As células espermáticas não são adaptadas para as variações de temperatura que ocorrem durante o processo de criopreservação, que resultam em várias alterações a célula espermática. Alterações essas, causadas na motilidade e estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. O resfriamento do sêmen é realizado entre 30°C e 0°C e induz ao estresse letal para algumas células que é proporcional à taxa de resfriamento, devido o intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, sendo geralmente mais severo na faixa de 2 a 12°C. Esse fenômeno é conhecido como choque frio, que afeta as espécies (Watson, 2000).

O choque frio é verificado pela presença de espermatozoides em movimentos circulares ou apresentando motilidade espermática alterada (movimento retrogrado, presença de peças intermediárias dobradas), e demais alterações como a perda da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares (Watson, 2000).

Com o intuito de reduzir os danos causados as células espermáticas sobre os processos de criopreservação, são necessários adequados protocolos de refrigeração e congelação do sêmen. E mesmo no resfriamento lento, a mudança da temperatura causa estresse sobre a membrana, por causa da mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. Esses estresses sobre a membrana podem ocorrer em temperaturas abaixo de 0°C, uma vez que as mudanças de fase não estão completas a 0°C. Sabe-se que no sêmen bovino a maior mudança de fase ocorre entre 5 e 15°C, intervalo de temperatura em que o espermatozoide está mais susceptível a injúrias (Agca & Critser, 2002).

A congelação dos espermatozoides abaixo de 0°C em taxa lenta promove maior entrada de água na célula, ao contrário do que ocorre quando o resfriamento é realizado numa taxa rápida. Dessa forma um resfriamento muito lento pode levar a desidratação celular muito intensa, enquanto, um resfriamento muito rápido é insuficiente para permitir a entrada de água nas células, e acarreta a formação de cristais de gelo intracelular. A taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida, proporcionando a retirada de água suficiente e não excessiva da célula, e pode levar a formação de cristais de gelo intracelulares pequenos e não letais, proporcionando boas condições de sobrevivência da célula após o reaquecimento (Agca & Critser, 2002).

O descongelamento desses cristais causa a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Porém, se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rápido e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática. As células congeladas em curva rápida necessitam de uma mesma curva de descongelamento, pois deste modo o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não consegue se recrystalizar (Holt, 2000).

### **3.2.1 Crioprotetores**

Somente o plasma seminal não é capaz de proteger adequadamente os espermatozoides contra mudanças de temperatura. Para o sêmen ser estocado em baixas temperaturas é necessário que os mesmos sejam acrescidos de diluidores especiais e apropriados. A composição dos meios diluidores apresenta grande influência sobre a sobrevivência espermática, sendo de extrema importância que ocorra interação entre os componentes do meio e as curvas de refrigeração/congelação (Chaveiro et al., 2006).

Agentes crioprotetores são solventes orgânicos utilizados na composição de diluentes seminais com a finalidade de proteger as células e/ou tecidos contra as injúrias causadas pela



desidratação e resfriamento durante o processo de criopreservação. Essas substâncias são importantes para evitar a formação de gelo intracelular, redução do estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular e a interação com íons e macromoléculas (Viveiros, 2005).

Além disso, os mesmos possuem fator limitante para o sucesso da criopreservação das células que é a toxicidade, principalmente quando utilizados de forma inadequada (Fahy, 2010).

O glicerol é o primeiro crioprotetor intracelular utilizado com sucesso na maioria das espécies e trata-se de um álcool poli-hídrico, com seis sítios de ligação incluindo a molécula de água e mesmo possuindo baixa permeabilidade em comparação a outros crioprotetores, é considerado eficiente, pois torna mais lenta a desidratação celular durante a criopreservação ao se ligar à água. No entanto, são necessários cuidados com a dosagem utilizada, uma vez que altas concentrações são tóxicas às células espermáticas (Glazar et al., 2009).

A gema de ovo é um dos agentes mais efetivos para proteção extracelular dos espermatozoides contra o choque frio e demonstrou melhora nas funções espermáticas e preservação da fertilidade após o armazenamento na forma líquida ou congelada. Quando presente nos meios diluentes, a gema de ovo permite a redução da concentração do glicerol reduzindo a possível toxidez das células. Grande parte dos diluentes utilizados na criopreservação de espermatozoides bovinos contém em torno de 20% de gema de ovo (Snoeck et al., 2007).

A utilização destes diluidores à base de gema de ovo é recomendada pela excelente proteção dos espermatozoides. No entanto, o uso de composto de origem animal como a gema de ovo e leite estão sendo restringidos em alguns países, por razões imunológicas e riscos microbiológicos por meio da transmissão de doenças. Além da dificuldade de padronização desses componentes utilizados na criopreservação do sêmen bovino (Stradaioli et al., 2007).

Desse modo, estudos recentes estão em andamento com o objetivo de desenvolver diluentes livres de produtos de origem animal. Segundo Pugliesi et al. (2012) além das preocupações sanitárias quanto ao uso de produtos de origem animal, tanto a gema como o leite desnatado podem alterar a integridade estrutural e funcional pós-descongelação. E com base nessas questões a indústria de reprodução artificial tem buscado novos produtos em substituição aos de origem animal, sendo os mais utilizados atualmente a lecitina de soja (Singh et al., 2013).

A lecitina é uma fosfatidilcolina poli-insaturada, que contém componentes para funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas. É extraída dos grãos de



soja, sendo constituída de fosfolípídeos, triglicérideos e outras substâncias derivadas das refinarias de óleo (Seidman et al., 2002). A lecitina de soja vem sendo acrescida aos meios de criopreservação na forma de nanopartículas, sendo essas caracterizadas por pequenas micelas que permitem uma melhor interação e revestimento da membrana espermática reduzindo assim os danos causados pelo choque frio e demais eventos causados pelos processos de refrigeração e congelamento (Nadri et al., 2019).

No entanto, alguns estudos ressaltam que diluentes acrescidos de lecitina de soja apresentam menor eficiência sobre a criopreservação de sêmen bovino, devido a baixa quantidade de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na composição. Tais são moleculares, estruturais e lipoproteínas suficientes para ligarem-se a maioria das moléculas de proteínas-BSP e sofrerem a peroxidação lipídica sem que as proteínas da membrana estejam envolvidas (Forouzanfar et al., 2010).

Dentre os primeiros diluidores disponíveis, compostos por lecitina de soja, estão os Biociphos-Plus® (IMV®, L'Aigle, France), Andromed® (Minitub®, Tiefenbach, Germany) e Bioxcell® (Biodux, São Paulo) (Nadri et al., 2019).

Apesar da lecitina de soja ser apresentada como alternativa para obtenção de diluidores seminais livres de contaminação biológica e quimicamente padronizados, atualmente, os diluentes constituídos de gema de ovo são os mais eficientes na manutenção da capacidade fecundante da célula espermática (Crespilho et al., 2012).

Neste intuito, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a adição da lecitina de soja nos diluentes do sêmen bovino (Muino et al., 2007), de búfalos (Akhter et al., 2010), ovinos (Toker et al., 2016) e equinos (Papa et al., 2011). Entretanto, como a função crioprotetora da lecitina no sêmen bovino ainda é bastante discutida, são necessários maiores estudos sobre a real ação desse componente sobre a viabilidade espermática.

Singh et al. (2018) ao comparam o efeito de diferentes diluentes, sendo a base de gema de ovo, lecitina de soja e Optixell (sem proteína animal), sobre a qualidade do sêmen de búfalos pós-descongelamento e a taxa de concepção, verificaram que o diluente a base de lecitina de soja resultou em altos parâmetros de motilidade total e velocidade curvilínea quando comparado aos demais diluentes avaliados.

O mesmo foi verificado por Nadri et al. (2019) que ao avaliarem o efeito de diferentes diluentes, sendo a base de nano lecitina de soja e um diluente comercial a base de lecitina de soja em diferentes concentrações (1, 2, 3 e 4% de lecitina de soja) e o diluente a base de gema de ovo (15% de gema), sobre a qualidade e a fertilização *in vitro* do sêmen ovino. Verificaram

que o maior percentual de motilidade e menor índice de apoptose das células foram verificados no tratamento à base de nano lecitina de soja a 1% e a 4% quando comparado com os demais tratamentos, sendo verificada maior significância na concentração de 2% de lecitina. Não sendo verificada diferença entre os meios quanto a fertilização *in vitro* do sêmen ovino.

Salmani et al. (2014) e Vidal et al. (2013) sugerem o uso de 0,04 e 0,08% de lecitina de soja na criopreservação do sêmen de carneiros, pois demonstrou resultados satisfatórios quanto a manutenção espermática do sêmen de carneiros com esses percentuais avaliados.

### **3.3 Espécies reativas de oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas a partir da reação de redução das moléculas de oxigênio. Essas substâncias apresentam número ímpar de elétrons instáveis e altamente reativos, devido tanto a ação direta com moléculas de oxigênio, respiração celular, quanto a fatores externos como ação da luz. Uma vez, sob condições de estresse oxidativo, a célula perde elétrons, tornando-se uma molécula instável. Na tentativa de se tornar estável, há um aumento dos radicais livres causando total desequilíbrio no ambiente celular denominado de estresse oxidativo (Nordberg, 2001).

As espécies reativas ao oxigênio também estão envolvidas em várias funções espermáticas essenciais como a função cinética, que permite a movimentação espermática pelo trato reprodutivo da fêmea. Promove a capacitação, função fusogênica, hiperativação, reação acrossômica, ligação espermática a zona pelúcida, além de promover a estabilização da cápsula mitocondrial na peça intermediária dos espermatozoides bovinos (Gonçalves et al., 2010).

A ação das EROS tem sido estudada na fisiologia da reprodução, embora envolvidas no controle fisiológico de algumas funções espermáticas, a produção excessiva se torna prejudicial uma vez que os espermatozoides são altamente susceptíveis as lesões oxidativas, resultando em perdas irreversíveis, por meio da peroxidação lipídica da membrana celular, oxidação das proteínas e danos ao DNA (Aitken et al., 2012).

Os danos causados pelo estresse oxidativo resultam no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a falta de sistemas antioxidantes adequados. Desta maneira, é considerada uma das causas frequentes da redução da qualidade espermática e lesões no DNA da célula, sendo também um fator associado a baixa fertilidade e baixa produção de embriões normais (Guthrie et al., 2012).

O impacto do estresse oxidativo durante o processo de armazenamento seria minimizado através da suplementação dos meios diluentes com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade das amostras de sêmen (Michael et al., 2009). Nesse sentido, diversos antioxidantes têm sido adicionados aos meios como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione, melatonina, resveratrol dentre outros, utilizados como estratégia para melhorar a viabilidade dos diluentes de criopreservação (De graaf et al., 2007).

### **3.4 Antioxidantes**

Durante o processo da criopreservação do sêmen ocorre redução da motilidade espermática, integridade acrossomal, viabilidade e potencial fertilizante em função da peroxidação lipídica desencadeada pelas EROS, tendo em vista os altos níveis de fosfolípidos e ácidos graxos saturados e poli-insaturados (Ball, 2008).

Enzimas removedoras de EROS, como a superóxido dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase ou catalase, já foram detectadas no espermatozoide e no plasma seminal de várias espécies, incluindo ovinos (Bucak et al., 2008), caprinos (Bucak et al., 2009) e bovinos (Sariözkan et al., 2009). Conforme descrito por diversos autores, inúmeros antioxidantes compostos podem ser encontrados tanto no plasma seminal quanto no espermatozoide de várias espécies. Contudo, devido aos processos de criopreservação os mesmos são reduzidos pelas técnicas utilizadas para armazenamento.

Deste modo, ressalta-se a importância da adição de antioxidantes aos meios de congelamento do sêmen, visando maior proteção aos espermatozoides contra os efeitos lesivos causados pelas EROS no processo de criopreservação (Guerra et al., 2004).

#### **3.4.1 Glutathione**

O antioxidante glutathione está presente em grande maioria das células, na forma reduzida (GSH), predominante no meio intracelular, ou oxidada (GSSG) como dissulfeto resultante da oxidação da GSH após exposição ao agente oxidante. É utilizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) para reduzir o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água, formando a GSSH. Logo após, a GSSH é reduzida a GSH pela glutathione reductase, utilizando a fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) como co-fator (Gadea et al., 2011).

A GSH é um potente antioxidante e atua na remoção dos radicais livres, como o peróxido de hidrogênio, que lesa as células espermáticas, reduz a viabilidade e o potencial

fertilizante das mesmas. É considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante protegendo as células das lesões causadas por radiação e luz ultravioleta (Nehring et al., 2003). E o mesmo vem sendo acrescido aos meios de criopreservação visando maior qualidade espermática.

Mousavi et al. (2019) compararam a adição dos antioxidantes glutatona nas concentrações de 0,5; 1; 2 e 3 mM, e adição de vitamina E nas concentrações de 0,1 a 1,0 mM em diluente a base de lecitina sobre a qualidade do sêmen bovino e a capacidade de produção embrionária *in vitro*. E concluíram que a adição de 1,0 mM de glutatona proporcionou melhor qualidade ao sêmen bovino, bem como melhor fertilidade *in vitro* dos touros.

Shah et al. (2017) ao avaliarem a adição de glutatona na criopreservação do sêmen bovino, verificaram que a adição de 0,5 mM de glutatona no diluente à base de gema proporcionou aumento da porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial e reduziu o percentual de espermatozoides com DNA fragmentado. E ressaltaram que a glutatona favorece a sobrevivência dos espermatozoides, atuando diretamente nas vias apoptóticas e de criocapacitação.

### 3.4.2 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida especialmente de forma endógena a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, sendo produzida por todas as espécies de mamíferos (Haldar et al., 2010). Além disso, a melatonina estimula a atividade de outras enzimas antioxidantes como a SOD, GPx, glutatona redutase e catalase (Tamura et al., 2008).

Em condições fisiológicas, a melatonina regula a expressão de genes relacionados a importantes enzimas antioxidantes, que estão envolvidas no metabolismo de derivados oxidativos prejudiciais às células e ainda induz a síntese de outros antioxidantes endógenos (Rodriguez et al., 2004).

Alguns estudos mostram a ação da melatonina sobre a maturação e cultivo *in vitro* de ovócitos (Remião et al., 2016). Porém, a ação sobre a qualidade espermática no sêmen bovino quanto ao efeito antiapoptótico ainda não está totalmente elucidada.

Souza et al. (2016) avaliaram a adição de melatonina no diluente a base de gema de ovo em diferentes concentrações, sendo os tratamentos: Controle; 100 pM; 100 nM; 100 µM e 1 mM de melatonina. E verificaram que a adição de melatonina a 100 nM reduziu a ação das

espécies reativas quando comparado aos demais tratamentos. Concluindo que a adição de melatonina ao diluente de criopreservação do sêmen ovino melhorou as taxas de fertilização.

ChaithraShree et al. (2019) avaliaram a adição de melatonina no sêmen bovino na concentração de 0,1, 0,2 e 0,25 mM de melatonina e verificaram que a adição de melatonina na concentração de 0,1 e 0,25 mM proporcionou maior proteção a membrana plasmática com maior percentual das características de velocidade e vigor.

### **3.5 Produção *in vitro* de embriões**

A PIVE é uma biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o ovócito fora do trato reprodutivo da fêmea, formando assim um novo indivíduo. Este processo envolve as etapas de coleta dos ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões (Gonçalves et al., 2008).

A coleta de ovócitos para produção *in vitro* de embriões pode ser realizada por meio de diversas técnicas. Há décadas, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem apresentado maior flexibilidade e tem sido a melhor opção para a recuperação de ovócitos *in vivo* na espécie bovina (Andrade et al., 2012).

Após a recuperação dos ovócitos, são realizados os processos de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* em laboratório. Durante a maturação ocorre uma série de mudanças no citoplasma e núcleo das células que possibilitam sua fecundação, podendo se desenvolver até blastocisto.

Durante os processos de produção embrionária há formação de espécies reativas de oxigênio, que atuam diretamente sobre as células resultando em menores taxas de desenvolvimento embrionário. Com o intuito de reduzir a ação das EROS sobre os ovócitos e embriões na PIVE, diversos antioxidantes vêm sendo testados (Feugang et al., 2004).

Em geral, o efeito dos diferentes antioxidantes é dose dependente e alguns estudos mostram que as concentrações que resultaram em melhor qualidade embrionária e taxas de blastocistos não foram significativamente maiores, podendo ser explicado pelo fato das EROS representar papel fundamental em alguns processos fisiológicos (Takada et al., 2012).

Remião et al. (2016) ao avaliarem a utilização de nanocápsulas de melatonina nas etapas de maturação de ovócitos bovinos, verificaram melhor maturação dos mesmos. Ressaltaram ainda que o uso de melatonina encapsulada tem efeito superior na maturação dos ovócitos *in vitro* quando comparada com a melatonina normalmente utilizada.

Cavallari et al. (2019) avaliaram o efeito da melatonina na concentração de 1  $\mu\text{M}$  sobre a produção de espécies reativas de oxigênio durante a maturação de oócitos bovinos expostos a alta temperatura na maturação (41°C). E verificaram que a melatonina reduziu a produção de EROS dos oócitos submetidos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*.

Peng et al. (2019) também verificaram que a melatonina na concentração de 0 a 100  $\mu\text{M}$  demonstrou efeito positivo na proteção dos oócitos sobre as espécies reativas de oxigênio durante a fertilização *in vitro*, resultante em melhor qualidade e quantidade de blastocistos produzidos.

No entanto, maiores estudos sobre a concentração adequada de antioxidantes, principalmente a melatonina, adicionada aos crioprotetores de sêmen bovino, assim como elucidaciones a respeito de diluidores vegetais, são necessários para posterior utilização na produção *in vitro* de embriões.

#### 4. Considerações Finais

O processo de criopreservação induz a alta produção de espécies reativas de oxigênio, sendo as mesmas uma das principais causas da redução na qualidade espermática e na produção *in vitro* de embriões bovinos. No entanto, vários estudos tem sido desenvolvidos buscando uma concentração de antioxidantes e meios de criopreservação adequados que possibilitem maior desenvolvimento espermático e embrionário. Assim, ainda são necessárias novas pesquisas quanto ao uso de diferentes diluidores e demais antioxidantes na criopreservação dos espermatozoides com ênfase na produção *in vitro* de embriões e até mesmo acréscimo de antioxidantes aos meios de maturação dos possíveis embriões buscando melhores taxas de desenvolvimento embrionário.

#### Referências

- Agca, Y., & Critser, J. K. (2002). Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. *Seminars in Reproduction Medicine*, 20 (1), 15-23. doi.org/10.1055/s-2002-23516.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., & Roberts, K. W. P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmerd.

Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M., Iqbal, S., & Ullah, N. (2010). Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell®. *Theriogenology*, 74 (6), 951–5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.024.

Aitken, R. J., & Jones, K. T. R. S. (2012). Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J Androl*, 33 (6), 1096–106. doi:10.2164/jandrol.112.016535.

Alomar, M., Mahieu, J., Verhaegue, B., Defoin, L., & Donnay, I. (2008). Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing differ abilities to promote embryo development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 18, 395-402. doi:10.1071/rd05132.

Andrade, G. A., Fernandes, M. A., Knychala, R. M., Bonato, G. L., & Santos, R. M. (2012). Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprodução Anim*, 36 (1):66–9. Retrieved May 12, 2020, from <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n1/pag66-69.pdf>.

Ashok, A., Gurpriya, V., Chloe, O., & Du plessis, S. S. (2014). Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Heal*, 32 (1), 1–17. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1

Asma-ul-Husna, A. U. H., Ansari, M. S., Allah Rakha, B., Ejaz, R., Ullah, N., & Akhter, S. (2017). Melatonin supplementation in extender enhances the post thaw quality of buffalo bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, 49 (1), 163–167. doi.org/10.17582/ journal.pjz/2017.49.1.163.167.

Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, 107 (3–4), 257–67. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014.

Borges, J. C., Silva, M. R., Guimarães, J. D., Esper, C. R., & Franceschini, P. H. (2011). Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev Bras Reprodução Anim*, 35 (3), 303–14. Retrieved April 8, 2020, from <http://cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n3/pag303-314.pdf>.

Bucak, M. N., & Atessahin, A. Y. A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress



parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Rumin Res*, 75 (2–3), 128–34. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002.

Bucak, M. N., Sariözkan, S., Tuncer, P. B., & Ulutas, P. A. A. H. (2009). Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Rumin Res*, 81 (2–3), 90–5. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.11.011.

Castelo, T. S., Frota, T. R., & Silva, A. R. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinária Bras*, 2, 67–75. doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885

Cavallari, F. C., Leal, C. L. V., Zvi, R., & Hansen, P. J. (2019). Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. *Zygote*, 27 (3), 180–186. doi:10.1017/S0967199419000236.

Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., & Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. *Theriogenology*, 65 (9), 1875–1890. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.017

ChaithraShree, A. R., Shailesh, D. I., Vikas, D. D., Anagha, S. N., Simin, V. B., Nilesh, R. D., Prakash, M. K., & Shambhudeo, D. K. (2019). Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. *Vet Med Sci*, 6 (2), 177–186. doi.org/10.1002/vms3.224.

Chenoweth, P. J., & Lorton S. P. (2014). *Animal Andrology: Theories and Applications*. Boston, USA, 1<sup>a</sup>. CAB International.

Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell’Aqua, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., Papa, F. O. (2012). Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci*, 149 (1–2), 1–6. doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011.

Graaf, S. P., Evans, G., Gillan, L., Guerra, M. M., & Maxwell, W. M. O. J. (2007). The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, *67* (2), 217–27.

[doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.008).

Fahy, G. M. (2010). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, *60* (3), 45–53.

[doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005).

Feugang, J. M., Roover, R., Moens, A., Léonard, S., Dessy, F., & Donnay, I. (2004). Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, *61* (1), 71–90.

[doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00191-2).

Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1469* (3), 197-235.

[doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6).

Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, *73* (4), 480–7. [doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005).

Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M. A., Garcia-Vazquez, F. A., & Gardon, J. C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, *62*, 40–6. [doi:10.1016/j.cryobiol.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.001).

Glazar, A. I., Mullen, S. F., Liu, J., Benson, J. D., Critser, J. K., & Squires, E. L. G. J. (2009). Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, *59* (2), 201–6. [doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.009).

Gonçalves, F. S., Barretto, F. S. S., Arruda, R. P., & Perri, S. H. V. M. G. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim*, 45 (1), 129–35.

[doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x).

Gonçalves, P. B. D., Figueredo, J. R., & Freitas, V. J. F. (2008). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Roca.

Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on spermfunction. *Theriogenology*, 78, 1700–8. [doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002).

Guerra, M. M. P., Evans, G., & Maxwell, W. H. C. (2004). Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. *Rev Bras Reprod Anim*, 28 (4), 187–95. Retrieved April 12, 2020, from <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/v28n4.pdf>.

Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 61 (1–3), 03–22. [doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00152-4).

Haldar, C., & Ahmad, R. (2010). Photoimmunomodulation and melatonin. *Photochem Photobiol B*, 98, 107–17. [doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.014](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.11.014).

Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & Du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*, 48 (5), 425–35. Retrieved May 8, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795359>.

Khosrowbeygi, A., & Zarghami, N. (2007). Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol*, 1 (7), 6. [doi.org/10.1186/1472-6890-7-6](https://doi.org/10.1186/1472-6890-7-6).

Leite, P. A., Schreder, G. G., Almeida, C. L. R., Zúccari, C. E. S. N., & Silva, E. V. C. (2011). Unopar, *Cient Ciênc Biol Saúde*, 13 (4), 279-86. [doi.org/10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p](https://doi.org/10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p).

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., & Ververidis, H. N. B. C. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 112 (1–2), 119–35. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.007.

Mousavi, S. M., Towhidi, A., Zhandi, M., Amoabediny, G., Sangcheshmeh, A. M., Sharafi, M., & Hussaini, S. M. H. (2019). Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 209, 106-171. Doi.Org/10.1016/J.anireprosci.2019.106171.

Muino, R., Fernández, M., & Peña, A. I. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim*, 42 (3), 305–11. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x.

Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., Tar, M., & Sangcheshmeh, M.A. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, 133 (15), 38-44. Doi: 10.1016/J.theriogenology.2019.04.024.

Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari, S. A., Khodaei, M. M., & Martinez-Pastor, F. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 66 (3), 275–82. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.03.002.

Nehring, H., & Rothe, L. (2003). Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. Budapest, Europa: Budapest Proceedings.

Nordberg, J. A. E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31 (11), 1287–312. doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9.

Papa, F. O., Felício, G. B., Melo-Oña, C. M., Alvarenga, M. A., De Vita, B., Trinque, C., Puoli-Filho, J. N., & Dell'Aqua, J. A. (2011). Replacing egg yolk with soybean lecithin in

the cryopreservation of stallion sêmen. *Anim Reprod Sci*, 129 (1–2), 73–7. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.006.

Peng, W., Lei, M., Zhang, J., & Zhang, Y. (2019). The protective effect of melatonin on the *in vitro* development of yak embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *Zygote* 27 (3), 118-125. doi: 10.1017/S0967199418000412.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. Santa Maria, RS, Ed.UAB/NTE/UFSM.

Pinho, R. O., Lima, D. M., Shiomi, H. H., Siqueira, J. B., Silveira, C. O., Faria, V. R., Lopes, P. S., & Guimarães, S. E. G. J. (2016). Effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates on plasma membrane viability of Piau swine breed frozen/thawed spermatozoa. *Cryobiology*, 73 (1), 1–6. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.07.004.

Pugliesi, G., De Carvalho, G. R., Rates, D. M., Ker, P. G., Da Matta, M. P., & De Oliveira, R. R. F. J. (2012). Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41 (12), 2411–7. doi.org/10.1590/S1516-35982012001200005.

Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2013). Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. *Int J Mol Sci*, 14, 7231–72. doi:10.3390/ijms14047231.

Remião, M. H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Silveira, T., Barther, N. N., Komninou, E. R., Basso, A. C., Jornada, D. S., Beck, R. C., Pohlmann, A. R., Junior, A. S., Seixas, F. K., Campos, V. F., & Guterres, S. S. C. T. (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 63, 70–81. doi:10.1016/j.reprotox.2016.05.016.

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role of melatonin. *J Pineal Res*, 36 (1), 1–9. doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x.

Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68 (2), 276–80. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.008.

Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., & Ulutas, P. A. B. A. (2009). The influence of cystein and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Bull sêmen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58, 134–8.  
doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.11.006.

Shah, N., Singh, V., Yadav, H. P., Verma, M., Chauhan, D. S., Saxena, A., Yadav, S., & Swain, D. K. (2017). Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 182, 111–22. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.05.006.

Seidman, M. D., Khan, M. J., Tang, W. X., & Quirk, W. S. (2002). Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 127 (3), 138–44. <https://doi.org/10.1067/mhn.2002.127627>.

Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, R. A. S. (2013). Development of soya milk extender for semen cryopreservation of karan fries (crossbreed cattle). *Cryo-Letters*, 34 (1), 52–61. Retrieved April 15, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435710>.

Singh, A. K., Kumar, A., Honparkhe, M., Kaur, S., Kaur, H., Ghuman, S. & Brar, P. S. (2018). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reprod Domest Anim*, 53 (1), 195-202. doi: 10.1111/rda.13092.

Snoeck, P. P. N., Henry, M., & Melo, M. I. V. (2007). Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen equino. *Arq Bras Med Vet e Zootec*, 59 (1), 56–64. doi.org/10.1590/S0102-09352007000100010.

Souza, W. L., Moraes, E. A., Costa, J., Sousa, P. H., Lopes, J. E. S., Oliveira, R. P., & Toniolli, R. (2016). Efeito de diferentes concentrações de melatonina nos espermatozoides de

carneiros sobre estresse oxidativo após a criopreservação. *Pesq Vet Bras*, 36, 657-664. doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700017.

Stradaioli, G., Noro, T., & Sylla, L.M.M. (2007). Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67 (7), 1249–55. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.009.

Takada, L., Junior, A. M., Mingoti, G. Z., Balieiro, J. C., Cipolla-Neto, J., & Coelho, L. A. (2012). Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res Vet Sci*, 92 (1), 124–7. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.11.004.

Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, 44 (3), 280–7. doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x.

Toker, M. B., Alcay, S., Gokce, E., Ustuner, B. (2016). Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*, 72 (3), 205–9. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.05.001.

Varner, D. D., Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2015). Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Vet J*, 47 (1), 16–24. doi:10.1111/evj.12308.

Vidal, A. H., Batista, A. M., Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., & Silva, S. V. G. M. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, 109 (1), 47–51. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022.

Viveiros, A. T. M. (2005). Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Anim. Breed. Abstr*, 73, 1-9. Retrieved from <http://www.cabi-publishing.org/aba>.



Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60, 481-492. doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Natália do Carmo Silva – 70%

Thaís Campos Marques – 5%

João Teodoro Pádua – 10%

Karen Martins Leão – 15%