

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2020; 10(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.4>
 Artigo Original. Recibido: 02/10/2019. Aceito: 22/01/2020. Publicado: 15/02/2020.

Efeito dos antioxidantes Trolox e Crocina na criopreservação do sêmen de ovelhas Pelibuey

Antioxidant effect of Trolox and Crocina on the cryopreservation of Pelibuey semen

Rodríguez-Gutiérrez Itzel² , Domínguez-Rebolledo Álvaro^{1*} , Loeza-Concha Henry³ , Castellanos-Zacarías Carlos² , Tun-Moo Maximiliano² , Ramón-Ugalde Julio² 

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. México. ²Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Conkal. Antigua Carretera Mérida-Motul. km 16.3, C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México. ³Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Haultunchén-Edzná. km 17.5, C.P. 24450; Sihochac, Champotón, Campeche. México. *Autor para correspondencia: Álvaro Domínguez Rebolledo. Itzel.rgutierrez@outlook.com, dominguez.alvaro@inifap.gob.mx, henryloeza_21@yahoo.com. castellanos@itconkal.edu.mx, maxtun_14@hotmail.com, julio.ramon9@gmail.com.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos antioxidantes Trolox e Crocina no diluente de congelamento na criopreservação do sêmen de ovelha Pelibuey. Os ejaculados obtidos foram misturados, divididos e congelados em 3 tratamentos: T1: Trolox 1mM; T2: Crocina 1 mM; TT: Testemunha (sem antioxidante). Às 0 horas (degelo) e 6 horas a 37 °C, foram analisadas motilidade total (MT) e progressiva (MP), viabilidade espermática, atividade mitocondrial, integridade dos acrossomas e membrana da cauda (Anfitrião) Os dados foram analisados com ANOVA para delineamento inteiramente casualizado e teste de Tukey para comparação de médias. Em nenhuma das duas horas foram encontradas diferenças significativas nos tratamentos ($P>0,05$). Entretanto, de 0 a 6h, a MT se comportou de maneira semelhante em T1 e T2, mas não em TT ($P<0,01$), pelo contrário, a integridade dos acrossomas nos três tratamentos foi semelhante ($P>0,05$). MP, viabilidade, atividade mitocondrial e hospedeiro diminuíram ao longo do tempo de maneira semelhante nos três tratamentos. Os antioxidantes Trolox e Crocina a 1mM no diluente de congelamento permitem manter a MT e a integridade dos acrossomas por 6 h de incubação a 37 °C.

Palavras-chave: Radicais livres, diluente, esperma e congelamento.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of the antioxidants Trolox and Crocina in the freezing diluent on the cryopreservation of Pelibuey ovine semen. The ejaculates obtained were mixed, divided and frozen in 3 treatments: T1: 1mM Trolox; T2: 1mM Crocina; TT: Control (without antioxidant). At 0 hours (defrosting) and 6 hours at 37 °C, total (MT) and progressive (MP) motility, sperm viability, mitochondrial activity, integrity of acrosomes and tail membrane were analyzed (Host) The data was analyzed with an ANOVA for a completely randomized design and a Tukey test for the comparison of means. In neither of the two hours were significant differences found in the treatments ($P>0.05$). However, from 0 to 6h, MT behaved similarly in T1 and T2, but not in TT ($P<0.01$), on the contrary, the integrity of acrosomes in all three treatments was similar ($P>0.05$). MP, viability, mitochondrial activity and Host decreased over time in a similar way in all three treatments. The antioxidants Trolox and Crocina at 1mM in the freezing diluent, allow to maintain the MT and the integrity of the acrosomes for 6 h of incubation at 37 °C.

Keywords: Free radicals, diluent, sperm and freezing.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de espermatozóides é uma ferramenta importante para conservar material genético e manter a diversidade genética em espécies selvagens e domésticas ([Lermen et al., 2009](#)). Entretanto, sabe-se que os processos de congelamento e descongelamento do sêmen usados na maioria das espécies de mamíferos causam a morte de um grande número de células ([Watson, 2000](#)).

Nas ovelhas, embora uma porcentagem relativamente alta (40-60%) de espermatozóides retenha sua motilidade após o descongelamento, apenas cerca de 20 a 30% permanecem intactos biologicamente ([Salamon y Maxwell, 2000](#)). Isso ocorre porque durante o processo de refrigeração e criopreservação há um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), que produzem alterações biofísicas e bioquímicas na membrana espermática ([Chatterjee et al., 2001](#); [Kankofer et al., 2005](#)) e até danos ao seu DNA ([Aitken, 1999](#); [Agarwal et al., 2003](#)), afetando a viabilidade e sua capacidade de fertilização. Nos últimos anos, os protocolos de criopreservação foram substancialmente aprimorados com a adição de compostos com propriedades antioxidantes, impactando positivamente a melhoria da qualidade do sêmen descongelado ([Peña et al., 2005](#); [Thuwanut et al., 2008](#); [Domínguez-Rebolledo et al., 2010](#); [Mata-Campuzano et al., 2015](#)).

Os antioxidantes desempenham um papel importante na proteção dos espermatozóides, contra os efeitos nocivos produzidos pelo ROS ([Halliwell, 1997](#)). A função de um antioxidante é baseada na doação de elétrons para outras moléculas que possuem um ou mais elétrons perdidos (EROs) e, assim, evita alterações nas moléculas de lipídios, proteínas e DNA de espermatozóides ([Tremellen et al., 2008](#)).

O antioxidante Trolox é um análogo da vitamina E solúvel em água e tem sido utilizado em uma ampla variedade de sistemas celulares para evitar os efeitos da ERO ([Halliwell, 1994](#); [Michielset al., 1994](#)). Observou-se que a adição desse antioxidante no meio de congelamento melhora a qualidade do esperma de porco descongelado ([Peña et al., 2005](#)); bem como a viabilidade espermática do sêmen descongelado em ovelhas da raça Churra ([Mata-Campuzano et al., 2015](#)). Em amostras de esperma do epidídimo do cervo ibérico (*post-mortem*), foi demonstrado que este antioxidante é capaz de diminuir as quantidades de ERO e lipoperoxidação; além de proteger os acrossomas e o DNA do esperma ([Domínguez-Rebolledo et al., 2010](#)). [Thuwanut et al. \(2008\)](#) observaram que a adição de Trolox ao diluente de congelamento melhorou a motilidade e a viabilidade dos espermatozóides do epidídimo de gato no degelo.

O antioxidante Crocina (éster glicosílico da crocetina) é um carotenóide solúvel em água, encontrado no pigmento amarelo do açafrão (*Crocussativus*). Foi demonstrado que a adição desse antioxidante no meio de incubação do sêmen melhora a qualidade do

esperma descongelado do cervo ibérico [Domínguez-Rebolledo et al., 2010](#)). [Thuwanut et al. \(2008\)](#) e do touro ([Sapanidou et al., 2014](#)). No sêmen de galos, melhora a viabilidade, a motilidade, a atividade mitocondrial e reduz a lipoperoxidação ao degelo ([Mehdipour et al., 2019](#)).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Crocina ao meio congelante, nas características espermáticas pós-criopreservação em ovinos da raça Pelibuey.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização

O estudo foi realizado no Banco de Germoplasma de Ovinos Pelibuey e Blackbelly do Instituto Nacional de Pesquisas Florestais, Agropecuárias (INIFAP), Campo Experimental de Mocochoá.

Animais

4 ovelhas adultas (2,5 anos), da raça Pelibuey, de 40 a 45 kg de peso vivo, foram utilizadas com uma condição corporal de 3 a 3,5; para qual seu estado de saúde e qualidade do esperma foram previamente avaliados.

Obtenção de amostras de esperma

Foram obtidos 36 ejaculados dos 4 garanhões, utilizando uma vagina artificial e com a ajuda de uma ovelha que servia de manequim.

Diluição de esperma

Os ejaculados obtidos foram misturados (pool) e diluídos em Triladyl® + 20% de gema de ovo, na concentração final de 400 x 10⁶ espermatozóides / ml. Posteriormente, as amostras foram divididas em três tratamentos: T1: Trolox 1mM; T2: Crocina 1 mM; TT: Testemunha (sem antioxidante) e depois embalado em canudos de 0,25 ml.

Congelamento de sêmen

O congelamento das amostras foi realizado colocando os canudos 4 cm acima da superfície do nitrogênio líquido (LN2), por 10 minutos. Imediatamente depois, os canudos foram imersos em LN2 e armazenados até a avaliação.

Sêmen de degelo

O procedimento de degelo foi realizado imergindo os canudos em banho-maria a 37 °C por 30 segundos; posteriormente, as amostras foram avaliadas às 0 h (degelo), às 6 horas de incubação a 37 °C.

Concentração espermática

Uma pequena fração da amostra de sêmen (5 µL) foi diluída em 995 µL de água destilada; em seguida, 9 µL da amostra diluída em água foram colhidos e colocados em cada um dos dois lados da câmara de bûcker, para estimar sua concentração, com o módulo de concentração do sistema CASA (ISAS®v1 (Proiser R+D, Valencia , Espanha) 4 campos foram capturados em cada lado da câmara e a concentração de esperma foi obtida.

Motilidade espermática

A motilidade foi analisada com o sistema CASA, colocando 5 µL de sêmen descongelado e diluído em $\sim 30 \times 10^6$ /ml de espermatozóides, em uma câmara de contagem Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), pré-aquecida a 37 °C; e pelo menos cinco campos foram capturados com um mínimo de 300 espermatozóides/amostra. Os parâmetros de motilidade avaliados foram: Motilidade Total (MT %) e Motilidade Progressiva (MP %).

Viabilidade espermática

Foi avaliado pela coloração SYBR14-IP (Live/Dead® kit L-7011, InvitrogenTM), adicionando 1 µL de SYBR14 (10 µM) e IP (12 µM) da solução estoque em 100 µL de amostra de esperma diluída em solução salina (PBS); e deixado incubar por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, 5µL da amostra foram colocados entre uma lâmina e uma lamela pré-aquecida a 37 °C, e sua avaliação foi realizada por meio de um microscópio de epifluorescência (LWScientific i40-ADN); contando 200 espermatozóides, que tinham fluorescência vermelha (morta), e os que estavam vivos eram verdes.

Integridade do acrossoma

Foi avaliado pela coloração de FITC-PSA (100 µg/ml, L-0770, Sigma-AldrichTM), adicionando 5 µL da solução estoque em 100 µL de amostra de esperma diluída em PBS e deixada incubar no escuro por 30 minutos a 37 °C . Imediatamente depois, 5 µL da amostra foram colocados entre uma lâmina e a lamela. Finalmente, 200 espermatozóides foram contados com um microscópio de epifluorescência, que apresentava fluorescência verde (acrossomas danificados) e nenhuma fluorescência dos acrossomas intactos.

Atividade mitocondrial

Foi analisado com coloração JC-1 (153 µM, Molecular Probes® T-3168, InvitrogenTM), adicionando 1 µL da solução estoque em 100 µL de amostra de esperma diluída em PBS e deixada incubar no escuro por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, 5 µL da amostra foram colocados em uma lâmina e lamínula, e 200 espermatozóides foram contados por um microscópio de epifluorescência, que possuía uma fluorescência laranja (mitocôndrias ativas) no meio do flagelo e as mitocôndrias de cor verde inativo.

Integridade da membrana plasmática da cauda (HOST)

Foi realizada diluindo a amostra de 5 µL de esperma em 50 µL de solução de endosmose (0,735 g de citrato de sódio di-hidratado e 1,351 g de frutose em 100 ml de água destilada) a 100 mOsm/L e incubada a 37 °C. Posteriormente, 5µL da amostra foram colocados em lâmina e lamínula e 200 espermatozóides foram contados com um microscópio de contraste de fase, que tinha caudas enroladas (endosmose positiva) e não enroladas (endosmose negativa).

Análise estatística

As variáveis expressas como porcentagens (motilidade total, motilidade progressiva, viabilidade, atividade mitocondrial, acrossomas intactos e hospedeiro) foram transformadas em arco $\sqrt{(\text{variável})/100}$ antes da análise. Foi posteriormente analisado com um modelo linear geral (GLM) com o procedimento PROC GLM; e encontrar as diferenças estatísticas entre os tratamentos o teste de Tukey a $P \leq 0.05$ foi usado através do pacote estatísticos do sistema Statistical Analysis System (SAS Inst. Inc., 2003)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 0 e 6 h de incubação, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 1). Esses resultados diferem daqueles obtidos por [Thuwanut et al. \(2008\)](#) com esperma epididimal de gato suplementado com o antioxidante Trolox a 1mM; desde MT, MP e viabilidade espermática melhoraram o degelo. Embora sejam espécies diferentes, a diferença nos resultados pode ser atribuída ao fato de que espermatozóides do epidídimo de gato por castração nunca estiveram em contato com as secreções das glândulas que formam o plasma seminal, onde é encontrada a maior defesa antioxidante ([Chen et al., 2003](#)). Portanto, existem diferenças no congelamento entre os espermatozóides de ejaculados e epidídimos ([Gilmore et al., 1998](#)), que afetam a sensibilidade ao resfriamento, como a resistência ao congelamento ([Schmehl et al., 1986](#)). Nesse sentido, o Trolox poderia ter atuado diretamente e sem concorrência no esperma do epidídimo, semelhante ao observado por [Domínguez-Rebolledo et al. \(2007\)](#), com plasma de ovelha seminal em sêmen descongelado.

Por outro lado, em sinergia com os antioxidantes presentes no plasma seminal, as amostras seminais utilizadas neste estudo podem ser alteradas, diminuindo seu efeito. Também foi relatado que a suplementação do diluente com Trolox a 1mM, dependendo do tipo de aditivo usado no diluente, pode ou não melhorar a viabilidade do sêmen congelado de ovelhas da raça Churra ([Mata-Campuzano et al., 2015](#)); isto é, quando o diluente foi produzido a partir de lecitina de soja, o antioxidante Trolox teve maior viabilidade nas amostras descongeladas; enquanto que quando um diluente à base de tris foi usado, como o usado neste estudo (Trilady®), a viabilidade no esperma não melhorou. A soja contém isoflavonas, que atuam como antioxidantes; que pode ter

exercido alguma proteção sobre o esperma durante o processo de congelamento e descongelamento ou em combinação com Trolox, produzindo uma sinergia que ajudou a aumentar os efeitos benéficos sobre o esperma. Com a adição do antioxidante Crocina, foram relatadas maior viabilidade, motilidade, atividade mitocondrial e redução da lipoperoxidação em amostras de esperma de galo para degelo (Mehdipour *et al.*, 2019).

Tabela 1. Porcentagens (%) dos parâmetros espermáticos avaliados às 0 he 6 (média $\pm$ erro padrão).

Hora	Tratamento	Total motilidade	Progressiva motilidade	Viabilidade	Actividade mitocondrial	Acrossomas intactos	Host
0	T1	57.5 $\pm$ 5.3 ^{aA}	17.1 $\pm$ 1.6 ^{aA}	39.5 $\pm$ 3.9 ^{aA}	50.7 $\pm$ 6.2 ^{aA}	49.6 $\pm$ 6.4 ^{aA}	23.6 $\pm$ 3.1 ^{aA}
	T2	49.9 $\pm$ 5.6 ^{aA}	15.8 $\pm$ 2.2 ^{aA}	45.2 $\pm$ 5.2 ^{aA}	42.3 $\pm$ 5.4 ^{aA}	44.6 $\pm$ 6.1 ^{aA}	23.4 $\pm$ 3.1 ^{aA}
	TT	58.6 $\pm$ 3.9 ^{aA}	15.3 $\pm$ 2.2 ^{aA}	41.4 $\pm$ 5.2 ^{aA}	40.5 $\pm$ 6.0 ^{aA}	47.7 $\pm$ 6.1 ^{aA}	19.3 $\pm$ 2.1 ^{aA}
6	T1	36.6 $\pm$ 7.0 ^{aA}	8.6 $\pm$ 7.0 ^{aB}	24.6 $\pm$ 4.0 ^{aB}	15.7 $\pm$ 1.9 ^{aB}	46.0 $\pm$ 2.7 ^{aA}	10.2 $\pm$ 1.0 ^{aB}
	T2	39.2 $\pm$ 5.8 ^{aA}	8.9 $\pm$ 5.8 ^{aB}	22.8 $\pm$ 2.7 ^{aB}	17.1 $\pm$ 1.5 ^{aB}	43.7 $\pm$ 4.0 ^{aA}	13.1 $\pm$ 1.1 ^{aB}
	TT	26.7 $\pm$ 4.3 ^{aB} **	8.2 $\pm$ 4.3 ^{aB}	27.2 $\pm$ 4.0 ^{aB}	20.0 $\pm$ 2.2 ^{aB}	41.7 $\pm$ 3.5 ^{aA}	12.4 $\pm$ 1.2 ^{aB}

T1: Trolox 1 mM; T2: Crocina 1 mM; TT: Testemunha (sem antioxidante). (ab) Literais diferentes dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada hora ($P < 0,05$). (AB) Literais diferentes dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,01$ **) entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

Com o tempo de incubação (0 a 6 horas), a MT se comportou de maneira semelhante em T1 e T2, mas não no TT ($P < 0,01$); pelo contrário, a integridade dos acrossomas nos três tratamentos foi semelhante ($P > 0,05$). MP, viabilidade, atividade mitocondrial e hospedeiro diminuíram ao longo do tempo de maneira semelhante nos três tratamentos (tabela 1). Os resultados são semelhantes aos relatados por Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010) em amostras de espermatozoides de epidídimo descongeladas do cervo ibérico, onde a MT e a integridade do acrossoma foram mantidas durante a incubação a 37 °C com o antioxidante Trolox e Crocina a 1mM. Sapanidou *et al.* (2014) observaram que a motilidade, viabilidade e integridade dos acrossomas nos espermatozoides bovinos foram mantidas durante a incubação a 37 °C com 1 mM de Crocina. Em vista dos resultados após 6 h de incubação em que o T1 e o T2 mantiveram a MT e a integridade dos acrossomas, pode-se dizer que os antioxidantes testados são eficientes e recomendados para incorporação no diluente antes do congelamento; de tal maneira que a dose seminal entrará em vigor no trato genital, após inseminação até o momento próximo à ovulação.

CONCLUSÃO

A adição dos antioxidantes Trolox e Crocina a 1mM no diluente de congelamento permite manter a motilidade total e a integridade dos acrossomas durante 6 h de incubação a 37 °C.

OBRIGADO

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT), pelo financiamento concedido para esta pesquisa através do projeto de Ciências Básicas 164592 e do Projeto Fiscal nº 1513272874 do INIFAP.

LITERATURA CITADA

AGARWAL A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79(4): 829-843. ISSN: 0015-0282. [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)

Aitken RJ. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis?. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(1): 1-7. ISSN: 2228-5482. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1150001>

CHATTERJEE S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 59(4): 451-458. ISSN: 1098-2795. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1052>

CHEN H, Chow, PH, Cheng SK, Cheung AL, Cheng LY, WS O. 2003. Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology*. 24(5):704-711. ISSN:1939-4640. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02730.x>

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO AE, Fernando-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, Martínez-Pastor F, Garde JJ. 2010. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction and Fertility and Development*. 22(5): 856-870. ISSN: 1031-3613. <http://dx.doi.org/10.1071/RD09197>

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO A, Sierra NL, Tamayo C A, Loria AA, Denis ES, Oses BR, Parra GE, Monsreal PL, Ugalde RJ. 2007. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica*. 2007;17:73-76. <http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15259/15234>

GILMORE J, MC Gann I, Ashwoth E, Acker J, Raath J, Bush M, Critser J. 1998. fundamental cryobiology of selected african mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal Reproduction Science*. 53(1-4): 277-297. ISSN: 0378-4320. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00118-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00118-3)

HALLIWEL B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*. 52(8): 253-265. ISSN: 0029-6643. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x>

HALLIWELL B. 1997. Antioxidants: The basics-what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*. 38: 3-20. ISSN: 1054-3589. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60976-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60976-X)

KANKOFER M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*. 63(5): 1354-1365. ISSN: 0093-691X: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.005>

LERMEN D, Blömeke B, Browne R, Clarke A, Dyce PW, Fixemer T, Fuhr GR, Holt WV, Jewgenow K, Lloyd RE, Lotters S, PaulusM, Reid GM, Rapoport DH, Rawson D, Ringleb J, Ryder OA, Sporl G, Schmitt T, Veith M, Muller P. 2009. Cryobanking of viable biomaterials: Implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology*. 18(6): 1030-1033. ISSN: 1365-294X. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x>

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(4): 520-528. ISSN: 0093-691X. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>

MEHDIPOUR M, Kia HD, Najafi A. 2019. Effect of Crocin and Naringenin Supplementation in Cryopreservation Medium on Post-Thawed Rooster Sperm Quality and Expression of Apoptosis Associated Genes. *Biorxiv*. 1-26. <https://doi.org/10.1101/846758>

MICHIELS C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radicals Biology*. 17(3): 235-248. ISSN: 0891-5849. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)

PEÑA FJ, Johannison A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2005. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen- thawed boar spermatozoa.

International journal of Andrology. 28(2): 107-114. ISSN:1939-4640:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00512.x>

SALAMON S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3): 77-111. ISSN: 0378-4320. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

SAPANIDOU VG, Margaritis L, Siahos N, Arsenopoulos K, Dragatidou E, Taitzoglou LA, Zervos LA, Theodoridis A, Tsantarliotou MP. 2014. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. *Journal of Biological Research*. 21(19): 1-6. ISSN: 2284-0230. <http://dx.doi.org/10.1186/2241-5793-21-19>

SCHMEHL MK, Vazquez I, Graham EF. 1986. the effects of nonpenetrating cryoprotectants added to test-yolk-glycerol extender on the post-thawing motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 23(6): 512-517. ISSN: 0011-2240. [http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90060-X](http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240(86)90060-X)

S.A.S. Institute Inc. 2003. SAS/STAT user's Guide. Version 6. Fourth Edition. Vol. 1. Carry, NC.

THUWANUT P, Chatdarong K, Techakumphu, M, Axner E. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*. 70(2): 233-240. ISSN: 0093-691X. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.005>

TREMELLEN K. 2008. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Human Reproduction*. 14(3): 243-258. ISSN: 0268-1161. <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmn004>

WATSON PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction Science*. 60-61: 481-492. ISSN: 0378-4320. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)