

Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões*

Role of Antioxidants Agents in Germ Cells and Embryos Cryopreservation

Hiédely Kenia Machado Luz, Livia Schell Wanderley, Luciana Rocha Faustino, Cleidson Manoel Gomes da Silva, José Ricardo de Figueiredo & Ana Paula Ribeiro Rodrigues

ABSTRACT

Background: Antioxidants are molecules or substances able to convert the reactive oxygen species (ROS) in water, preventing its overproduction. In an attempt to reduce or eliminate oxidative stress during cryopreservation, antioxidants, especially catalase and trolox[®], have been added to the freezing medium to maximize cell survival after the process of freezing / thawing. These substances have been used mainly in the cryopreservation of semen, embryos and oocytes. Given the importance of adding these agents in cryopreservation of mammal germ cells, this review aims to describe issues related to the addition of catalase and trolox[®] for maintaining the viability of these cells in the cryopreservation process.

Review: Numerous protocols for germ cells cryopreservation have achieved satisfactory results in different species, although some points of these protocols still require adjustments in order to succeed in the repeatability of results. Cryopreservation can affect negatively cell and / or tissues viability by several factors, including the formation of intracellular ice crystals, solution effect and toxicity caused by the inappropriate use of cryoprotective agents. Currently, several studies have emphasized the damage caused by the formation of ROS during cryopreservation processes, leading to oxidative stress. ROS formed during the cryopreservation process can degrade essential molecules to cells, including the polyunsaturated lipids present in the cell membrane (lipid peroxidation), leading them to death. In order to prevent oxidative stress that occurs during cryopreservation, some researchers have tested the addition of antioxidants to the freezing medium in order to achieve higher rates of cell survival after the thawing process. Antioxidants are substances that can neutralize ROS, thus reducing its power of chemical reaction. These substances act by two systems: a non-enzymatic, including various hydrophilic and lipophilic compounds such as α -tocopherol, and an enzyme, which is usually the first system to act in the cell, such as catalase. Antioxidants can act in two ways, i.e., repairing the injuries occurred, or even more efficiently, eliminating the ROS before they cause damage to cells, as is the case of α -tocopherol and catalase. Because of its great importance, these antioxidants (catalase and α -tocopherol, and its analogue trolox[®]) have been tested successfully in cryopreservation protocols and *in vitro* culture, especially in semen, embryos and oocytes. However, the use of these agents should be studied carefully, since some studies have demonstrated dose-dependent toxicity.

Discussion: Cryopreservation is a technique that guarantees the preservation of gametes, for an indefinite period, to later use in assisted reproductive technologies. However, the application of this technique can lead to oxidative stress, mainly due to lipid peroxidation and consequently irreversible cell damages. An alternative to the elimination or reduction of these effects is the addition of antioxidants such as catalase and trolox[®] in cryopreservation protocols, which has shown promising results to increase the rate of cell viability after thawing. However, further studies are needed in this area to determine the type and the optimal concentrations of these substances for each structure to be cryopreserved.

Keywords: cryobiology, oxidative stress, lipid peroxidation, catalase, Trolox[®].

Descritores: criobiologia, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, catalase, Trolox[®].

I. INTRODUÇÃO

II. IMPORTÂNCIA DA CRIOBIOLOGIA PARA A REPRODUÇÃO ANIMAL E FUNDAMENTOS BÁSICOS

1. Etapas da criopreservação

III. DANOS IMPLICADOS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

1. Formação de gelo intracelular

2. Efeito solução

3. Toxicidade dos ACP

4. Estresse oxidativo

4.1. Peroxidação Lipídica

IV. ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA PARA A VIABILIDADE DAS CÉLULAS GERMINATIVAS E EMBRIÕES

1. Catalase

2. α -Tocoferol

2.1. Trolox®: análogo hidrossolúvel do α -tocoferol

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

VI. REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação tem como princípio a utilização de temperaturas superbaixas como uma estratégia para a privação de energia resultando na preservação de forma eficiente da estrutura e função de células e tecidos vivos [12]. Para isso, a criopreservação exige a exposição de células isoladas e/ou tecidos à substâncias crioprotetoras antes do processo de redução da temperatura propriamente dito, geralmente denominado período de equilíbrio. Durante o período de equilíbrio, as substâncias ou agentes crioprotetores substituem a água presente no meio intracelular através de um gradiente osmótico [80], conferindo, dessa forma, desidratação e, conseqüentemente, maior proteção celular.

Vários estudos têm demonstrado o êxito na criopreservação de células germinativas femininas como oócitos maduros inclusos em folículos antrais [23,24,46] ou imaturos oriundos de folículos pré-antrais, isolados [4] ou *in situ* [17,22,55,73,82], isto é, presentes no tecido ovariano. Outros estudos têm registrado, inclusive o nascimento após a descongelação de oócitos maduros [54,107] ou de folículos pré-antrais *in situ* (ovinos [44,50], humanos [5,34,35,69]) em programas de reprodução assistida. Apesar disso, o sucesso dessa técnica depende de vários fatores que devem ser cuidadosamente considerados, como o método de criopreservação

utilizado; tipo e estágio de desenvolvimento da estrutura a ser criopreservada; escolha do tipo e concentração do(s) agente(s) crioprotetor(es), bem como o tempo de exposição a esses agentes, antes da criopreservação [89].

O processo de criopreservação pode afetar a estrutura e o metabolismo celular [100] devido à produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species - ROS), comprometendo a sobrevivência celular pós-descongelação. Na tentativa de minimizar e/ou eliminar os possíveis danos provocados pela produção de ROS durante a criopreservação, alguns autores têm testado a adição de agentes antioxidantes ao meio de congelamento [30,96].

Tendo em vista a importância da adição de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas de mamíferos, a presente revisão abordará aspectos relacionados aos fundamentos da criobiologia; danos implicados no processo de criopreservação, enfatizando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica; espécies reativas ao oxigênio e adição de agentes antioxidantes na solução de congelamento, destacando a ação da Catalase, do α -tocoferol e do seu análogo hidrossolúvel Trolox®.

II. IMPORTÂNCIA DA CRIOBIOLOGIA PARA A REPRODUÇÃO ANIMAL E FUNDAMENTOS BÁSICOS

A criobiologia é o estudo do processo referente à preservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas por meio da sua exposição ao vapor de nitrogênio ou, mais comumente, mergulhando-o no próprio nitrogênio líquido (-196°C). Desta forma, a criopreservação garante que as células sejam submetidas a um estado de redução do metabolismo no qual podem permanecer por um período indefinido e serem, futuramente, resgatadas ainda viáveis [67].

Na reprodução, a criopreservação pode ser utilizada para preservar e estocar uma grande quantidade de células germinativas de animais de produção de alto valor genético e econômico ou espécies em risco de extinção. Neste caso, as células germinativas desses animais poderão ser utilizadas em programas de reprodução assistida visando a multiplicação de indivíduos; melhoramento genético e zootécnico dos rebanhos, bem como a preservação de espécies ou raças, inclusive após a morte.

Desta forma, a implantação de um banco de germoplasma pode ser muito importante para preservar espécies e/ou raças ameaçadas de extinção [3], como é o caso de caprinos da raça Canindé. A importância desta raça deve-se ao fato da sua utilização com sucesso em programas de animais transgênicos como biorreatores para a produção de fármacos de interesse para a saúde humana [42].

A criopreservação pode ser realizada basicamente por dois métodos, isto é, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é descrita como método largamente utilizado para a criopreservação de células germinativas [79]. Este método utiliza baixas concentrações de agentes crioprotetores (ACP) e resfriamento de forma gradual [3]. Já a vitrificação, consiste em resfriamento ultra-rápido (em torno de 20.000°C/min), sem a utilização de equipamentos sofisticados, pois a estrutura a ser criopreservada é imersa diretamente em nitrogênio líquido. No entanto, apresenta a desvantagem de utilizar altas concentrações de ACP [104].

Independente do método, a criopreservação é constituída por cinco etapas fundamentais: 1) exposição ao(s) ACP; 2) resfriamento; 3) estocagem em nitrogênio líquido; 4) descongelação/aquecimento e 5) remoção do(s) ACP [90].

1. Etapas da criopreservação

Na fase de exposição ao ACP ou período de equilíbrio, a estrutura a ser criopreservada é imersa em uma solução hipertônica contendo ACP, ocasionando o aumento das concentrações de solutos no espaço extracelular. Este evento condiciona uma concomitante saída de água e entrada de ACP na célula por difusão, até que o ponto de equilíbrio (concentrações de água e ACP equivalentes nos espaços intra e extracelular) seja atingido e o volume celular restabelecido [53]. Essa é uma etapa extremamente importante e é fortemente influenciada pela própria concentração do ACP, tempo e temperatura em que é realizada a exposição [33]. Na congelação lenta, a etapa de resfriamento é realizada de forma gradual para que a desidratação ocorra progressivamente [97] havendo a necessidade da realização da indução da formação de gelo extracelular ou seeding quando a temperatura atinge uma faixa entre -4 a -9°C [3,86]. Na vitrificação, a velocidade de resfriamento é extremamente rápida, variando em torno de 20.000 a 40.000°C/min [62], e, como consequência, a água

passa do estado líquido para um estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo [85,106].

Finalizado o resfriamento, a amostra é armazenada, normalmente em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento imediato de sua descongelação/aquecimento. Para retomar a atividade metabólica após a criostocagem, o material deve ser descongelado de forma rápida, visando reduzir o risco da formação de gelo intracelular [3,89]. Nesta etapa, podem ocorrer injúrias celulares pelo processo de recristalização, formando grandes cristais de gelo ou ainda, pelo crescimento dos microcristais de gelo que se formaram durante a congelação, tornando-se macrocristais, levando à ruptura e morte das células [89].

Após a descongelação, é necessária a remoção do crioprotetor. Alguns estudos sugerem que esta remoção deve ser realizada em etapas, utilizando uma solução isotônica adicionada de um ACP extracelular, como a sacarose [25,91]. A sacarose produz retenção de água no meio extracelular impedindo que esta ingresse na célula mais rapidamente que a saída do ACP, reduzindo assim, os riscos osmóticos [29]. Desta forma, sugere-se que o efeito benéfico da sacarose seja devido ao fato desta substância atuar como um tampão osmótico contra o estresse sofrido pelas células durante a adição e remoção dos ACPs permeáveis [74].

Durante o processo de criopreservação podem ocorrer danos de diversas naturezas que implicam no comprometimento da viabilidade celular. Desta forma, são sugeridos mais estudos na tentativa de minimizar os danos que ocorrem durante o processo de criopreservação de forma a garantir uma maior eficiência nesses protocolos.

III. DANOS IMPLICADOS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Dependendo da severidade, os danos causados durante o processo de criopreservação podem levar à morte da célula. Os principais danos são ocasionados pela formação de gelo intracelular, pelo efeito solução [66], pela toxicidade dos ACP [6], bem como pelo estresse oxidativo - principalmente através da peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular [68].

1. Formação de gelo intracelular

A formação dos cristais de gelo intracelular, que ocorre durante a etapa de resfriamento do pro-

cesso de congelação, é devida a um estado de alta instabilidade provocado pelo super-resfriamento da água intracelular. Esse fenômeno é o principal responsável pela ruptura mecânica da membrana plasmática das células que ocorre durante o procedimento de criopreservação [32,98,108]. Outra via de formação dos cristais de gelo a ser considerada é o crescimento dos microcristais como resultado da recristalização durante a descongelação [8,88].

Logo após a ruptura de membranas pela formação de gelo intracelular, podem ser observados distúrbios na microcirculação do tecido, que podem ser evidenciados após incubação *in vitro* por algumas horas. Finalmente, esses cristais podem induzir à morte por apoptose, sendo mais comumente manifestada nas regiões próximas à periferia dos cristais de gelo [41,108].

2. Efeito solução

Com a transição da água no seu estado líquido para o sólido ocorre um aumento na concentração de soluto ainda na fase líquida, fazendo com que o ponto de congelação da solução remanescente não congelada seja reduzido. À medida que a temperatura cai, as células e/ou tecidos vão sofrendo uma desidratação excessiva, ocorrendo precipitação e aumento na concentração de eletrólitos e outros solutos. Essas alterações podem atingir graus bastante elevados [108], conseqüentemente, resultando em injúrias às proteínas intracelulares sendo, portanto, estabelecido o efeito solução [51]. Além desses eventos, o efeito solução também desencadeia alterações de pH [68,108], perda de material de membrana e conseqüente redução das áreas de superfície celular [99] e ainda, eliminação de lipídios intramembranários [33]. Uma alternativa para se evitar o efeito solução é a escolha correta dos agentes crioprotetores, bem como a padronização da sua concentração nos protocolos de criopreservação [71].

3. Toxicidade dos ACP

Os agentes crioprotetores são solventes orgânicos [47] usados na composição de soluções crioprotetoras com a finalidade de proteger as células e/ou tecidos contra as injúrias causadas pela desidratação e resfriamento durante o processo de criopreservação. Porém, quando são usados inapropriadamente podem ser tóxicos. Portanto, apesar dos efeitos benéficos do uso de ACP, um dos fa-

tores limitantes para o sucesso da criopreservação de células, tecidos e órgãos é a sua toxicidade [6,36].

Os danos causados pelo uso inadequado dos ACP podem variar com o tipo de célula e, sem dúvida, também estão relacionados com o tipo e concentração do agente utilizado [107]. Os efeitos deletérios da toxicidade não incluem apenas danos osmóticos, mas também injúrias bioquímicas, como desnaturação e inativação de enzimas, alteração das bombas de íons e outros danos na estrutura e função da célula [6]. Portanto, para a redução dos efeitos da toxicidade antes e após a criopreservação é necessário evitar o uso de concentrações elevadas de ACP, bem como remover o crioprotetor imediatamente após a descongelação/aquecimento [35]. Além disso, a redução do tempo de exposição associada a baixas temperaturas durante a criopreservação também pode reduzir os danos celulares. Por outro lado, a exposição na presença de baixas temperaturas pode promover uma permeabilidade ineficiente dos ACP, diminuindo sua crioproteção nas células [43].

4. Estresse oxidativo

As células vivas sob condições aeróbicas estão continuamente sujeitas aos efeitos paradoxos do oxigênio. Isto porque o oxigênio molecular ao mesmo tempo em que é vital pode ser extremamente deletério para a sobrevivência celular. Em condições fisiológicas (aeróbicas), o oxigênio é o aceptor final de elétrons durante a fosforilação oxidativa, indispensável para a síntese de ATP. Entretanto, para que ocorra essa síntese de energia, a molécula de oxigênio sofre uma redução tetravalente, ou seja, o ganho de quatro elétrons na sua última camada de valência, produzindo intermediários relativamente instáveis (Figura 1), denominados de espécies reativas ao oxigênio ou simplesmente ROS, derivado do termo inglês Reactive Oxygen Species [38].

O acúmulo dessas ROS na célula promove o estresse oxidativo, que é caracterizado por um distúrbio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes da célula [1]. Em situações que existe uma maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema tende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes intracelulares e, dependendo da severidade deste processo, pode ser letal à célula [28]. Acredita-se que essa letalidade das ROS seja devido aos danos oxidativos, que as mesmas podem causar

em diferentes moléculas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Figura 2).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produto da redução de elétrons do oxigênio, é o precursor da maioria das ROS, além de ser um mediador na reação em cadeia oxidativa. A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ (reação onde um elemento é ao mesmo tempo oxidado e reduzido) espontânea ou através de uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase, gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, é reduzido à água e ao radical hidroxila (OH^{\cdot}), um dos mais fortes oxidantes na natureza. A formação de OH^{\cdot} é

catalisada por metais de transição reduzidos, o que por sua vez, pode voltar a ser reduzido por $O_2^{\cdot-}$, propagando-se este processo [63]. Além disso, o radical $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com outros radicais, incluindo o óxido nítrico (NO^{\cdot}), em uma reação controlada pela taxa de difusão de ambos os radicais, resultando no produto peroxinitrito, também conhecido como um poderoso oxidante [14,84]. Os oxidantes derivados do NO^{\cdot} têm sido recentemente denominados de espécies reativas ao nitrogênio (Reactive Nitrogen Species - RNS).

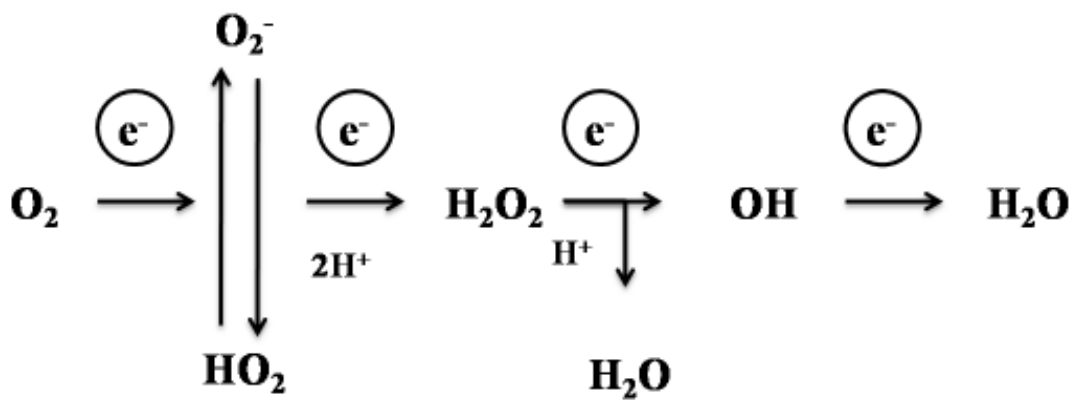


Figura 1. Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias ROS são formadas durante este processo, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). (Adaptado de Cohen [26]).

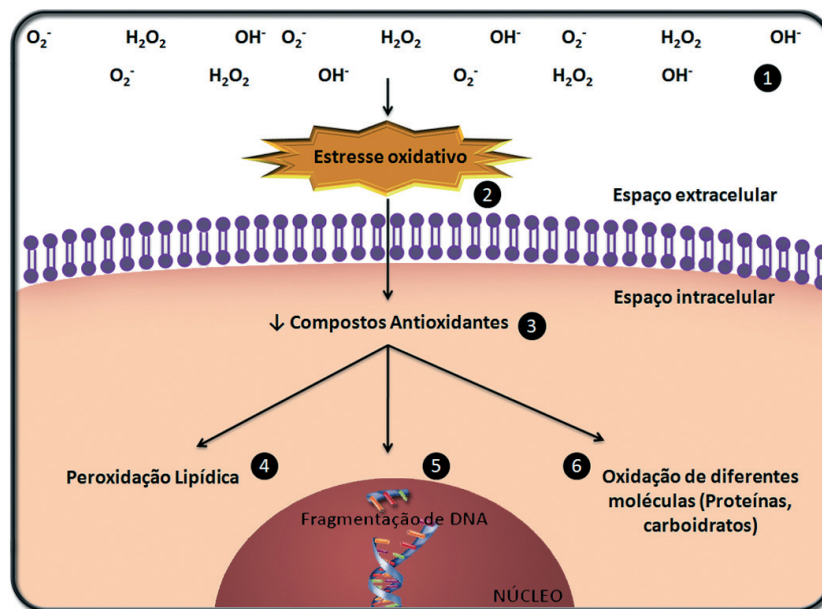


Figura 2. Superprodução de ROS (1) ocasionando estresse oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas, levando a célula à morte (Adaptado de Agarwal *et al.* [1]).

De uma maneira geral, as ROS e/ou RNS são produzidas e encontradas em todos os sistemas biológicos [38,75]. Assim, estudos sugerem que o estado redox da célula pode interferir em diversos eventos celulares, incluindo apoptose, necrose, oxidação de aminoácidos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados presentes na membrana das células [2,49]. Apesar desses diversos efeitos deletérios, a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos em decorrência da oxidação dos ácidos graxos ou peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade [70].

4.1 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é definida como uma cascata de eventos que culmina com a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados presentes na membrana celular. O início desse processo ocorre quando a OH^\bullet , conhecida como a ROS iniciadora da peroxidação, retira um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (AGP) da membrana celular [76]. Esse evento ocorre porque os AGP das membranas celu-

lares possuem ligações duplas, e, portanto, são mais suscetíveis de ataques por esse radical [103].

De acordo com Ferreira & Matsubara [38], a peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que possui três etapas: iniciação, propagação e terminação. A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Esse seqüestro pode ser realizado pelo radical hidroxila ou pelo radical alcóxila (LO), com consequente formação do radical lipídico (L \cdot). Na primeira equação de propagação, o radical L \cdot reage rapidamente com o oxigênio (O_2), resultando em radical peróxila ($\text{LOO}\cdot$), que, por sua vez, seqüestra um novo hidrogênio do LH, formando novamente o radical L \cdot na segunda equação, isto é na etapa de propagação. O término da reação ocorre quando os radicais L \cdot e $\text{LOO}\cdot$ produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se auto destruírem. Essa seqüência de eventos é mostrada na Figura 3.

O resultado da reação em cadeia da peroxidação lipídica é o acúmulo de hidroperóxidos (LOOH) e, conseqüentemente, a formação de pro-

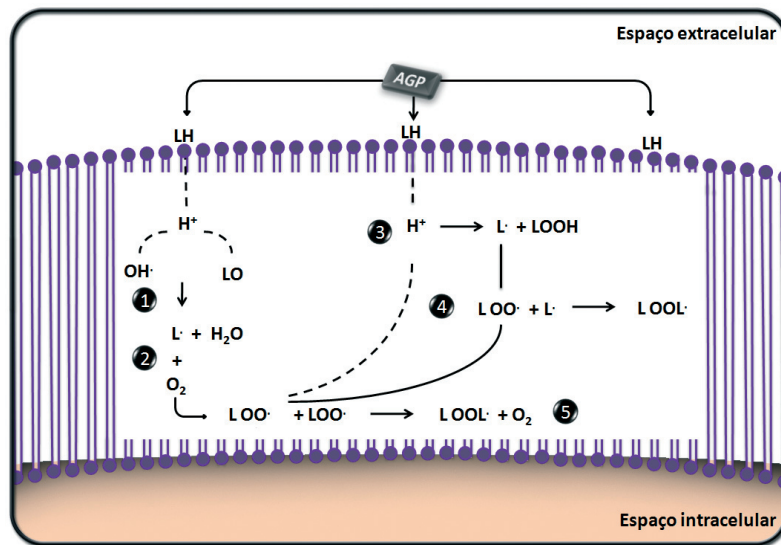


Figura 3. Esquematisação das fases da peroxidação lipídica: iniciação, propagação e terminação. **1.** Iniciação: a peroxidação lipídica tem início quando o radical hidroxila (OH^\bullet) ou o radical alcóxila (LO^\bullet) ataca um ácido graxo poliinsaturado (AGP - LH) da membrana celular, seqüestrando um átomo hidrogênio (H^\bullet) da sua molécula e dá origem ao radical lipídico (L \cdot). **2.** Primeira reação de propagação: O radical L \cdot reage rapidamente com o oxigênio formando o radical peróxila ($\text{LOO}\cdot$). **3.** Segunda reação de propagação: O $\text{LOO}\cdot$ é também responsável por seqüestrar um átomo de H^\bullet dos AGP - LH, dando origem novamente ao radical L \cdot , além da formação de hidroperóxidos (LOOH). Os radicais L \cdot e $\text{LOO}\cdot$ propagam-se até que **4.** os radicais L \cdot e $\text{LOO}\cdot$ unam-se e resultem em um composto estável (LOOL - primeira reação de terminação). **5.** Na segunda reação de propagação a formação de LOOL ocorre pela união de dois radicais $\text{LOO}\cdot$, finalizando este evento. (Adaptado de Ferreira & Matsubara [38]).

dutos citotóxicos, como o malonaldeído, alterando a membrana das células [48,103]. Essas alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo de íons e outras substâncias, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula. Além disso, têm sido descritos alterações do DNA, oxidação de proteínas e comprometimento dos componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno e elastina [9,101]. Assim, a peroxidação é considerada um importante indicador para mensuração do nível do estresse oxidativo celular [60].

Na tentativa de minimizar a peroxidação lipídica que ocorre durante o processo de criopreservação, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores, como as ROS, e o sistema de defesa antioxidante presente na célula [38].

IV. ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA PARA A VIABILIDADE DAS CÉLULAS GERMINATIVAS E EMBRIÕES

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ROS em água, com a finalidade de prevenir a sua superprodução [1]. Em baixas concentrações, os antioxidantes retardam ou inibem a oxidação de um determinado substrato oxidável de maneira eficaz [95]. Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático.

Os antioxidantes enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais e é o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, glutathione (GSH), glutathione reductase (GSH reductase), glutathione peroxidase (GSH peroxidase) e catalase (CAT). O sistema não enzimático inclui vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato) e vitamina E (α -tocoferol), além de diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico [75].

O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar reparando a lesão ocorrida, como fazem o ácido ascórbico, a GSH reductase e a GSH peroxidase, ou ainda, de forma mais eficaz, removendo as ROS antes destas causarem a lesão, como é o caso da CAT e do α -tocoferol [38]. Devido a essa

peculiaridade, esses antioxidantes serão abordados a seguir, com maiores detalhes.

1. *Catalase*

A Catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 em água e O_2 molecular e atua na destoxificação de diferentes substratos como fenóis e alcóois. Além disso, reduz o risco de formação do radical hidroxila via reação de Fenton, reações de íons de metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) com H_2O_2 [21,38]. A atividade desta enzima já foi relatada no fluido do oviduto de vacas, porcas e mulheres [58]. A presença da Catalase no trato genital feminino de mamíferos pode ser funcionalmente relevante, uma vez que o espermatozóide dos mamíferos é deficiente em catalase. Em bovinos, os níveis de Catalase no fluido do oviduto de vacas aumentam cerca de duas vezes do início ao fim do ciclo estral, principalmente na região da ampola [57]. Este fato ressalta a importância da Catalase, uma vez que os espermatozóides mortos no trato genital da fêmea produzem grande quantidade de H_2O_2 levando à peroxidação lipídica e, conseqüentemente, influencia na sobrevivência espermática [65].

A Catalase tem sido utilizada em protocolos de criopreservação de células germinativas com a finalidade de obter um maior percentual de células vivas após o armazenamento em nitrogênio líquido em diferentes espécies. Em humanos, foi mostrado que a suplementação com Catalase no meio de congelamento de sêmen reduziu os níveis de ROS e melhorou a qualidade de espermatozóides após a descongelamento [59]. A qualidade pós-descongelamento de espermatozóides caninos [72], bovinos [15,16,78] e ovinos [20,45], também foi significativamente melhorada quando a Catalase foi utilizada. Em cervos, a adição de Catalase na solução de criopreservação de espermatozóides provenientes do epidídimo melhorou a viabilidade e motilidade espermática, bem como manteve a integridade do acrossomo e das mitocôndrias após descongelamento [36].

Com relação à congelamento de oócitos, Dinara *et al.* [30] testaram a Catalase em diferentes concentrações (10, 100 e 1000 UI/mL) sozinhas ou ainda à concentração de 10 UI/mL associada a 5, 50 ou 500 UI/mL da enzima superóxido dismutase (SOD). Nesse estudo, foi observado que a catalase sozinha (10 UI/

mL) ou associada a 50 UI/mL de SOD melhorou significativamente a sobrevivência e a fertilização de oócitos de camundongas após o processo de criopreservação. Esses resultados sugerem a necessidade de utilização não somente de um agente crioprotetor, mas também de um agente oxidante em soluções de criopreservação de células germinativas.

2. α -Tocoferol

O α -tocoferol, ou vitamina E, é uma substância lipossolúvel, conhecida como inibidora da peroxidação lipídica [19]. Esta vitamina é um antioxidante predominante na membrana plasmática das células animais [11] e quantidades significativas estão presentes no ovário e no fluido folicular [7].

No tocante à utilização deste antioxidante na criopreservação, estudos demonstraram que o α -tocoferol adicionado à solução de congelamento de sêmen suíno, reduziu os danos oxidativos, melhorou a motilidade espermática [19], manteve a integridade da membrana plasmática [92] e mitocondrial [81], além de ter reduzido a expressão de genes pró-apoptóticos [52]. Em espermatozoides bovinos congelados, este antioxidante preservou a atividade metabólica e viabilidade celular [77]. Em camundongos, estudos *in vitro* demonstraram que o α -tocoferol manteve a habilidade dos espermatozoides para ativar oócitos e manter a integridade cromossômica por até nove dias [56]. Apesar dos efeitos benéficos, o α -tocoferol poder agir como pró-oxidante em determinadas concentrações e em curto período [94]. Além disso, a sua utilização também não é recomendada pelo fato da necessidade de diluição em etanol (95%) [61], o qual é tóxico para as células.

2.1 Trolox®: análogo hidrossolúvel do α -tocoferol

Devido à dificuldade de diluição do α -tocoferol, atualmente tem crescido o interesse pela utilização de antioxidantes hidrossolúveis [87]. Desta forma, o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente denominado de Trolox® C [27], análogo sintético hidrossolúvel do α -tocoferol [10] é indicado como um excelente protetor contra a peroxidação lipídica [93]. Segundo Borges [18], a adição de Trolox® ao diluidor de sêmen para fertilização *in vitro*, melhorou a produção de embriões bovinos com menor percentual de fragmentação de DNA. Adicionalmente, o uso de 0,4 mM de Trolox® reduziu parcialmente a degeneração de blastocistos bovinos induzida por dois diferentes com-

postos pró-oxidantes (2,20-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride e D-L-Buthionine (S, R) Sulfoximine) e aumentou significativamente a qualidade dos embriões [40]. Além disso, o uso do Trolox® conseguiu manter as taxas de blastocistos de bovinos no dia 6 de cultivo quando os complexos cúmulus-oócitos foram previamente mantidos por 20h em meio de transporte contendo TCM 199 adicionado de sais de Earles, glutamina, NaHCO₃, HEPES, piruvato, antibióticos e 10% de soro fetal bovino, além da adição de 0,4 mM de Trolox® [39]. No entanto, alguns estudos têm mostrado um efeito tóxico dose-dependente do Trolox® no desenvolvimento de embriões de ratos [102] e de bovinos [39]. Esses estudos demonstram, portanto, a importância da realização de estudos no sentido de definir a melhor concentração de um determinado agente antioxidante em protocolos de criopreservação.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação é uma técnica bastante utilizada como uma ferramenta importante na reprodução assistida, pois garante a preservação de embriões, gametas masculinos e femininos e tecido ovariano, possibilitando ainda a implantação de bancos de germoplasma. Entretanto, eventos ocorridos durante o seu procedimento pode levar ao estresse oxidativo, principalmente à peroxidação lipídica e, consequentemente resultando em danos celulares irreversíveis. Por outro lado, existem fortes indícios de que as injúrias causadas pela peroxidação lipídica pode ser atenuada ou anulada pela utilização de agentes antioxidantes nas soluções de criopreservação. Baseados nisso, vários estudos têm sido descrito na literatura, utilizando agentes antioxidantes enzimáticos, como a catalase, ou não enzimáticos como o α -tocoferol ou mesmo o seu análogo sintético hidrossolúvel Trolox® em protocolos de criopreservação. Apesar dos resultados serem promissores, constata-se a necessidade de mais pesquisas nessa área, no sentido de determinar o tipo e concentração ideais dessas substâncias para cada estrutura a ser criopreservada. Um exemplo é a criopreservação de folículos pré-antrais isolados ou inclusos no tecido ovariano (*in situ*), cuja viabilidade e/ou morfologia observadas após descongelamento ou aquecimento ainda são inferiores ao observado no material fresco ou não criopreservado.

VI.REFERÊNCIAS

- 1 Agarwal A., Prabakaran S.A. & Said T.M. 2005. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *Journal of Andrology*. 26(6): 654-660.
- 2 Agarwal A., Saleh R.A. & Bedaiwy M.A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79(4): 829-843.
- 3 Ambrosini G., Andrisani A., Porcu E., Rebellato E., Revelli A., Caserta D., Cosmi E., Marci R. & Moscarini M. 2006. Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology*. 22(2): 250-262.
- 4 Amorim C.A., Rondina D., Rodrigues A.P.R., Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Giorgetti A. 2004. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. *Fertility and Sterility*. 81(1): 735-740.
- 5 Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G., Loft A., Ottosen C., Dueholm M., Schmidt K.L., Andersen A.N. & Ernst E. 2008. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*. 23(10): 2266-2272.
- 6 Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A. & Crowe J.A. 1990. The Basis for Toxicity of Certain Cryoprotectants: *A Hypothesis*. *Cryobiology*. 27: 401-415.
- 7 Attaran M., Pasqualotto E. & Falcone T. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. *International Journal of Fertility*. 45(5): 314-320.
- 8 Bank H. & Mazur P. 1973. Visualization of freezing damage. *The Journal and Cell Biology*. 57(3): 729-742.
- 9 Barber A.D. & Harris S.R. 1994. Oxygen free radicals and oxidants. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 34(9): 26-35.
- 10 Barclay L.R.C., Artz J.D. & Mowat J.J. 1995. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox[®], between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1237: 77-85.
- 11 Barroso M.P., Diaz C.G., Lluch G.L., Malagon M.M., Crane F.L. & Navas P. 1997. Ascorbate and a-tocopherol prevent apoptosis induced by serum removal independent of Bcl-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 343(2): 243-248.
- 12 Baust J.G. 2008. The management of mammalian cells at low temperature. *Cell Preservation Technology*. 6(2): 111-112.
- 13 Baust J.G., Gage A.A., Clarke D., Baust J.M., Van Buskirk R., Beckman J.S. & Koppenol W.H. 2004. Nitric oxide superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *American Journal of Physiology*, v. 271, p. 1424-1437, 1996.
- 14 Beckman J.S. & Koppenol W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*. 271: 1424-1437.
- 15 Bilodeau J.F., Blanchette S., Cormier N. & Sirad M.-A. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*. 57: 1105-1122.
- 16 Bilodeau J.F. & Le Bras A. 1998. Catalase addition prevented a decrease in sperm motility of cryopreserved bovine semen exposed to reactive oxygen species. *Theriogenology*. 51: 337.
- 17 Borges E.N., Silva R.C., Futino D.O., Rocha-Junior C.M.C., Amorim C.A., Bão S.N. & Lucci C.M. 2009. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 59: 195-200.
- 18 Borges J.C. 2008. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial, fecundação *in vitro* e mensuração de radicais livres. Tese: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 70 pp.
- 19 Breininger E., Beorlegui N.B., O'Flaherty C.M. & Beconi M.T. 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 63: 2126-2135.
- 20 Bucak M.N., Atessahin A. & Yüce A. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 75: 128-134.
- 21 Campos E.B.P. & Yoshida W.B. 2004. O papel dos radicais livres na isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *Jornal da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascul*. 3(4): 357-366.
- 22 Celestino J.J.H., Santos R.R., Lopes C.A.P., Martins F.S., Matos M.H.T., Melo M.A.P., Bão S.N., Rodrigues A.P.R., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2008. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*. 108: 309-318.

- 23 Chang C.C., Sung L.Y., Lin C.J., Kort H.I., Yang X., Tian X.C. & Nagy Z.P. 2010. The oocyte spindle is preserved by 1,2-propanediol during slow freezing. *Fertility and Sterility*. 93: 1430-1439.
- 24 Chen S.U., Lien Y.L., Chao K.H., Lu H.F., Ho H.N. & Yang Y.S. 2000. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertility and Sterility*, 74: 804-808.
- 25 Chen S.U., Yang Y.S. 2009. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 48(1): 15-22.
- 26 Cohen M.V. 1989. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Annals of Internal Medicine*. 111: 918-931.
- 27 Cort W.M., Scott J.W., Araujo M., Mergens W.J., Cannalunga M.A., Oscada M., Harley H., Parrish D.R. & Pool W.R. 1975. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 52: 174-178.
- 28 De Lamirande & E. Gagnon C. 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*. 18: 487-495.
- 29 De La Vega A.C., Wilde O.R. 1991. Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Vertical integration of Argentine production systems*. 11: 151-165.
- 30 Dinara S., Sengoku K., Tamate K., Horikawa M. & Ishikawa M. 2001. Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Human Reproduction*. 16(9): 1976-1981.
- 31 Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martínez-Madrid B. & Van Langendonck A. 2004. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 364:1405-1410.
- 32 Dumont F., Marechal P.A. & Gervais P. 2006. Involvement of Two Specific Causes of Cell Mortality in Freeze-Thaw Cycles with Freezing to -196°C. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(2): 1330-1335.
- 33 Elmoazzen H.Y. 2000. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. 141p. Alberta, Canadá. Dissertation: University of Alberta, Faculty of Graduate Studies and Research.
- 34 Ernst E., Bergholdt S., Jorgensen J.S. & Andersen C.Y. 2010. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*. 25(5): 1280-1281.
- 35 Fahy G.M. 1984. Cryoprotectant toxicity reduction: specific or nonspecific? *CryoLetters*. 5: 287-294.
- 36 Fahy G.M. 2010. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. 60(3): 45-53.
- 37 Fernández-Santos M., Martínez-Pastor F., García-Macias V., Esteso M.C., Soler A.J., Paz P., Anel L. & Garde J.J. 2007. Sperm Characteristics and DNA Integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa Frozen in the Presence of Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants. *Journal of Andrology*. 28(2): 294-305.
- 38 Ferreira A.L.A. & Matsubara 1997. L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43: 61-68.
- 39 Ferreira R.M. 2008. Efeito da adição de antioxidante (Trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e ao meio de transporte de óocitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro. 138 f. Jaboticabal, SP. Dissertação: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- 40 Feugang J.M., De Roover R., Moens A., Le´Onard S., Dessy F. & Donnay I. 2004. Addition of b-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: 71-90.
- 41 Forest V., Peoc´H M., Campos L., Guyotat D. & Vergnon J.M. 2005. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice. *Cryobiology*. 50: 29-37.
- 42 Freitas V.J.F., Serova I.A., Andriiva L.I., Lopes Junior E.S., Teixeira D.I.A., Cordeiro M.F., Rondina D. P., Oliveira N.R., Arruda I.J., Limaverde J. B., Dvoriantschikov G. & Serov O. 2003. Birth of normal kids after microinjection of pronuclear embryos in a transgenic goat (*Capra hircus*) production program in Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 2: 200-205.
- 43 Fuller B.J. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 25: 375-388.
- 44 Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C. & Webb R. 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts at -196°C. *Human Reproduction*. 9: 597-603.
- 45 Graaf S.P., Evans G., Gillan L., Guerra M.M.P., Maxwell W.M.C. & O'brien J.K. 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.

- 46 Gualtieri R., Iaccarino M.B.S., Mollo V.B.S., Prisco M., Iaccarino S.M.D. & Talevi R. 2009. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertility and Sterility*. 91(4): 1023-1034.
- 47 Guyader-Joly C. 1998. Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. 193p. Paris, France. Tese: Université de Paris VI - Sciences de la Vie.
- 48 Hershko C. 1989. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars of Hematology*. 26: 277-285.
- 49 Hosseini S.M., Forouzanfar M., Hajian M., Asgari V., Abedi P., Hosseini L., Ostadhosseini S., Moulavi F., Langroodi M.S., Sadeghi H., Bahramian H., Eghbalsaid Sh. & Nasr-Esfahani M.H. 2009. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 26: 355-364.
- 50 Imhof M., Bergmeister H., Lipovac M., Rudas M., Hofstetter G. & Huber J. 2006. Orthotopic microvascular re-anastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and life birth. *Fertility and Sterility*. 85: 1208-1215.
- 51 Jain J.K. & Paulson R.J. 2006. Oocyte cryopreservation: review article, *Fertility and Sterility*. 86: 1037-1046.
- 52 Jeong Y.J., Kim M.K., Song H.J., Kang E.J. & Ock S.A.. 2009. Kumar, B.M.; Balasubramanian, S.; Rho, G.J. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 58: 181-189.
- 53 Jondet M., Dominique S. & Scholler R. 1984. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. *Cryobiology*. 21: 192-9.
- 54 Katayama K.P., Stehlik J., Juwayama M., Kato O. & Stehlik E. 2003. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertility and Sterility*. 80: 223-224.
- 55 Keros V., Xella S., Hultenby K., Pettersson K., Sheikhi M., Volpe A., Hreinsson J. & Hovatta O. 2009. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*. 24(7): 1670-1683.
- 56 Kusakabe H. & Kamiguchi Y. 2004. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. *Theriogenology*. 62: 897-905.
- 57 Lapointe J. & Bilodeau J.F. 2003. Antioxidant defenses are modulated in cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 68: 1157-1164.
- 58 Lapointe S, Sullivan R. & Sirard M.A. 1998. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 58(3): 747-753.
- 59 Li Z.L., Lin Q.L., Liu R.J., Xie W.Y. & Xiao W.F. 2007. Reducing oxidative DNA damage by adding antioxidants in human semen samples undergoing cryopreservation procedure. *Chinese Journal of Medical Genetics*. 87: 3174-3177.
- 60 Lima E.S & Abdalla D.S.P. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37(3): 292-303.
- 61 Lima-Verde I.B, Matos M.H.T, Bruno J.B., Martins F.S., Santos R.R., Bão S.N., Luque M.C.A., Vieira G.A.B., Silveira E.R., Rodrigues A.P.R., Figueiredo J.R., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. 2009. Effects of a-tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61: 57-65.
- 62 Lin T., Yen J., Kuo T., Gong K., Hsu K. & Hsu T. 2008. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnology*. 8: 38-50.
- 63 Liochev S.I. & Fridovich I. 1999. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*. 48: 157-161.
- 64 Mahfouz R., Sharma R., Thiyagarajan A., Kale V., Gupta S., Sabanegh E. & Agarwal A. 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*. 94 (6): 2141-2146.
- 65 Maia M.S. 2006. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox® e Catalase. 164 f. Botucatu, São Paulo. Tese: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 66 Mazur P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*. 168: 939-949.
- 67 Mazur P. 1980. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Origin Life*. 10: 137-159.
- 68 Mazur P. 1984. The freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology: cell physiology*. 247: 125-142.

- 69 Meirov D., Levron J., Eldar-Geva T., Hardan I., Fridman E. & Zalel Y. 2005. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 353: 318-21.
- 70 Mello-Filho A.C., Hoffman M.E. & Meneghini R. 1983. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemistry Journal*. 218: 273-5.
- 71 Meryman H.T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysics*. 3: 341-363.
- 72 Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P. & Boscoc C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68: 204-212.
- 73 Moniruzzaman M. R., Bao M., Taketsuru H. & Miyano T. 2009. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. 72 (2): 280-288.
- 74 Newton H., Fisher J., Arnold J.R.P., Pegg D.E., Faddy M.J. & Gosden R.G. 1998. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Human Reproduction*. 13: 376-380.
- 75 Nordberg J. & Arnér E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*. 31: 1287-1312.
- 76 Nunes E., Oliveira S.C. & Morais R.N. 2006. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. *Open Journal Systems*. 1(6): 1-32.
- 77 O'Flaherty C.M., Beorlegui N.B. & Beconi M.T. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Journal of Andrology*. 29: 269-275.
- 78 Paudel K.P., Kumar S., Meur S.K. & Kumaresan A. 2010. Ascorbic Acid, Catalase and Chlorpromazine Reduce Cryopreservation-induced Damages to Crossbred Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(2): 456-462.
- 79 Pegg D.E. 2002. Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers. *Cryobiology*. 44: 46-54.
- 80 Pegg D.E. 2007. Principles of Cryopreservation: Methods in Molecular Biology. In: Cryopreservation and Freeze-drying Protocols. Day J.G. & G.N. Stacey (Eds.). Totowa: *Humana Press*, pp.39-57.
- 81 Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M. & Martinez H.R. 2004. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. 12: 117-124.
- 82 Pinto L.C., Santos R.R., Faustino L.R., Silva C.M.G., Luz V.B., Maia-Júnior J.E., Soares A.A.X., Celestino J.J.H., Mafezoli J., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P.R. 2008. Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. *Cell Preservation Technology*. 6: 269-276.
- 83 Raabe D. 2007. A texture-component Avrami model for predicting recrystallization textures, kinetics and grain size. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*. 15: 39-63.
- 84 Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. & Castro L. 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 33: 1451-1464.
- 85 Rall W.F. & Fahy G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. 24: 387-402.
- 86 Rodrigues A.P.R., Amorim C.A., Costa S.H.F., Matos M.H.T., Santos R.R., Lucci C.M., Bao S.N., Ohashi O.M. & Figueiredo J.R. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*. 84: 211-227.
- 87 Sagach V.F., Scrosati M., Fielding J., Rossoni G., Galli C. & Visioli F. 2002. The water-soluble vitamin E analogue Trolox[®] protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo: a comparison with vitamin E. *Pharmacological Research*. 45: 435-439.
- 88 Salle B., Demirci B., Franck M., Rudigoz R.F., Guerin J.F. & Lornage J. 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemiovaries into ewes. *Fertility and Sterility*. 77: 403-408.
- 89 Santos I. 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12: 70-84.
- 90 Santos R.R., Celestino J.J.H., Lopes C.A.P., Melo M.A.P., Rodrigues A.P.R. & Figueiredo J.R. 2008. Criopreservação de foliculos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32: 9-15.

- 91 Santos R.R., Tharasanit T., Figueiredo J.R., Van Haeften T. & Van Den Hurk R. 2006. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell and Tissue Research*. 325: 423-531.
- 92 Satorre M.M., Breininger E., Beconi M.T. & Beorlegui N.B. 2007. a-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*. 68: 958-965.
- 93 Scott J.W., Cort W.M., Harley H., Parrish D.R. & Saucy G. 1974. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 51: 200-203.
- 94 Sen C.K., Khanna S. & Roy S. 2006. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Science*. 78: 2026-2032.
- 95 Sies H. & Stahl W. 1995. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62: 1315-1321.
- 96 Souza M.F., Tomé A.R. & Rao V.S.N. 1999. Inhibition by the bioflavonoid ternetin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51: 125-129.
- 97 Stachecki J.J. & Cohen J. 2004. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. *Reproductive BioMedicine Online*. 9: 152-163.
- 98 Steponkus P.L. & Webb M.S. 1992. Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: Somero GN, Osmond CB, Bolis CL. Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level. Berlin: *Springer-Verlag*, pp.338-362.
- 99 Steponkus P.L. & Weist S.C. 1978. Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing. In: Li P.H. & Sakai A. (Eds). Plant Cold Hardiness and Freezing Stress-Mechanisms and Crop Implications. New York: *Academic Press*, pp.75-91.
- 100 Tirelli M., Basini G., Grasselli F., Bianco F. & Tamanini C. 2005. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. *Domestic Animal Endocrinology*. 28: 17-33.
- 101 Vaca C.E., Wilhelm J. & Harms-Ringdahl M. 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutation Research*. 195: 137-149.
- 102 Wang X., Falcone T., Attaran M., Goldberg J.M., Agarwal A. & Sharma R.K. 2002. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*. 78: 1272-1277.
- 103 Welch K.D., Davis T.Z., Van Eden M.E. & Aust S.D. 2002. Deleterious iron mediated oxidation of biomolecules. *Free Radical Biology & Medicine*. 32: 577-583.
- 104 Wowk B. 2010. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 60: 11-22.
- 105 Wusteman M., Rauén U., Simmonds J., Hunds N. & Pegg D.E. 2008. Reduction of cryoprotectant toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. *Cryobiology*. 56: 72-79.
- 106 Yeoman R.R., Wolf D.P. & Lee D.M. 2005. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility & Sterility*. 83(1): 1248-1254.
- 107 Yoon T.K., Lee D.R., Cha S.K., Chung H.M., Lee W.S. & Cha K.Y. 2007. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility*. 88: 952-956.
- 108 Zhmakin A.I. 2008. Physical aspects of cryobiology. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. 178: 243-266.

