

## Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão

*Free radicals, antioxidant and sperm function in mammals: a review*

M.S. Maia<sup>1,3</sup>, S.D. Bicudo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Semiárido/EMPARN, Natal, RN, CEP: 59062-500, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência. [marcianemaia@yahoo.com.br](mailto:marcianemaia@yahoo.com.br)

### Resumo

A primeira indicação da geração de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS) pelo espermatozoide de mamíferos e seus efeitos na função espermática, foram relatados por MacLeod em 1943. No entanto, foi somente a partir dos anos 70 que as pesquisas sobre o papel das ROS na fisiopatologia espermática de várias espécies se intensificaram. A produção de pequenas quantidades de ROS no sêmen é necessária para a função espermática normal, no entanto altas concentrações dessas moléculas são prejudiciais às células espermáticas. Esta revisão enfoca a natureza das ROS e sua influência sobre a fisiologia e a patologia do espermatozoide de mamíferos.

**Palavras-chave:** catalase, diluente, espécies reativas do metabolismo do oxigênio, espermatozoide, peroxidação lipídica, plasma seminal, sêmen, Trolox.

### Abstract

*The first indication of the generation of reactive oxygen species (ROS) by the mammal spermatozoa and its effect in the sperm function was reported by MacLeod in 1943. Nevertheless, it was only in the years 70 that the researches focusing the role of ROS in the sperm pathophysiology of several species were intensified. The production of small amounts of ROS in semen is necessary for the normal spermatoc function; however, high concentrations of these molecules are harmful to the spermatozoa. This review focuses the nature of the ROS and its role in the physiology and pathology of the spermatozoa of the mammals.*

**Keywords:** extender, lipid peroxidation, catalase, reactive oxygen species, semen, seminal plasma, sperm, Trolox.

### Introdução

Os termos radicais livres, oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS, de *reactive oxygen species*) são usados no meio científico para identificar os intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, entre eles: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

A célula espermática é capaz de gerar e degradar ROS, as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados visando entender o papel desses radicais na função espermática. Já é evidente a participação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, quando em baixas concentrações, nos eventos que culminam com a fertilização em diferentes espécies. Também é conhecida a susceptibilidade do espermatozoide de mamíferos aos efeitos citotóxicos das ROS e ao estresse oxidativo. A geração excessiva de ROS pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo. Contudo, o plasma seminal, que é rico em antioxidantes, oferece proteção ao espermatozoide, compensando a sua baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes.

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática e que a adição de antioxidantes aos meios de congelamento e refrigeração de sêmen ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais.

Nesta revisão, serão abordados aspectos ligados à geração e degradação de ROS no sêmen, bem como seu envolvimento na função espermática e a contribuição da adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento do sêmen.

## Espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS)

Em condições de normalidade do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo, são formados intermediários reativos como: os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2^*$ ) e hidroxila ( $OH^*$ ), e o não radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ; Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. É gerado de forma espontânea, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxygenases. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (Nordberg e Arnér, 2001).

O radical hidroxila ( $OH^*$ ) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{++}$  ou  $Cu^+$ ), denominada reação de Fenton (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001). Reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical  $OH^*$ . É gerado a partir da dismutação enzimática do  $O_2^-$  pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

## ROS e função espermiática

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função do espermatozoide foi obtida por MacLeod (1943), quando observou que o espermatozoide humano incubado na presença de elevadas concentrações de  $O_2$  perdia rapidamente sua motilidade e que a adição de catalase, sob as mesmas condições, evitava a perda de motilidade.

### *Produção de ROS no sêmen*

As ROS mais comumente geradas pelo espermatozoide são: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Aitken, 1995; De Lamirande e Gagnon, 1999).

No entanto, o mecanismo bioquímico responsável pela produção de ROS pelo espermatozoide ainda não está elucidado. Existem evidências da presença de uma oxidase na membrana plasmática do espermatozoide que, quando ativada, gera  $O_2^-$  (Aitken, 1995; De Lamirande et al., 1997). Aitken (1995) sugere que a nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato, NAD(P)H, seja a principal fonte de elétrons responsáveis pela produção de  $O_2^-$  pelo espermatozoide humano com o possível envolvimento do sistema NAD(P)H-oxidase, como acontece em outros tipos de células. Aitken et al. (2003) demonstraram que o espermatozoide humano é uma célula redox ativa que possui diferentes sistemas de transporte de elétrons. Um componente significativo dessa atividade é localizado na superfície celular e pode ser facilmente removido das células intactas por um simples processo de lavagem (essa atividade aparece no sobrenadante das células lavadas), sugerindo que a atividade redox ocorre na superfície do espermatozoide, o que é consistente com a atividade da enzima de superfície celular NAD(P)H-oxidase. Sabeur e Ball (2006) confirmaram que o espermatozoide equino usa NAD(P)H como substrato para geração de superóxido. Recentemente, De Lamirande e Lamothe (2009) rejeitaram a hipótese de que a enzima espermiática é similar à NADPH-oxidase, porque os componentes dessa oxidase não foram encontrados no espermatozoide submetido à análise de *imuno blotting*. Confirmam, porém, que uma oxidase, ainda não identificada, localizada na membrana, é a responsável pela produção de  $O_2^-$  no espermatozoide.

Uma segunda hipótese para a produção de ROS é a diaforase espermiática (uma oxidoreductase NAD(P)H-dependente), localizada na peça intermediária do espermatozoide e integrada à cadeia respiratória mitocondrial (Gavella e Lipovac, 1992). Plante et al. (1994) sugeriram a predominância da diaforase espermiática como sistema gerador de ROS pelo espermatozoide. Esses autores observaram que apenas um terço das ROS produzidas pelo espermatozoide são liberadas para fora da célula e argumentaram que, se as ROS são geradas dentro da célula, elas têm menos chance de atingir o espaço extracelular do que se forem geradas por uma NAD(P)H-oxidase na membrana plasmática, que libera seus produtos no meio extracelular, como ocorre com os leucócitos.

As principais fontes de ROS no ejaculado são os espermatozoides, morfológica ou funcionalmente, anormais e os leucócitos, que podem estar presentes no ejaculado. Os espermatozoides imóveis e morfológicamente anormais geram maiores quantidades de ROS que os normais. Ao incubarem espermatozoides de garanhão, na presença ou não de neutrófilos ativados, Baumber et al. (2002) observaram um aumento

significativo na geração de  $H_2O_2$ , quando os neutrófilos estavam presentes, associado a um decréscimo na motilidade espermiática total. No sêmen de homens inférteis, é gerada uma grande quantidade de ROS comparada àquela produzida no sêmen de homens férteis, e os espermatozoides defeituosos ou não funcionais têm grande contribuição nessa geração (Aitken, 1995). Segundo Zini et al. (2000), o plasma seminal de homens inférteis não é deficiente em enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e /ou catalase, e o alto nível de ROS presente no sêmen de alguns desses homens é atribuído à produção excessiva de ROS e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes. No sêmen de garanhão, Ball et al. (2001b) observaram que os espermatozoides anormais presentes no sêmen geram, significativamente, maiores quantidades de  $H_2O_2$  do que os normais.

No sêmen ovino criopreservado no diluidor Tris-gema aditivado ou não de Trolox-C e catalase, Maia (2006) detectou a geração de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e OH (LPO) tanto no sêmen congelado na presença quanto na ausência dos antioxidantes, indicando que o processo de criopreservação induz à geração de ROS nessa espécie.

#### *Sistemas de defesa antioxidantes no sêmen e no espermatozoide*

Nos sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre a quantidade de ROS gerada e a quantidade removida pelo sistema antioxidante celular. Normalmente, o dano celular ocorre quando este equilíbrio é perturbado, levando a célula ao estresse oxidativo. Em princípio, o estresse oxidativo ocorre quando o sistema antioxidante de defesa celular não consegue eliminar o excesso de ROS produzidas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999).

O espermatozoide conta com um sistema enzimático de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), bem como antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol (Aitken, 1995). No meio extracelular, ele é protegido pelo plasma seminal que contém redutores de ROS, enzimáticos e não enzimáticos, como: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione e outros tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E (Józwik et al., 1997; Overveld et al., 2000; Zini et al., 2000). Como a capacidade biosintética do espermatozoide é limitada, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas ROS geradas pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (Aitken, 1995).

A enzima superóxido dismutase (SOD) presente no citoplasma (Cu, Zn – SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em uma de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) catalisam a redução do  $H_2O_2$  a água e  $O_2$  (Nordberg e Arnér, 2001). Enzimas removedoras de ROS, como a superóxido dismutase, glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase ou catalase, já foram detectadas no espermatozoide e/ou no plasma seminal de várias espécies, incluindo ovinos (Kasimanickam et al., 2006; Bucak et al., 2008; Martí et al., 2008), caprinos (Atessahin et al., 2008; Bucak et al., 2009), bovinos (Bilodeau et al., 2000; O'Flaherty et al., 2003; Sariözkan et al., 2009) e homem (Aitken et al., 1996; Zini et al., 2000; Misro et al., 2004).

No sêmen fresco de carneiro, a atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase e glutathione peroxidase no espermatozoide é baixa, enquanto a atividade de superóxido dismutase é centena de vezes mais alta (Kasimanickam et al., 2006; Martí et al., 2008). Quando incubaram o espermatozoide ovino a 15°C por seis horas, Martí et al. (2003) não observaram diferença significativa na atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase com o tempo de incubação. No entanto, após um ciclo de congelamento e descongelamento, Martí et al. (2008) observaram que não houve mudança significativa na atividade da glutathione redutase e glutathione peroxidase no sêmen, enquanto a atividade da superóxido dismutase foi cerca de duas vezes menor no sêmen descongelado do que no fresco e refrigerado. No sêmen ovino congelado em diluidor à base de Tris, Bucak et al. (2008) detectaram baixa atividade de glutathione peroxidase e catalase.

No sêmen fresco de bovinos, Bilodeau et al. (2000) observaram que a atividade de glutathione peroxidase, no espermatozoide, é baixa e que nenhuma atividade de catalase é detectada, enquanto, no plasma seminal, existe uma baixa atividade de catalase e alta atividade de glutathione peroxidase. Já a atividade de superóxido dismutase é alta tanto no espermatozoide quanto no plasma seminal, e os níveis de glutathione são altos no espermatozoide e muito mais baixos no plasma seminal, demonstrando que a superóxido dismutase e a glutathione são os dois principais antioxidantes intracelulares no espermatozoide bovino e que a atividade de glutathione peroxidase e catalase detectada no sêmen da espécie é atribuída ao plasma seminal. Para O'Flaherty et al. (2003), a superóxido dismutase parece ser o principal antioxidante enzimático presente no sêmen bovino.

No sêmen bovino criopreservado, também foi detectada atividade de glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (Bilodeau et al., 2000; Stradaioli et al., 2007; Sariözkan et al., 2009). No entanto, após um ciclo de congelamento e descongelamento, Bilodeau et al. (2000) observaram uma redução de 50% na atividade total da superóxido dismutase e de 70% no nível total de glutathione no espermatozoide em relação

ao sêmen fresco. Stradaioli et al. (2007) também observaram uma redução de 58% nos níveis de glutatona no espermatozoide bovino após a criopreservação com o diluente tradicional Tris-gema, quando comparado ao sêmen fresco. Esses resultados demonstram que a criopreservação reduz os níveis dos antioxidantes presentes tanto na célula quanto no plasma seminal, fortalecendo a evidência de que, entre as causas da deterioração da qualidade do sêmen após um ciclo de congelamento e descongelamento, estão aquelas ligadas ao estresse oxidativo.

Existe ainda uma relação inversa entre a atividade de enzimas antioxidantes e a qualidade espermiática. No sêmen de homens inférteis, Aitken et al. (1996) observaram uma correlação negativa entre atividade da superóxido dismutase e vários aspectos da função espermiática, incluindo capacidade de fusão espermatozoide-ovócito, morfologia, motilidade espermiática e uma correlação positiva com os níveis de lipoperoxidação (LPO). Nesse estudo, a atividade da superóxido dismutase foi maior na população de espermatozoides defeituosos do que nos espermatozoides funcionais. No sêmen de homens férteis e saudáveis, submetido ao estresse oxidativo induzido pela adição de  $H_2O_2$ , Misro et al. (2004) observaram que a categoria mais afetada pelo estresse oxidativo mostrou maior atividade de superóxido dismutase e catalase no espermatozoide e no plasma seminal, enquanto o nível de lipoperoxidação no espermatozoide foi significativamente maior do que no sêmen com boa capacidade de resistência ao estresse oxidativo. Shamsi et al. (2009) também observaram, no sêmen de homens inférteis, uma correlação inversa entre a porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais e as concentrações de superóxido dismutase, glutatona e catalase no plasma seminal. Relataram, ainda, que o sêmen com um perfil antioxidante reduzido estava intimamente associado com baixa qualidade espermiática e com um mais alto grau de fragmentação do DNA, comparado ao controle. Essa associação entre a atividade das enzimas antioxidantes e a função espermiática defeituosa reflete a presença de células germinativas primordiais no sêmen bem como no citoplasma residual nas células espermiáticas; indução direta de lipoperoxidação devido à excessiva produção de ROS e à remoção do  $O_2^-$  que tem papel biológico importante na capacitação espermiática (Aitken et al., 1996; Shamsi et al., 2009).

No espermatozoide de cordeiros, a atividade da glutatona peroxidase apresentou uma correlação negativa com a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologicamente normais e correlação positiva com os níveis de lipoperoxidação na célula espermiática (Kasimanickam et al., 2006). Ou seja, no sêmen de baixa qualidade, com motilidade progressiva baixa, alto percentual de espermatozoides anormais e alto nível de lipoperoxidação, o nível de glutatona peroxidase foi mais alto do que no sêmen de boa qualidade. Segundo os autores, embora os espermatozoides estivessem passando por um alto nível de estresse oxidativo, a glutatona peroxidase não foi capaz de protegê-los contra os efeitos tóxicos das ROS. Os níveis de glutatona peroxidase permaneceram elevados, com deterioração da qualidade espermiática. Essa situação, possivelmente, está relacionada à produção excessiva de ROS pelos espermatozoides anormais e não funcionais que, segundo Aitken (1995), geram maiores quantidades de ROS que os normais, e não a uma deficiência no sistema de defesa antioxidante.

### *ROS e capacitação espermiática*

Existem evidências de que pequenas quantidades do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio são necessárias para que ocorra capacitação espermiática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas no humano (De Lamirande e Gagnon, 1993; Aitken, 1995), bovino (O'Flaherty et al., 2003) e equino (Baumber et al., 2003).

Visando avaliar o envolvimento das ROS na capacitação do espermatozoide bovino, O'Flaherty et al. (2003) incubaram espermatozoides na presença de heparina (indutor da capacitação espermiática) e de várias concentrações de catalase (10-100 $\mu$ g/mL) e, em seguida, determinaram a concentração de  $H_2O_2$  gerado e o percentual de espermatozoides capacitados. Os níveis de  $H_2O_2$  foram significativamente mais altos nos espermatozoides submetidos à capacitação induzida do que no controle, no entanto a adição de catalase (removedor de  $H_2O_2$ ) ao meio não causou nenhuma variação significativa na porcentagem de espermatozoides capacitados. A inibição da capacitação só foi observada quando a superóxido dismutase (SOD) foi adicionada ao meio, juntamente com a catalase. Como a SOD é uma enzima que remove  $O_2^-$ , isso indica que o ânion superóxido é a ROS envolvida nos mecanismos celulares que levam à capacitação no espermatozoide bovino.

Baumber et al. (2003) examinaram a influência do  $H_2O_2$  e do  $O_2^-$  na capacitação do espermatozoide equino, incubando os espermatozoides na presença do sistema xantina- xantina oxidase (X-XO, gerador de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ ). As ROS geradas pelo sistema X-XO promoveram a capacitação do espermatozoide equino, e a adição de catalase ou superóxido dismutase preveniu o aumento no número de espermatozoides vivos com acrossomo reagido, indicando a participação de ambas na capacitação espermiática nessa espécie.

No espermatozoide de homens, Villegas et al. (2003) observaram que a incubação de espermatozoides com leucócitos ativadas (fonte de ROS) resultou em um aumento na capacitação espermiática, sugerindo que a capacitação do espermatozoide humano pode ser induzida pelas ROS. De Lamirande e Lamonthé (2009) relataram que tanto o superóxido ( $O_2^-$ ) quanto o óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) estão envolvidos na capacitação do espermatozoide humano, e que há uma diferença entre essas duas ROS quanto ao período de tempo em que elas são necessárias; o  $O_2^-$  para os primeiros 30 minutos, e o  $NO^\bullet$  por mais de duas horas.



### Danos causados ao espermatozoide pelas ROS

Embora a geração controlada de ROS tenha funções fisiológicas em diferentes tipos de células, altas concentrações destas são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Distúrbios no balanço oxidante-antioxidante, em favor do oxidante, levam ao estresse oxidativo, que, em princípio, pode ser causado por redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de ROS (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade e na viabilidade espermatócica e à fragmentação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (Armstrong et al., 1999; Krzyosiak et al., 2000; Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Duru et al., 2000).

Krzyosiak et al. (2000) observaram um efeito deletério do  $H_2O_2$  na motilidade e na viabilidade do espermatozoide bovino durante a incubação à temperatura ambiente por nove dias. Observaram também um aumento na susceptibilidade à desnaturação *in situ* do DNA espermático.

Baumber et al. (2000) examinaram a influência das ROS geradas pelo sistema xantina-xantina oxidase (X-XO) sobre a motilidade, a viabilidade, a integridade acrossomal, o potencial de membrana mitocondrial e a peroxidação dos lipídios da membrana do espermatozoide equino, incubado por 30 minutos na presença de catalase, superóxido dismutase ou glutatona. Aos 30 minutos de incubação com o sistema X-XO, houve um declínio significativo em vários parâmetros da motilidade espermatócica, quando comparado ao controle, sendo que a catalase preveniu o decréscimo em todos os parâmetros da motilidade, enquanto a superóxido dismutase não o fez. Como o sistema X-XO gera tanto  $H_2O_2$  quanto  $O_2^-$ , a habilidade da catalase, um removedor de  $H_2O_2$ , em prevenir o declínio na motilidade indica que o  $H_2O_2$  é o principal ROS citotóxico para o espermatozoide equino. A geração de ROS não teve efeito significativo sobre a viabilidade ou a integridade acrossomal, nem sobre o potencial de membrana mitocondrial ou os níveis de lipoperoxidação, sendo a motilidade espermatócica o melhor indicador de estresse oxidativo nessa espécie.

Baumber et al. (2002) observaram, também, uma influência significativa das ROS geradas por neutrófilos ativados sobre a motilidade do espermatozoide equino, havendo um declínio significativo no total de espermatozoides móveis e na motilidade progressiva, quando o sêmen foi incubado na presença de neutrófilos.

Armstrong et al. (1999) verificaram que o  $H_2O_2$  é tóxico ao espermatozoide humano e que é responsável pela inibição do movimento espermático e pela produção de energia (ATP). Duru et al. (2000) demonstraram que o estresse oxidativo, oriundo da incubação do espermatozoide de homens com  $H_2O_2$ , resultou em severa perda de motilidade e indução de danos ao DNA.

Bilodeau et al. (2001) também observaram um efeito negativo de  $H_2O_2$  na motilidade espermatócica de bovinos. Em estudo posterior, Bilodeau et al. (2002) notificaram que o  $H_2O_2$  foi o responsável pela perda da motilidade do espermatozoide bovino, mas não exerceu efeito negativo na viabilidade espermatócica.

### Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação de lipídios é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ( $H_2C=CH_2$ ); devido a isso, são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que passa pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio por qualquer ROS que tenha reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-CH_2-$ ). O seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peróxila ( $R-C^\bullet$  e  $-ROO^\bullet$ ) produzidos propagam-se até destruírem a si próprios (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A membrana que rodeia as células e as organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, por isso ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelas ROS e susceptível à peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999).

O método mais usado para a mensuração da lipoperoxidação é o do ácido tiobarbitúrico (TBA), que é um método espectrofotométrico, o qual mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios. Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação, ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermatócica, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malonaldeído. No método do ácido tiobarbitúrico, o produto final medido é o malonaldeído (MDA) ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (Jentzsch et al., 1996; Sharma e Agarwal, 1996; Lapenna et al., 2001; Sanocka e Kurpisz, 2004).

Os lipídios da membrana espermatócica são ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), os quais conferem a fluidez necessária para que ocorram os eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No espermatozoide oxidado, ocorre diminuição da fluidez da membrana, aumento da

permeabilidade e diminuição da capacidade de fertilização (Aitken, 1995; De Lamirande e Gagnon, 1999). Além disso, existe uma relação entre a lipoperoxidação no sêmen e a motilidade e a morfologia espermiática. Por essa razão, a peroxidação dos lipídios é considerada uma causa importante de disfunção espermiática, sendo que pode ser controlada ou revertida pelo uso de antioxidantes no meio diluidor.

O radical hidroxila é reconhecido como o iniciador da lipoperoxidação (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999), no entanto Griveau et al. (1995) observaram que o sistema xantina-xantina oxidase induz à lipoperoxidação da membrana dos espermatozoides de homens, uma vez que os níveis de hidroperóxidos de lipídios e a degradação de ácidos graxos poli-insaturados foram maiores em relação ao controle. Concluíram, ainda, que tanto o  $H_2O_2$  quanto o  $O_2^-$  estavam envolvidos na iniciação da lipoperoxidação, desde que a adição de catalase ou superóxido dismutase ao sistema evitou a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana.

No sêmen de homens férteis e inférteis, os espermatozoides defeituosos ou menos resistentes ao estresse oxidativo apresentam níveis de lipoperoxidação mais altos que os observados em espermatozoides funcionais (Aitken et al., 1996; Misro et al., 2004, Shamsi et al., 2009). Aitken et al. (1993) observaram uma relação entre os níveis de lipoperoxidação no sêmen de homens e a morfologia espermiática, as características do movimento espermiático e a capacidade de fusão espermatozoide-ovócito. A população de espermatozoides morfologicamente anormais e a de mortos produziram três vezes mais malonaldeído (MDA) do que a população de espermatozoides funcionais. A alta produção de malonaldeído pela primeira população espermiática foi associada a uma alta porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais e de células imóveis. Engel et al. (1999) mediram a lipoperoxidação espontânea e induzida por ferro em amostras de sêmen de homens com histórico de infertilidade. As amostras foram separadas em três grupos, de acordo com sua motilidade progressiva, determinada à zero hora e às três horas, após a liquefação. As mais altas taxas de lipoperoxidação foram observadas nas amostras de espermatozoides com baixa capacidade de manutenção da motilidade progressiva após três horas de incubação (motilidade progressiva normal à zero hora e baixa às três horas). Kao et al. (2008), trabalhando com sêmen de homens, observaram que as amostras com maior capacidade antioxidante foram capazes de prevenir a formação de peróxidos de lipídios e de 8-OhdG (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, indicativo de oxidação no DNA espermiático) no espermatozoide e de manter a motilidade espermiática.

No sêmen bovino, Beorlegui et al. (1997) observaram uma alta correlação negativa entre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a motilidade espermiática. As amostras de sêmen com menor motilidade e vigor apresentaram maior susceptibilidade à lipoperoxidação. Observaram, também, que os espermatozoides do sêmen com maior susceptibilidade à lipoperoxidação e menor motilidade espermiática possuíam menor capacidade de passar pela reação acrossomal, induzida pelo cálcio ionóforo, quando comparados com aqueles com menores níveis de peroxidação lipídica. Esses dados demonstram que peroxidação dos lipídios causa danos à membrana plasmática e que os espermatozoides com maior integridade de membrana plasmática têm maior capacidade de passar pela reação acrossomal possivelmente devido à preservação da sua regularidade funcional.

No sêmen de cordeiros, Kasimanickam et al. (2006) observaram uma correlação negativa entre o nível de malonaldeído no plasma e no espermatozoide e a motilidade e a morfologia espermiática. Nos animais com espermograma insatisfatório, a porcentagem de células morfologicamente normais e com motilidade progressiva foi menor do que no sêmen dos cordeiros com espermograma satisfatório ou questionável, enquanto a produção de malonaldeído foi maior tanto no plasma seminal quanto no espermatozoide.

No sêmen ovino incubado a 37°C por 120 minutos, no meio Tris-gema com ou sem antioxidante, Sarlós et al. (2002) observaram um aumento na concentração de malonaldeído nas amostras sem antioxidante, durante o período de incubação, enquanto nas amostras com antioxidante, exceto para a vitamina E, os níveis de malonaldeído se mantiveram mais baixos e sem alteração, no mesmo período. Aisen et al. (2005) determinaram os níveis de lipoperoxidação no espermatozoide ovino, criopreservado em diluente Tris (isotônico) e Tris+trealose (hipertônico), e observaram que, imediatamente após a descongelação, não houve diferença significativa nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico entre as células espermiáticas criopreservadas nos dois diluidores. No entanto, após três horas de incubação a 37°C, os níveis de peróxidos de lipídios foram mais baixos nos espermatozoides criopreservados no diluidor com trealose. Maia (2006) mediu a lipoperoxidação espontânea e induzida por ferro, em amostras de sêmen de carneiros Santa Inês, congelado no diluidor Tris-gema aditivado ou não com o antioxidante Trolox-C, e observou que a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), geradas na lipoperoxidação espontânea, não diferiu entre as amostras congeladas com ou sem antioxidante. No entanto, quando a lipoperoxidação foi induzida pelo ferro ( $FeSO_4$ ), a concentração de TBARS foi maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen congelado sem antioxidante (de  $3,4 \pm 0,17$  nmol/ $10^8$  espermatozoides) do que na presença de Trolox-C ( $2,07 \pm 0,17$  nmol/ $10^8$  espermatozoides). Os resultados demonstram que, em situação de estresse oxidativo, o Trolox-C é hábil em inibir a propagação da lipoperoxidação no sêmen ovino durante um ciclo de congelação e descongelação.

No sêmen caprino criopreservado em diluidor à base de Tris, aditivado ou não com os antioxidantes glutamina e ácido hialurônico, Bucak et al. (2009) observaram que os antioxidantes não foram eficazes em

prevenir a lipoperoxidação quando comparados ao controle. Atessahin et al. (2008) também não observaram efeito da trealose e cisteína na prevenção da formação de malonaldeído; apenas a adição de taurina (75 mM) produziu uma redução nos níveis de lipoperoxidação no sêmen caprino descongelado.

Cerolini et al. (2000) incubaram o sêmen de varrão por cinco dias em meio com ou sem vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e observaram que houve incorporação do  $\alpha$ -tocoferol à membrana espermiática e uma grande redução na susceptibilidade à lipoperoxidação.

Neild et al. (2002) utilizaram a sonda fluorescente C11B-FA, para avaliar a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática do espermatozoide de garanhões, e observaram que a lipoperoxidação ocorreu, principalmente, na peça intermediária.

#### *Uso de antioxidantes no diluidor*

A adição de antioxidantes ao diluidor tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico das ROS.

Os antioxidantes presentes no plasma seminal ajudam a proteger o espermatozoide dos danos oxidativos, mas a lavagem, adotada no processamento do sêmen de algumas espécies, remove parte desta capacidade protetora. Além disso, pode haver contaminação dos meios de lavagem e diluentes com íons de metais de transição, como o  $Fe^{++}$  ou  $Cu^{+}$ , que podem desencadear as reações químicas que geram ROS (Halliwell e Gutteridge, 1999). Mesmo quando não há lavagem, a concentração dos antioxidantes presentes no sêmen é reduzida com a diluição deste, diminuindo consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural. Assim, a adição de antioxidantes, ainda que em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermiática no sêmen manipulado.

Em estudos realizados com espermatozoides livres de plasma seminal, Jones et al. (1979) observaram que, após sucessivas lavagens, o espermatozoide humano produz mais malonaldeído e que a adição de plasma seminal ou de antioxidantes ao espermatozoide lavado suprime tanto a peroxidação lipídica quanto o declínio na motilidade espermiática, indicando que a presença do plasma seminal evita a lipoperoxidação.

Existem relatos de que a adição de antioxidantes ao diluidor melhora a motilidade e a viabilidade do espermatozoide bovino (Krzyzosiak et al., 2000; Bilodeau et al., 2002), equino (Baumber et al., 2002), ovino (Maxwell e Stojanov, 1996; Upreti et al., 1998) e, ainda, a capacidade fertilizante (*in vitro*) do espermatozoide ovino (Maxwell e Stojanov, 1996).

Aurich et al. (1997), trabalhando com sêmen de garanhão diluído em meio à base de leite desnatado ou glicina e resfriado a 5°C, avaliaram o efeito da catalase e do ácido ascórbico na motilidade e na integridade da membrana do espermatozoide e observaram que a adição de ácido ascórbico resultou em um aumento na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, nos dois diluidores, enquanto a catalase não exerceu nenhuma influência nesse parâmetro nos dois diluidores. A motilidade também não foi influenciada pelos dois antioxidantes em qualquer dos diluidores. Ainda no sêmen de garanhões, refrigerado a 5°C, Ball et al. (2001a) avaliaram o efeito da catalase, hidroxitolueno butilado, vitamina E, vitamina C, Tempo, Trolox e albumina sérica bovina sobre a manutenção da motilidade espermiática. Não foi observada nenhuma melhora significativa na motilidade com a adição desses antioxidantes. Já Baumber et al. (2002) observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluidor do sêmen de equinos. A catalase reduziu a geração de  $H_2O_2$  pelos neutrófilos ativados e preveniu o declínio na motilidade espermiática total. No entanto, não exerceu nenhuma influência sobre a motilidade progressiva. Os autores concluíram que, em garanhões com plasma seminal com baixa capacidade antioxidante ou com alta contaminação por neutrófilos, o estresse oxidativo pode ser minimizado com a adição de catalase.

Krzyzosiak et al. (2000) observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluente, na sobrevivência, na motilidade e na viabilidade do espermatozoide bovino. Bilodeau et al. (2002) verificaram que a adição de pequenas quantidades de catalase (1 a 5 U/mL) era suficiente para evitar os danos causados pelo  $H_2O_2$  à motilidade do espermatozoide bovino.

Bilodeau et al. (2001) avaliaram o efeito dos tióis glutatona, cisteína e 2-mercaptoetanol na prevenção da perda de motilidade do espermatozoide bovino, criopreservado em diluidor à base de Tris-gema, na presença ou ausência de estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2$ . Na ausência de fonte externa de  $H_2O_2$ , todos os tióis, em concentrações acima de 0,5 mM, mantiveram a motilidade espermiática alta por seis horas. Entretanto, na presença de  $H_2O_2$  exógeno, foi necessário 1mM de cada tiol para proteger efetivamente a motilidade espermiática por seis horas. Esses pesquisadores concluíram que o efeito deletério da criopreservação na motilidade espermiática pode ser controlado pela adição desses tióis ao diluidor em concentrações de 1mM.

Foote et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de glutatona, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipotaurina, tempo e tempo ao diluente à base de leite integral e glicerol sobre a motilidade e a fertilidade do espermatozoide bovino. Esses antioxidantes não exerceram nenhum efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade em relação ao controle, o que foi atribuído à presença de um antioxidante natural abundante no leite, a caseína, que já exercia essa função no diluente estudado.

Trabalhando com sêmen de carneiros na forma líquida, Sarlós et al. (2002) avaliaram o efeito dos

antioxidantes acetato de  $\alpha$ -tocoferol, glutathione peroxidase, aromex, resveratrol e da associação de resveratrol + vitamina E ou resveratrol + aromex na motilidade e integridade das membranas espermiáticas. A adição dos antioxidantes prolongou o período de conservação do sêmen, melhorou a motilidade do espermatozoide e reduziu o grau de danos celulares. Maxwell e Stojanov (1996) também observaram efeito benéfico da adição dos antioxidantes catalase, superóxido dismutase, citocromo c e glutathione peroxidase ao diluidor do sêmen ovino sobre a viabilidade espermiática. Todos os antioxidantes foram hábeis em melhorar tanto a sobrevivência quanto a integridade acrossomal do espermatozoide durante a estocagem do sêmen na forma líquida. Já Upreti et al. (1997) não observaram nenhum efeito benéfico da adição de antioxidantes (vitamina E, n-propilgalato, desferal e catalase) ao diluidor, na manutenção da motilidade do espermatozoide de carneiros incubados a 38 °C, atribuindo o resultado a um efeito antioxidante do próprio diluente utilizado, que foi o RSD-1 (diluente quimicamente definido para sêmen ovino).

Sánchez-Partida et al. (1997) avaliaram o efeito dos compostos epididimários taurina, hipotaurina e inositol e dos antioxidantes carnosina e ácido ascórbico na motilidade e na fertilidade do espermatozoide ovino congelado em diluente à base de Tris-gema, com e sem glicerol. Os autores observaram que apenas a taurina exerceu efeito positivo na motilidade espermiática, tanto na presença quanto na ausência de glicerol. No entanto, apesar da melhora na motilidade espermiática, a fertilidade do sêmen congelado na presença de taurina (50 mM) não diferiu da observada no sêmen congelado sem taurina. Isso indica que outros fatores, além da motilidade, estão envolvidos na capacidade fertilizante e na função do espermatozoide criopreservado.

Ainda no sêmen ovino criopreservado, Maia et al. (2009) avaliaram o efeito da adição dos antioxidantes catalase, Trolox (análogo sintético da vitamina E) e da combinação Trolox e catalase, ao diluidor Tris-gema, sobre a motilidade e a viabilidade espermiática e observaram que a adição de catalase ao diluidor teve um efeito benéfico na motilidade quando comparado às amostras congeladas no diluidor contendo Trolox, no entanto não melhorou esse parâmetro, em relação ao controle (sem antioxidantes). Contudo, ambos os antioxidantes, Trolox e catalase, foram hábeis em preservar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, quando comparado ao controle. Maia (2006) observou ainda que, em situação de estresse oxidativo, induzido pela adição de ferro,  $H_2O_2$  ou sistema gerador de  $O_2^-$  (xantina- xantina oxidase) ao meio de incubação, os antioxidantes foram eficazes em remover o excesso de ROS e manter o equilíbrio do sistema.

No sêmen de bodes, Sinha et al. (1996) observaram um efeito benéfico da adição de glutathione ao diluente de congelação. Houve aumento da motilidade e diminuição da porcentagem de anormalidades acrossomais no espermatozoide descongelado. A taxa de fertilidade do sêmen congelado na presença de glutathione foi maior, mas não significativamente, do que aquela observada para o sêmen congelado apenas em Tris. Atessahin et al. (2008) avaliaram o efeito de doses crescentes de taurina, cisteína e trealose na qualidade do sêmen caprino descongelado e observaram que os antioxidantes não melhoraram a motilidade espermiática nem a integridade acrossomal, quando comparados ao controle. Bucak et al. (2009), avaliando o efeito dos antioxidantes glutamina e ácido hialurônico sobre a motilidade e a viabilidade do espermatozoide caprino pós-descongelação, relataram que nenhuma diferença foi observada na porcentagem de acrossomos danificados e espermatozoides anormais após a suplementação com os antioxidantes. No entanto, a adição de glutamina promoveu um aumento na motilidade espermiática e na integridade de membrana plasmática.

### Considerações finais

A produção excessiva de ROS no sêmen leva à disfunção espermiática e à diminuição da capacidade de fertilização. No entanto, essas ROS exercem um papel-chave na regulação da competência funcional da célula espermiática, uma vez que  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  estão envolvidos no mecanismo de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão esperma-ovócito em várias espécies.

A susceptibilidade ao estresse oxidativo varia entre espécies, indivíduos e entre ejaculados, consequentemente, a incidência e a severidade do dano oxidativo também variam. Assim, o impacto do estresse oxidativo na competência funcional ou na fertilidade do sêmen é mais uma questão de “grau” ou de quão severo é o estresse do que da presença ou ausência de oxidantes no sêmen. Pode-se dizer que cada ejaculado é contaminado com potenciais fontes de ROS como: leucócitos; espermatozoides imóveis ou com alterações morfológicas e espermatozoides morfológicamente normais, mas funcionalmente anormais. O balanço entre produção e eliminação de ROS é que determinará os efeitos das espécies reativas do metabolismo do oxigênio no espermatozoide.

Em condições naturais de acasalamento os sistemas de defesa antioxidantes do espermatozoide e do plasma seminal são competentes em controlar os efeitos danosos das ROS na fertilidade do sêmen. Quando o sêmen é manipulado para uso na inseminação artificial, ele é exposto ao oxigênio, e vários passos do seu processamento podem levar à produção de ROS, bem como à redução das defesas antioxidantes. A lavagem e a diluição, por exemplo, podem retirar ou reduzir a proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal. Todos esses fatores podem contribuir para aumentar os danos oxidativos ao espermatozoide no sêmen manipulado.



### Referências bibliográficas

- Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A.** Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, p.239-249, 2005.
- Aitken RJ.** Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.659-668, 1995.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS.** Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic Biol Med*, v.21, p.495-504, 1996.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D.** Use of a xanthine oxidase free radical generation system to investigate the cytotoxic effect of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.97, p.441-450, 1993.
- Aitken RJ, Ryan AL, Curry BJ, Baker MA.** Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, v.9, p.645-661, 2003
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC.** Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med*, v. 26, p.869-880, 1999.
- Atessahin A, Bucak, MN, Tuncer PB, Kizil M.** Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*, v.77, p.38-44, 2008.
- Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C.** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.185-192, 1997.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001a.
- Ball BA, Vo AT, Baumber J.** Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*, v.62, p.508-515, 2001b.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, v.21, p.895-902, 2000.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA.** Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.60, p.1239-1247, 2003.
- Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA.** Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.57, p.1025-1033, 2002.
- Beorlegui N, Cetica P, Trincherro G, Córdoba M, Beconi M.** Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia*, v.29, p.37-42, 1997.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard, M-A.** 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*, v.57, p.1105-1122, 2002.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-288, 2001.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C.** Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.
- Bucak MN, Atessahin A, Yüce A.** Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*, v.75, p.128-134, 2008.
- Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutas PA, Akaçadag HI.** Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.81, p.90-95, 2009.
- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R.** Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, v.58, p.99-111, 2000.
- De Lamirande E, Gagnon C.** Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, v.14, p.255-265, 1993.
- De Lamirande E, Gagnon C.** The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon C. *The male gamete: from basic science to clinical application*. Vienna, IL: Cache River Press, 1999. p.455- 467.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C.** Reactive Oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, v.2, p.48-54, 1997.
- De Lamirande E, Lamonthe G.** Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*, v.46, p.502-510, 2009
- Duru NK, Morshedi M, Oehninger S.** Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.74, p.1200-1207, 2000.
- Engel S, Schreiner T, Petzoldt R.** Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia*, v.31, p.17-22, 1999.
- Ferreira ALA, Matsubara LS.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse

- oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*, v.43, p.1-16, 1997.
- Footo RH, Brockett CC, Kaproth MT.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.71, p.13-23, 2002.
- Gavella M, Lipovac V.** NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isoenzyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl*, v.28, p.35-41, 1992.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D.** Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.103, p.17-26, 1995.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.
- Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK.** Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*, v.20, p.251-256, 1996.
- Jones R, Mann T, Sherins R.** Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*, v.31, p.531-537, 1979.
- Józwik M, Józwik M, Kuczynski W, Szamatowicz M.** Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. *Fertil Steril*, v.68, p.154-157, 1997.
- Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD.** Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, v.65, p.1407-1421, 2006.
- Kao S-H, Chao H-S, Chen H-W, Hwang TIS, Liao T-L, Wei Y-H.** Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*, v.89, p.1183-1190, 2008.
- Krzyzosiak J, Evenson D, Pitt C, Jost L, Molan P, Vishwanath R.** Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reprod Fertil Dev*, v.12, p.251-261, 2000.
- Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F.** Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.331-335, 2001.
- MacLeod J.** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol*, v.138, p.512-518, 1943.
- Maia MS.** *Viabilidade espermiática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase*. 2006. 147f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.
- Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L.** Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res*, v.85, p.85-90, 2009.
- Martí JI, Martí E, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T.** Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology*, v.60, p.1025-1037, 2003.
- Martí E, Martí JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA.** Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl*, v.29, p.459-467, 2008.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.1013-1020, 1996.
- Misro MM, Choudhury L, Upreti K, Gautam D, Chaki SP, Mahajan AS, Babbar R.** Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. *Int J Androl*, v.27, p.82-87, 2004.
- Neild DM, Gadella BM, Colenbrander B, Agüero A, Brouwers JFHM.** Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.58, p.295-298, 2002.
- Nordberg J Arnér ESJ.** Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.
- O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT.** Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl*, v.26, p.109-114, 2003.
- Overveld FWPC, Haenen GRMM, Rhemrev J, Vermeiden JPW, Bast A.** Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact*, v.127, p.151-161, 2000.
- Plante M, De Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*, v.62, p.387-393, 1994.
- Sabeur K, Ball BA.** Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*, v.67, p.701-706, 2006.
- Sánchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WMC.** Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.9, p.689-696, 1997.
- Sanocka D, Kurpisz M.** Reactive oxygen species and sperm cell. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:12, 2004. Disponível em: <http://www.rbj.com/content/2/1/12>. Acessado em: 21 ago. 2005.



- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A.** The influence of cystein and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Bull sêmen following cryopreservation. *Cryobiology*, v.58, p.134-138, 2009.
- Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor GY, Rátky J.** Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung*, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar P, Sharma RK, Dhawan A, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Dada R.** DNA integrity and semen quality in men with seminal antioxidant levels. *Mutat Res*, v.665, p.29-36, 2009.
- Sharma R, Agarwal A.** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v.48, p.835-850,1996.
- Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL.** The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim Reprod Sci*, v.41, p.237-243, 1996.
- Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M.** Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, v.67, p.1249-1255, 2007.
- Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF.** Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci*, v.51, p.275-287, 1998.
- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF.** Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.269-278, 1997.
- Villegas J, Kehr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sánchez R.** Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*, v.35, p.227-232, 2003.
- Zini A, Garrels K, Phang D.** Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v.55, p.922-926, 2000.