

1 **USO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DILUIDORES PARA SÊMEN OVINO:**

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

3 *(USE OF ANTIOXIDANTS IN SEMEN EXTENDERS FOR SHEEP: LITERATURE REVIEW)*

4 **RESUMO:**

5 O desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de espécies reativas de
6 oxigênio (ROS) ocasionam o estresse oxidativo, caracterizado por danos celulares
7 prejudiciais na qualidade espermática. O espermatozoide de ovinos possui grande
8 susceptibilidade ao estresse oxidativo e conseqüentemente à peroxidação lipídica, devido a
9 maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e a
10 presença de um citoplasma reduzido que mantêm baixas as concentrações de enzimas
11 antioxidantes. Dessa forma, torna-se importante adicionar substâncias antioxidantes aos
12 meios diluidores do sêmen. Dentre os antioxidantes enzimáticos endógenos presentes no
13 plasma seminal destacam-se a catalase (Cat), a glutathiona peroxidase (GSH) e o superóxido
14 dismutase (SOD). Já os não enzimáticos são: vitamina E (Tocoferol), vitamina C e
15 resveratrol. A adição dos antioxidantes é vantajosa na criopreservação do sêmen ovino,
16 entretanto em excesso são prejudiciais, pois participam de importantes fases da aquisição do
17 potencial fertilizante espermático, como a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e sua
18 interação com o oócito.

19 **PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes. Criopreservação. Espermatozoides. Ovinos. ROS.

20 **SUMMARY:**

21 An imbalance between the antioxidant defense system and the production of reactive oxygen
22 species (ROS) cause oxidative stress, characterized by cellular damage with detrimental
23 effects on sperm quality. The sheep spermatozoa has high susceptibility to oxidative stress

26 and consequently to lipid peroxidation due to higher amount of polyunsaturated fatty acids
27 present in their plasma membrane and the presence of a reduced cytoplasm that maintain low
28 concentrations of antioxidant enzymes. Therefore, it is important to add antioxidants in semen
29 extenders. Some of the endogenous antioxidants present in seminal plasma are catalase
30 (CAT), glutathione peroxidase (GSH) and superoxide dismutase (SOD). The non-enzymatic
31 are: Vitamin E (Tocopherol), Vitamin C and resveratrol. The addition of antioxidants is
32 beneficial in ram semen cryopreservation, however in excess are detrimental as they
33 participate in important stages of the acquisition of sperm fertilizing potential, as training,
34 hyperactivation, acrosome reaction and their interaction with the oocyte.

35 **KEY-WORDS:** Antioxidants. Cryopreservation. Spermatozoa. Sheep. ROS.

36

37

INTRODUÇÃO

38 Os espermatozoides, assim como as células aeróbias, produzem espécies reativas de
39 oxigênio (ROS), que em quantidades fisiológicas atuam como moléculas sinalizadoras de
40 importantes fases da aquisição de seu potencial fertilizante, como a capacitação,
41 hiperativação, reação acrossomal e sua interação com o oócito (DE LAMIRANDE et al.,
42 1997; DESAI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010). Porém, em concentrações elevadas
43 ocasionam danos a diversos tipos de biomoléculas, incluindo proteínas e lipídeos de
44 membranas (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992a; 1992b; MAMMOTO et al., 1996). O
45 DNA espermático também sofre injúrias (AITKEN et al., 2010; THOMSON et al., 2009),
46 com prejuízos no metabolismo celular, motilidade e vitalidade espermática (AITKEN et al.,
47 2007).

48 O sêmen possui substâncias protetoras, chamadas de antioxidantes, que atuam contra o
49 efeito destrutivo das ROS (FOOTE et al., 2002). Um desequilíbrio entre o sistema de defesa
50 antioxidante e a produção das ROS leva ao chamado estresse oxidativo (DESAI et al., 2010).

51 A capacidade do estresse oxidativo de romper as membranas espermáticas foi primeiro
52 relatada em 1943 por MacLeod, quando se reconheceu o impacto negativo de altas
53 concentrações de oxigênio na motilidade espermática (Revisado por AITKEN et al., 1998).
54 Isto se deve ao conteúdo do citoplasma destas células ser reduzido, limitando assim a
55 quantidade disponível de enzimas antioxidantes (VERNET et al., 2004). Além disso, a
56 abundância de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) nas membranas dos espermatozoides
57 ovino, responsável pela fluidez e, fusão de membranas no processo da fecundação (LENZI et
58 al., 2000; AGARWAL et al., 2003), torna esses gametas mais vulneráveis. A natureza
59 insaturada desses ácidos graxos poliinsaturados predispõe o espermatozoide à ação de radicais
60 livres e à peroxidação lipídica na membrana plasmática (ZINI et al., 2009). Além disso, o
61 próprio processo de criopreservação do sêmen também potencializa o estresse oxidativo
62 (CURRY, 2000) e contribui na antecipação da capacitação e reação acrossomal (BRENER et
63 al., 2003), sendo observado como importante problema da conservação de sêmen ovino.

64 No âmbito da reprodução animal, a capacidade da criopreservação espermática tem
65 grande importância, pois o espermatozoide de diferentes espécies variam em tamanho, forma,
66 composição lipídica e afetam sua sobrevivência em cada processo. Devido a isso, cada
67 protocolo de criopreservação é otimizado para uma determinada espécie (PURDY, 2006).

68 Atualmente, têm-se sugerido métodos alternativos para melhorar a qualidade
69 espermática após a criopreservação do sêmen de ovinos. Neste contexto, a utilização de
70 antioxidantes em meios diluidores é importante no controle do estresse oxidativo do sêmen.
71 Esta revisão objetiva descrever o uso de antioxidantes em sêmen de ovinos e sua
72 aplicabilidade para conservação seminal.

73

74

ANTIOXIDANTES

75 Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ROS em água,
76 com a finalidade de prevenir a sua proliferação (AGARWAL et al., 2005), atuando assim na
77 proteção dos sistemas biológicos contra possíveis lesões causadas pelo estresse oxidativo
78 (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). Na biotecnologia da reprodução, a utilização de
79 antioxidantes adicionados ao meio diluidor do sêmen tem o intuito de minimizar os danos
80 provocados durante a criopreservação (WHITE, 1993), contando com um sistema
81 antioxidante constituído por dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos.

82 Dentre os antioxidantes endógenos enzimáticos presentes no plasma seminal,
83 destacam-se a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH) e o superóxido dismutase
84 (SOD) (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1996). Já entre os antioxidantes
85 não enzimáticos estão: vitamina E (Tocoferol), vitamina C e resveratrol.

86 A CAT é uma hemiproteína citoplasmática encontrada em grande parte dos
87 organismos. Está inserida na subclasse das enzimas oxidorreductases, as quais utilizam o
88 peróxido como receptor e doador de elétrons (BARREIROS et al., 2006). Historicamente, os
89 primórdios relatos da utilização da CAT ao meio diluidor durante a refrigeração do sêmen
90 ovino foram realizados por Maxweel e Stojanov (1996), os quais observaram que
91 concentrações acima de 200U/mL apresentavam toxicidade aos espermatozoides ovinos.

92 A utilização da enzima removedora catalase mostrou-se em baixa atividade,
93 juntamente com a glutathione peroxidase, quando utilizadas em sêmen congelado de ovinos em
94 meio diluidor Tris (BUCAK et al., 2008). Em estudos similares, um aumento de células
95 espermáticas, pós descongeladas, com membranas viáveis foram detectadas na presença da
96 CAT utilizada em meio diluidor de sêmen ovinos (MAIA & BICUDO, 2009).

97 A SOD também tem sido estudada em diferentes espécies de mamíferos com a função
98 de prevenir a peroxidação lipídica nos espermatozoides (STOREY, 1997). Segundo Halliwell
99 e Gutteridge (1999), a enzima mais abundante do organismo é a SOD, que apresenta a função

100 de catalisar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e H₂O₂. Em mamíferos a SOD
101 está presente no citoplasma (cobre-zinco dependente – CuZnSOD) e na matriz mitocondrial
102 (manganês dependente – MnSOD) (GUERRA et al., 2012).

103 O uso dos antioxidantes catalase, superóxido dismutase, citocromo c e glutaciona
104 peroxidase adicionados ao diluidor de sêmen ovino, mostraram-se eficientes na sobrevivência
105 e integridade do acrossoma dos espermatozoides desta espécie (MAXWELL & STOJANOV,
106 1996). Silva et al. (2011) verificaram que a adição de SOD nas concentrações de 60 e
107 120U/mL foi eficaz na supressão da formação de H₂O₂ e na concentração de 100U/mL
108 também preservou o acrossoma de espermatozoides congelados de ovinos.

109 A glutaciona tem função direta e indireta em processos biológicos importantes, como a
110 síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular, sendo necessária para prevenir a
111 peroxidação de ácidos graxos insaturados na membrana celular e manter os átomos de ferro
112 da hemoglobina na forma ferrosa (ROVER JUNIOR et al., 2001; WU et al., 2004; GUERRA
113 et al., 2012). Esse antioxidante promove a redução de hidroperóxidos a partir de complexos
114 lipídicos como o colesterol (LEHMANN et al., 1998).

115 A utilização de antioxidantes do tipo glutacionaredutase e glutacionaperoxidase em
116 sêmen fresco de carneiro, possui baixa atividade, enquanto que a atividade do antioxidante
117 superóxido dismutase é elevada (KASIMANICKAM et al., 2006).

118 Classificada como um antioxidante não enzimático, a Vitamina E (VIT E) ou tocoferol
119 é um composto lipossolúvel natural da membrana celular. Tem como função proteger os
120 espermatozoides contra danos oxidativos do DNA e da membrana, por prevenir a peroxidação
121 lipídica e suprimir, por conseguinte, a produção de malonaldeído (SIKKA, 1996;
122 MANEESH et al., 2006). Segundo Kheradmand et al. (2006), este antioxidante ainda protege
123 a motilidade e integridade da membrana de espermatozoides refrigerados a 5°C, após 48
124 horas.

125 O ácido ascórbico ou vitamina C (VIT C) é um antioxidante não enzimático presente
126 no plasma seminal e encontrado no organismo na forma de ascorbato. Esse antioxidante é
127 importante na neutralização de ROS por meio de reações de redução, inibindo a peroxidação
128 lipídica (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007; GUERRA et al., 2012).
129 Sönmez e Demirci (2004), utilizaram sêmen criopreservado ovino com 0,5, 1 e 2mg/mL de
130 ácido ascórbico, e não observaram nenhuma melhora nas características seminais. Em
131 contrapartida, nas concentrações de 5 e 10mg/mL, houve redução da motilidade espermática.

132 A quercetina é um polifenol flavonóide com efeito inibidor da peroxidação lipídica
133 mais potente que as vitaminas E e C (STOJANOVIC et al., 2001) em virtude da sua riqueza
134 de grupos hidroxila em sua estrutura (BARREIROS et al., 2006). Tem ainda capacidade de
135 inibir danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ no DNA (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

136 O resveratrol é um polifenol não flavonóide encontrado nas formas cis e trans
137 (STOJANOVIC et al., 2001; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). O cis-resveratrol é
138 muito instável à ação da luz, enquanto que o trans-resveratrol é mais estável, permanecendo
139 assim por longo período quando protegido da luz e em pH entre 1 e 7 (TRELA &
140 WATERHOUSE, 1996, GUERRA et al., 2012). Segundo Sarlós et al. (2002) este
141 antioxidante tem ação importante na conservação do sêmen ovino, devido a alta capacidade
142 de inibir a lipoperoxidação em relação aos demais antioxidantes. Em contrapartida, não foi
143 encontrado efeito sobre a motilidade espermática após a descongelação. Segundo Silva et al.
144 (2011) o resveratrol não melhora a motilidade progressiva, o vigor, o acrossoma e as
145 membranas íntegras de espermatozoides ovinos criopreservados, além de ter efeito negativo
146 no alto potencial de membrana mitocondrial.

147 Estudos realizados com antioxidantes adicionados a sêmen fresco de ovinos como
148 acetato de α -tocoferol, glutathione peroxidase, aromex, resveratrol e associação de resveratrol e
149 vitamina E ou resveratrol e aromex, mostraram que esses antioxidantes prolongam o período

150 de conservação do sêmen, reduz o grau dos danos celulares e aprimora a motilidade
151 (SARLÓS et al., 2002).

152

153

CONCLUSÕES

154 Os antioxidantes enzimáticos (catalase, glutathionaperoxidase e superóxido dismutase)
155 e não enzimáticos (vit E, vit C e resveratrol) tem como função diminuir a ação dos radicais
156 livres na membrana celular, podendo dessa forma auxiliar na criopreservação do sêmen.
157 Porém em excesso é prejudicial, pois as ROS participam de etapas fisiológicas importantes,
158 como a capacitação espermática. É necessário mais estudos na escolha do protetor ideal
159 contra radicais livres e sua concentração durante a criopreservação.

160

161

REFERÊNCIAS

162 AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the
163 pathophysiology of human reproduction. **Fertility Sterility**, v.79, p.829–843, 2003.

164 AGARWAL A., PRABAKARAN S. A., SAID T. M., Prevention of Oxidative Stress Injury
165 to Sperm. **Journal of Andrology**, v.26, n.6, p.654-660, 2005.

166 AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.
167 Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of
168 human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1046, 1998.

169 AITKEN, G. R.; HENDERSON, J. R.; CHANG, S. C.; MCNEIL, C. J.; BIRCH-MACHIN,
170 M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes.
171 **Clinical and Experimental Dermatology**, v.32, n.6, p.722-727, 2007.

172 AITKEN, J. R.; DE IULIIS, N. G.; FINNIE, M. J.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, I. R.
173 Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a

174 patient population development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v.25, p.2415-
175 2426, 2010.

176 BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de
177 espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, 2006.

178 BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os princípios antioxidantes da
179 dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p.123-130, 1999.

180 BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART,
181 H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome
182 reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, p.837-845, 2003.

183 BUCAK MN, ATESSAHIN A, YÜCE A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress
184 parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75,
185 p.128-134, 2008.

186 CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of**
187 **Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

188 DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos
189 fenólicos. **Visão acadêmica**, v.5, n.1, 2004.

190 DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I.
191 Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**,
192 v.13, p.368-378, 1992a.

193 DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II.
194 Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm
195 motility. **Journal of Andrology**, v.13, p.379-386, 1992b.

196 DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen
197 species and sperm physiology. **Society for Reproduction and Fertility**, v.2, p.48-54, 1997.

198 DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K.; SABANEGH, E. Physiologic and pathologic
199 levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertility and Sterility**, v.92,
200 p.1626-1631, 2009.

201 DESAI, R. N.; MAHFOUZ, R.; SHARMA, P.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Reactive
202 oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a
203 normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. **Fertility and Sterility**, v.94, n.4,
204 p.1541-1543, 2010.

205 FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in
206 whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23,
207 2002.

208 GONÇALVES, S. F.; BARRETTO, S. S. L.; ARRUDA, P. R.; MINGOTI, Z. G. Effect of
209 antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo
210 development. **Reproduction in Domestic Animal**, v.45, p.129-135, 2010.

211 GUERRA, M. M. P.; CÂMARA, D. R.; SILVA, E. C. B. da; SILVA, S. V. USO DE
212 Antioxidantes no sêmen ovino (Use of antioxidants on ram semen). **Ciência Animal**, v.22,
213 n.1, p. 354-364, 2012.

214 HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Pathology and**
215 **Biology**, v.44, n.1, p.6-13, 1996.

216 HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and
217 significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715S-725S, 1993.

218 HALLIWELL, B.; GUTTERIGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed.,
219 Oxford University Press: New York, 936p., 1999.

220 KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.;
221 THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation

222 index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs.
223 **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.

224 KHERADMAND, B.; ARASH, H.; ROOZ, A. B. Effect of improved diet on semen quality
225 and scrotal circumference in the ram. **Veterinarski arhiv**, v.76, n.4, p. 333-341, 2006.

226 LEHMANN, C.; WEBER, M.; KRAUSCH, D.; WAUER, H.; NEWIE, T.; ROHR, U.;
227 HENSEL, M.; GLATZEL, E.; PRIEM, F.; GRUNE, T.; KOX, W. J. Parenteral selenium
228 supplementation in critically ill patients--effects on antioxidant metabolism. **Z**
229 **Ernahrungswiss**, v.37, p.106-109, 1998.

230 LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E.
231 Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger
232 mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.

233 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
234 mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193,
235 2009.

236 MAMMOTO, A.; MASUMOTO, N.; TAHARA, M.; IKEBUCHI, Y.; OHMICH, M.;
237 TASAKA, K.; MIYAKE, A. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation
238 of sperm sulfhydryl proteins in mice. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1063-1068, 1996.

239 MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN,
240 T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, p.
241 23-28, 1981.

242 MANEESH, M.; JAYALAKSHMI, H.; SINGH, T. A.; CHAKRABARTI, A. Impaired
243 hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. **Indian Journal**
244 **of Clinical Biochemistry**, v.21, n.1, p.165-168, 2006.

245 MAXWELL, W. M. C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or
246 presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1013-1020,
247 1996.

248 PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63,
249 215–225, 2006.

250 ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema
251 antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associada a métodos eletroanalíticos
252 na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

253 SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative
254 evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Vet Hung**,
255 v.50, n.2, p.235-245, 2002.

256 SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm
257 function. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78-86, 1996.

258 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.;
259 PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm
260 Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced
261 Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.874-981, 2011.

262 SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen
263 diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*,
264 v.28, p.893-899, 2004.

265 STOJANOVIC, M. N.; DE PRADA, P.; LANDRY, D. W. Catalytic molecular beacons.
266 **ChemBiochem**, v.2, n.6, p.411-415, 2001.

267 STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in
268 human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.3, p.203-213, 1997.

269 THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J.
270 A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly
271 mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v.24, p.2061–
272 2070, 2009.

273 TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and
274 stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

275 VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.;
276 BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,
277 antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos
278 analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

279 VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis.
280 **Molecular Cell Endocrinology**, v.216, p.31–39, 2004.

281 WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation:
282 a review. **Reproduction Fertility and Development**, v.5, n.6, p.639–58, 1993.

283 WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism
284 and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v.134, n.3, p.488-492, 2004.

285 ZINI, A.; GABRIEL, M. S.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical
286 perspective. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.427–432, 2009.

287
288
289
290
291
292
293