

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO: PRODUÇÃO E EFEITOS SOBRE A INTEGRIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS ESPERMATOZOIDES

Ellen Cordeiro Bento da SILVA^{1*}, Maria Madalena Pessoa GUERRA²

RESUMO

Os avanços tecnológicos referentes à reprodução animal como a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e *in vivo*, incentiva à busca de conhecimentos e a realização de estudos relativos à fisiologia espermática. Durante os eventos reprodutivos, as células espermáticas liberam substâncias como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) que, apesar de necessárias, podem se mostrar deletérias, quando em excesso, levando ao comprometimento da sobrevivência e função destes gametas. Isto porque, a elevada concentração de oxidantes provenientes das mais variadas fontes, induz à peroxidação dos componentes celulares e, como consequência, a danos espermáticos. Em decorrência do papel determinante exercido pelos oxidantes na sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides, nesta revisão, serão abordados os princípios básicos da geração de ROS e RNS no sêmen e seus efeitos sobre a integridade estrutural e funcional das células espermáticas.

Termos para indexação: Estresse oxidativo, antioxidantes, peroxidação, sêmen.

REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES: PRODUCTION AND EFFECTS ON THE SPERM STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INTEGRITY

ABSTRACT

Technological advances related to animal reproduction such as artificial insemination, *in vitro* and *in vivo* fertilization, leads us to the search of knowledge and execution of studies on sperm physiology. During the reproductive events, the sperm cells release substances such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which although being necessary, may prove harmful when in excess, leading to impairment of survival and function of these gametes. This is because of the high concentration of oxidants, from many different sources, inducing the peroxidation of cell components and, consequently, sperm damage. Due to the role played by oxidants on the sperm survival and function, this review will address the basic principles of the ROS and RNS generation in semen and its effects on the sperm cells' structural and functional integrity.

Index terms: Oxidative stress, antioxidants, peroxidation, sperm.

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência: silva.ecb@gmail.com.

² Professora Dra. Associada. Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

INTRODUÇÃO

Nas diferentes espécies de mamíferos, mais de 60% dos lipídeos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides são ácidos graxos poli-insaturados, o que confere a esta estrutura grande fluidez devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas (VALENÇA e GUERRA, 2007). Em contrapartida, pelo fato dos lipídios constituírem um dos principais substratos das ROS (SIKKA, 1996), e destas espécies reativas apresentarem sua produção intensificada durante procedimentos como à criopreservação, são produzidos danos celulares e prejuízos às funções espermáticas, de acordo com a composição lipídica das membranas (WATSON, 2000; VALENÇA e GUERRA, 2007). Por conseguinte, nesta revisão, serão abordados os princípios básicos da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no sêmen, genericamente denominadas ROS, e seus efeitos sobre a integridade estrutural e funcional das células espermáticas.

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

As espécies reativas, denominadas oxidantes, são representadas por uma variedade de moléculas e radicais livres (TURRENS, 2003), produzidos nos sistemas biológicos a partir do metabolismo do oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), que podem modificar as funções celulares e/ou comprometer a sobrevivência celular (CARVALHO et al., 2002; SALEH e AGARWAL, 2002). Embora sejam produzidas fisiologicamente durante o metabolismo celular normal (SANOCKA e KURPISZ, 2004) e exerçam papel fisiológico sobre as células, as ROS desencadeiam efeitos patológicos quando produzidas em excesso (MARCHESI e FENG, 2007).

Os oxidantes apresentam diferenças quanto às suas propriedades físicas e

químicas, e sua ação tóxica sofre interferência dos metais de transição (BLAKE et al., 1987), a exemplo do ferro e cobre, que catalisam as reações em cadeia de peroxidação (AITKEN et al., 2007). As ROS que geram maiores implicações na biologia reprodutiva e na fertilização são representadas pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), altamente reativo, e o radical peroxila (ROO^{\cdot}) (SIKKA, 1996; MANESH e JAYALEKSHMI, 2006). Além destes, existem ainda os oxidantes derivados do nitrogênio, que podem ser denominados de RNS (TURRENS, 2003), com destaque para o óxido nítrico (ON^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).

Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ânion superóxido é originado a partir da primeira redução do oxigênio molecular (O_2) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), ou seja, de sua redução univalente (BLAKE et al., 1987), evento que pode ser de origem enzimática ou não enzimática, estando a fonte enzimática do $O_2^{\cdot-}$ relacionada às NADPH oxidases localizadas na membrana celular. Por outro lado, a fonte não enzimática deste oxidante é dependente da existência de elétrons desemparelhados/livres (singlete) para ocorrer, sendo estes elétrons transferidos diretamente para o oxigênio durante tal processo (TURRENS, 2003).

A produção espermática do $O_2^{\cdot-}$, assim como a do ON^{\cdot} , é significativamente mais elevada em populações de espermatozoides defeituosos (BAKER e AITKEN, 2005). Apesar de ser um radical livre e de possuir capacidade redutora de íons ferro e cobre (BLAKE et al., 1987), o $O_2^{\cdot-}$ não apresenta alta reatividade, o que se deve à sua impenetrabilidade em membranas celulares (ALVAREZ e MORAES, 2006). Deste modo, as características de baixa solubilidade e curta meia vida do $O_2^{\cdot-}$ são responsáveis por sua limitada difusão longe do seu sítio de formação (BLAKE et al., 1987).

Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio é uma ROS formada a partir da redução divalente do O_2 ou da redução univalente do $O_2^{\cdot-}$, apresentando longa meia vida e elevada permeabilidade nas membranas. Tais características possibilitam sua difusão à distância, não apresentando ação restrita ao sítio de formação (BLAKE et al., 1987). Como consequência de sua maior permeabilidade nas membranas biológicas, o H_2O_2 parece mais apto em

afetar sistemas enzimáticos intracelulares (BAUMBER et al., 2000), representando o agente oxidante que mais causa danos aos espermatozoides avaliados *in vitro* (ALVA-REZ e MORAES, 2006). Além disso, sua toxicidade é potencializada na presença de metais de transição, particularmente do ferro, os quais atuam como catalisadores das reações oxidativas, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 1) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Reação de Fenton	Reação de Haber-Weiss
$Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$	$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2$
$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$
$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$

FIGURA 1 – Esquematização das reações de Fenton e de Haber-Weiss.

Fonte: Adaptado do texto de FERREIRA e MATSUBARA (1997).

Radical Hidroxila (OH^{\cdot})

O radical hidroxila é uma ROS formada a partir da redução do H_2O_2 na presença de metais de transição, especialmente ferro e cobre (BLAKE et al., 1987; AGARWAL e SALEH, 2002; TURRENS, 2003), embora também possa ser originado a partir $O_2^{\cdot-}$ (BURCHAM, 1998) e da reação entre $O_2^{\cdot-}$ e ON^{\cdot} (ALVAREZ e MORAES, 2006). Apesar de sua curta meia vida e da limitada capacidade de difusão, o OH^{\cdot} representa um oxidante extremamente reativo que altera as moléculas localizadas nas proximidades de seu sítio de formação (BLAKE et al., 1987). Por conseguinte, o OH^{\cdot} é considerado a ROS mais deletéria ao organismo (BARREIROS et al., 2006) e serve como potente indicador da cascata de peroxidação lipídica e da perda de funções espermáticas (AGARWAL e SALEH, 2002).

O OH^{\cdot} é responsável por ocasionar danos aos ácidos nucléicos, carboidratos, proteínas e lipídeos, através de um fenômeno chamado de estresse oxidativo, que conduz a modificações estruturais e funcionais e pode culminar com a morte celular

(HERMES-LIMA, 2004). Este oxidante atinge tanto a desoxirribose quanto as bases nitrogenadas, resultando na ruptura da cadeia do DNA e na fragmentação oxidativa das bases nitrogenadas (MORENO et al., 2006).

Por outro lado, os ataques aos aminoácidos constituintes das proteínas podem determinar danos como clivagem de ligações ou ligações cruzadas, as quais podem ter como consequências, a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular, sendo os ácidos graxos poli-insaturados, mais susceptíveis aos ataques das ROS em virtude da presença do carbono metilênico bis-aliílico (BARREIROS et al., 2006). Com relação aos lipídeos, o OH^{\cdot} está envolvido com a iniciação da peroxidação lipídica das membranas biológicas (HERMES-LIMA, 2004).

Radical Peroxila (ROO^{\cdot})

O radical peroxila é um oxidante formado durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar

com o oxigênio, como observado na peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007). Representa a forma protonada do ânion superóxido e, possivelmente, é mais reativo do que este, em decorrência de sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), sendo responsável por promover a etapa de propagação da peroxidação (LIMA e ABDALLA, 2001).

Óxido Nítrico (ON[•])

O óxido nítrico é uma RNS de curta meia vida, devido a sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000), sendo sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Este agente é encontrado em abundância nos sistemas biológicos (VASCONCELOS et al., 2007), a exemplo do plasma seminal, onde atua como mediador funcional (OLIVA et al., 2009). Em contrapartida, o ON[•] apresenta ação citotóxica e citostática quando produzido excessivamente, podendo determinar redução da motilidade, da viabilidade espermática e, conseqüentemente, da fertilidade (CARVALHO et al., 2002; OLIVA et al., 2009). Assim, é importante salientar que o efeito deletério do ON[•] depende da concentração em que está presente e da interação com o peróxido de hidrogênio (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

Peroxinitrito (ONOO⁻)

O peroxinitrito é um potente oxidante originado a partir da reação entre ON[•] e O₂^{-•}, demonstrando instabilidade, possuindo curto tempo de vida e apresentando propriedades semelhantes as do radical OH[•]. O ONOO⁻ é responsável por ocasionar danos a inúmeras moléculas biológicas, dentre as quais estão os grupos sulfidrilas (S-H) das proteínas, e de estimular a formação de OH[•], independente da presença de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007).

EFEITOS DOS OXIDANTES SOBRE OS ESPERMATOZOIDES

Embora ainda não se saiba o limite entre os níveis fisiológicos e patológicos das ROS (NOVOTNÝ et al., 2003), baixas e controladas concentrações destes agentes desempenham importante papel na fisiologia espermática, sendo responsáveis por tornar os espermatozoides aptos à fertilização, através do desencadeamento de processos oxidativos tais como a hiperativação, capacitação e reação acrossomal (De LAMIRANDE et al., 1997; SANOCKA e KURPISZ, 2004). Neste contexto, o O₂^{-•} e o H₂O₂ exercem papel determinante sobre a modulação da atividade de genes e de proteínas essenciais para a função dos espermatozoides (MARCHESI e FENG, 2007), além de promoverem a fosforilação da tirosina para que haja a capacitação espermática (BAKER e AITKEN, 2005; MARCHESI e FENG, 2007).

Por outro lado, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, desencadeia o estresse oxidativo (SIKKA, 2004), que consiste em uma reação em cadeia (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006) marcada pela disfunção espermática (ZINI e LIBMAN, 2006; MARCHESI e FENG, 2007), proveniente dos danos gerados ao DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (SIES, 1993; SANOCKA e KURPISZ, 2004). Tais elementos celulares representam os substratos moleculares mais frequentes das ROS (ORTEGA et al., 2003) e danos em suas estruturas resultam em ausência de competência dos espermatozoides para a fertilização (CARVALHO et al., 2002; BAKER e AITKEN, 2005) e interrupção da integridade genética (BAKER e AITKEN, 2005), uma vez que esses tipos celulares não possuem habilidade em reparar danos sofridos (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

As fontes de ROS no sêmen são os espermatozoides, particularmente os imaturos

(GIL-GUZMAN et al., 2001) e morfológica-mente anormais, os leucócitos (AITKEN et al., 1995; SIKKA, 1996; AITKEN, 1997; SANOCKA e KURPISZ, 2004; ZINI e LIBMAN, 2006; MARCHESI e FENG, 2007) e os precursores de células germinativas (AGARWAL e SALEH, 2002). Entretanto, a formação dos oxidantes tem sido considerada uma propriedade inerente aos espermatozoides (AITKEN e CLARKSON, 1987), os quais possuem sistemas produtores de ROS na membrana plasmática pelo sistema NADPH-oxidase, e nas mitocôndrias pelo NADH-oxidoreductase dependente (AGARWAL e SALEH, 2002; GUERRA et al., 2004), representando a maior fonte intracelular de oxidante (BLAKE et al., 1987).

O balanço entre antioxidantes e oxidantes também pode ser interrompido, em favor dos oxidantes (TURRENS, 2003), como consequência de baixas concentrações de antioxidantes no soro, plasma seminal e/ou meio diluidor (SIKKA, 2004) e do processamento do sêmen (centrifugação, criopreservação, descongelação), com destaque para as temperaturas de refrigeração que conduzem a uma maior produção de ROS (SALEH e AGARWAL, 2002). Como consequência do desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante durante o processo de criopreservação, ocorre o estresse oxidativo (TURRENS, 2003) e a subsequente deterioração da qualidade e da função espermática (NOVOTNÝ et al., 2003).

Elevadas concentrações de ROS, provenientes de diferentes fontes, são responsáveis por induzir a peroxidação lipídica (STOJANOVIĆ et al., 2001; SANOCKA e KURPISZ, 2004) e, a partir desta, a geração de danos às membranas plasmática e acrossomal, e à mitocôndria, com severas mudanças sobre o metabolismo celular (JONES e MANN, 1977a) e significativa redução da motilidade e da vitalidade espermática (AITKEN et al., 2007). Em contrapartida, a extensão das injúrias indu-

zidas pelo estresse oxidativo depende não apenas da natureza e da quantidade das ROS envolvidas, mas também do momento e da duração da exposição aos oxidantes e de fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e composição do ambiente que envolve as células.

Todos os componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares, são alvos potenciais para a ocorrência do estresse oxidativo (SALEH e AGARWAL, 2002). Como consequência, observa-se que as elevadas concentrações de ROS e a baixa capacidade antioxidante total do sêmen estão diretamente relacionadas com a manifestação da infertilidade masculina (SHARMA et al., 1999), demonstrando a existência de uma correlação negativa entre o escore da qualidade do sêmen e as concentrações de ROS (NALLELLA et al., 2005).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação consiste em uma reação em cadeia (STOJANOVIĆ et al., 2001) do tipo não enzimática de membrana ou enzimática dependente de NADPH e ADP (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; SIKKA, 2004), que resulta na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (ORTEGA et al., 2003). Esse tipo de reação pode ser catalisada por metais de transição, especialmente ferro e cobre (AITKEN et al., 2007), e comumente está dividida nas etapas de iniciação, propagação e terminação, com destaque na reprodução por determinar efeitos destrutivos mais severos sobre as membranas e o DNA (nuclear e mitocondrial) dos espermatozoides (SIKKA, 1996; COMHAIRE et al., 1999), resultando na perda de sua função (BURCHAM, 1998).

As membranas dos espermatozoides de mamíferos constituem o compartimento celular mais vulnerável à ação das ROS e à peroxidação lipídica (AITKEN, 1997; SIKKA, 2004), em decorrência de sua riqueza em ácidos graxos poli-insaturados. Assim, embora os lipídeos de membrana

sejam essenciais para a manutenção de sua fluidez (SANOCKA e KURPISZ, 2004; SIKKA, 2004), representam o principal substrato da peroxidação (SANOCKA e KURPISZ, 2004), acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade dessas membranas. Tais alterações resultam em perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), determinando redução ou perda da motilidade (JONES e MANN, 1977b), viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006).

As lesões de membrana, ocasionadas a partir da peroxidação dos ácidos graxos, localizam-se especialmente na região do acrossoma, por representar um dos compartimentos celulares mais sensíveis aos danos peroxidativos endógenos e exógenos. É comprovado, que o acrossoma de espermatozoides ovinos é mais sensível à peroxidação lipídica, em virtude das elevadas concentrações do ácido docosahexaenoico em sua estrutura, que corresponde ao substrato da lipoperoxidação (JONES e MANN, 1977a).

Apesar da produção de ATP pelas mitocôndrias ser fundamental para a motilidade espermática (DONNELLY et al., 2000), é sabido que o sistema mitocondrial de geração de ROS é a maior fonte intracelular de oxidantes (TURRENS, 2003), particularmente em espermatozoides de reprodutores inférteis (SALEH e AGARWAL, 2002). Portanto, as ROS oriundas da cadeia respiratória da célula podem ocasionar danos oxidativos, com comprometimento do potencial de membrana mitocondrial (SANOCKA e KURPISZ, 2004) e integridade do DNAm, o que tem sido relacionado com o declínio da fertilidade e da motilidade espermática, podendo exercer importante papel na fisiopatologia dos espermatozoides de reprodutores inférteis ou subférteis (KAO et al., 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reprodução animal abriga um crescente interesse para as várias espécies, seja para a resolução de problemas de concepção, como em humanos, seja para o aumento da produtividade de animais produtores de alimentos, ou ainda como ferramenta no impedimento da extinção de espécies ameaçadas. Em contrapartida, o sucesso da fertilização depende da manutenção da integridade estrutural e funcional das células germinativas, de modo que, quando o equilíbrio destes sistemas biológicos é quebrado são observadas fisiopatologias que comprometem o desempenho satisfatório dos organismos. Por conseguinte, para que os eventos reprodutivos ocorram perfeitamente é fundamental compreender os mecanismos fisiológicos dos gametas, assim como a geração e o aproveitamento das ROS e RNS, suas ações e seus efeitos à integridade estrutural e funcional das células espermáticas. A partir deste entendimento, torna-se possível a busca pela manutenção do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e, conseqüentemente, a preservação da fertilidade das diversas espécies animais, evitando, desta forma, o comprometimento da capacidade fertilizante dos gametas masculinos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p.1-12, 2002.

- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J. et al. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 2061-2071, 1995.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; IULIIS, G.N.D. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v.1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 3, p. 67-75, 2005.
- BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.
- BURCHAM, P.C. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. **Mutagenesis**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 287-305, 1998.
- CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n.1, p. 33-38, 2002.
- COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DE-PUYDT, C.E. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 393-398, 1999.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 2, p. 48-54, 1997.
- DONNELLY, E.T.; O'CONNELL, M.; McCLURE, N. et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, J.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey: John Wiley and Sons, Incorporated, 2004. Cap. 12, p. 319-368.
- JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, p. 261-268, 1977a.
- JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fat-

- ty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, p. 255-260, 1977b.
- KAO, S-H.; CHAO, H-T.; WEI, Y-H. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 657-666, 1998.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.
- MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.
- MORENO, R.G.M.; ALIPÁZAGA, M.V.; MEDEIROS, M.H.G. et al. Lesões em DNA induzidas pela autooxidação de S(IV) na presença de íons metabólicos de transição. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1086-2006, 2006.
- NALLELLA, K.P.; SHARMA, R.K.; ALLAMANENI, S.S.R. et al. Identification of male factor infertility using a novel semen quality y score and reactive oxygen species levels. **Clinics**, São Paulo, v. 60, n. 4, p. 317-324, 2005.
- NOVOTNÝ, J.; OBORNÁ, I.; BŘEZINOVÁ, J. et al. The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. **Biomedical Papers**, Olomouc, v. 147, n. 2, p. 173-176, 2003.
- OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermiática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.
- ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, Caracas, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From reseach bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p. 12-18, 2004.
- SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R. et al. The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, New York, v.1, p. 78-86, 1996.
- STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.
- TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, Paris, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.