

EFEITOS DA SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE O SÊMEN.

Cristiane Arieta Alvarez¹ & Gentil Vanini de Moraes²

RESUMO

Os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por causa da alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas citoplasmáticas. Estudos têm revelado que os espermatozoides e leucócitos seminais têm capacidade de gerar altos níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que podem reduzir a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. Entretanto, pequenas quantidades de EROs são necessárias para a iniciação das funções dos espermatozoides, bem como, capacitação e indução da reação acrossômica, assim, um balanço entre a produção de EROs e proteção antioxidante é necessário para assegurar a função espermática. A proteção antioxidante do sêmen é fornecida por enzimas tais como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase (GPx), a catalase, vitamina C, vitamina E e, outras substâncias (albumina, glutatona, taurina, hipotaurina) contidas dentro da célula espermática ou no plasma seminal. Sendo assim, esta revisão tem como objetivo caracterizar como as espécies reativas ao oxigênio causam danos irreparáveis às membranas dos espermatozoides e a importância da proteção antioxidante do sêmen que pode ser promovida pela simples adição de minerais como o selênio e vitaminas como o ácido ascórbico.

Palavras-chave: vitamina C, selênio, espermatozoides.

EFFECTS OF SELENOMETHIONINE AND VITAMIN C ON SEMEN.

ABSTRACT

Spermatozoa are susceptible to peroxidative damages due to the high concentration of polyunsaturated fatty acids in its cytoplasmic membranes. Studies have shown that the spermatozoa and seminal leukocytes are capable to generate high levels of reactive oxygen species (ROSs) that may reduce the viability and fertility of spermatozoa. However, small quantities of ROSs are necessary to initiation of the function of spermatozoa, as well as, capacitation and induction of the acrosomic reaction. Thus an equilibrium between the production of ROSs and antioxidative protection is necessary to assure the spermatoc function. The antioxidative protection of the semen is supplied by enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase (GPx), catalase, vitamin C, vitamin E and other substances (albumine, glutathione, taurine, hypotaurine) found inside of spermatoc cells or in seminal plasma. Thus, the objective of this revision is characterize how reactive oxygen species cause irreparable damages to spermatozoa membranes and the importance of the antioxidative protection of the semen that can be promoted by the addition of simple minerals like selenium and vitamins (e.g. ascorbic acid).

Key words: vitamin C, selenium, spermatozoa.

¹ Professora Mestre, Departamento de Ciências Biológicas, Integrado Colégio e Faculdade, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

² Professor Doutor, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (1). Os danos peroxidativos induzem a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que é uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (2).

Foi descrito que 40% dos homens inférteis têm quantidades detectáveis de EROs no sêmen, e não foi detectável atividade de EROs no sêmen de homens férteis (3). Estudando sêmen de homens, Aitken et al. (4) observaram que a produção elevada de EROs reduz a motilidade espermática.

Inúmeros antioxidantes têm beneficiado o tratamento de machos inférteis, tais como a vitamina C, vitamina E, glutatona e a coenzima Q10 (5). Ao fornecer dietas com níveis apropriados de vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina C e E, ocorreria a redução dos danos nas membranas celulares (6).

Frei et al. (7) demonstraram que o ácido ascórbico agiu como fator de defesa primária no plasma sangüíneo contra os radicais livres. O ácido ascórbico também está presente em altas concentrações no plasma seminal comparado com o plasma sangüíneo (400 vs. 60 μ M), presumivelmente, refletindo o importante papel fisiológico, sendo assim, a relação entre o dano oxidativo do espermatozoide e os níveis altos de ácido ascórbico no plasma seminal são de grande interesse (8).

Dawson et al. (9) indicaram melhora na viabilidade do espermatozoide, diminuição na percentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática após suplementação com vitamina C, em experimento com homens fumantes de 25 anos de idade, quando a ingestão de 1,0 g/dia de ácido ascórbico foi suplementada. Luck et al. (10) descreveram que o ascorbato poderia ser considerado como essencial para o processo reprodutivo humano.

Outro elemento implicado na degradação dos peróxidos de hidrogênio é o selênio (Se) (11). O selênio é um cofator da Glutaciona Peroxidase (GPx), uma das enzimas que catalisa a degradação dos

peróxidos (12). A atividade GPx é encontrada no sêmen de várias espécies, entre elas os coelhos e caprinos (13-14), no qual tem diferentes papéis de proteção na degradação de hidroperóxidos.

O selênio utilizado em dietas de animais é encontrado como selenito de sódio (Na_2SeO_3) ou na forma orgânica como selenometionina (Se-Met) e selenocisteína (Se-Cys) (12). Thompson & Stewart (15) demonstraram que a absorção intestinal de selenito de sódio é de 92% e selenometionina é de 96% e a retenção total no corpo indica que a excreção do selenito absorvido é maior do que a do selenometionina.

RADICAIS LIVRES

Uma das hipóteses que envolvem a diminuição da qualidade do sêmen dos animais é a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que são radicais livres, isto é, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados (16). Entre as espécies reativas ao oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as EROs, primariamente formadas, sendo que o H_2O_2 é gerado através de reações enzimáticas ou não enzimáticas do ânion superóxido (17). Porém, a ERO mais reativa e prejudicial é o radical hidroxila, que pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, produzindo o peroxinitrito, que então, irá se decompor em NO_2 e OH^- (18). O ânion superóxido, gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas celulares, ficando restrito ao compartimento onde é produzido (17). O ânion superóxido parece ser o produto primário do sistema de produção de EROs, gerando o peróxido de hidrogênio após reações enzimáticas (19). De acordo com estes autores, a formação do superóxido acontece espontaneamente, em ambientes aeróbicos, ricos em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória.

O H_2O_2 não é um radical livre, porém é importante, principalmente, devido à sua habilidade de penetrar em membranas

biológicas (18). Esta substância age como intermediário na formação de mais moléculas de EROs, como o radical hidroxila (OH^\cdot) formado pela oxidação de metais de transição. A remoção do H_2O_2 ocorre por pelo menos dois sistemas enzimáticos antioxidantes, a catalase e a glutathione peroxidase (20).

Distúrbios na produção de oxidante / antioxidante, em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo (21). Em princípio, o estresse oxidativo pode ser causado por redução na quantidade de antioxidante nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de EROs (17).

As células espermáticas humanas são altamente susceptíveis aos danos causados pelas EROs, devido à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (22). As EROs também produzem extensivos danos às proteínas, modificam o citoesqueleto e causam alterações de mecanismos celulares (23). A célula espermática humana faz parte de uma lista de células que exibem a capacidade de gerar EROs quando incubadas em condições anaeróbicas (24). A produção espermática de EROs no homem ocorre principalmente por células morfológicamente anormais e dentre estas, especialmente as células que possuem gota proximal e distal (25). Sendo assim, acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerarem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que serviria como fonte de elétrons para a produção de EROs (24).

Estudos realizados por vários pesquisadores indicam que o H_2O_2 é a ERO que causa mais danos aos espermatozoides *in vitro*, devido à sua alta capacidade em penetrar membranas biológicas (26-27). Armstrong et al. (27) sugeriram que H_2O_2 possui funções deletérias, atuando na diminuição da motilidade espermática nos homens.

Espermatozoides imóveis e espermatozoides morfológicamente normais humanos, porém, funcionalmente anormais, são também fontes de EROs (28).

A produção de EROs pelos espermatozoides dos homens é um processo

fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para fusão espermatozoide / ovócito (29). Apesar do efeito fisiologicamente normal das EROs na fisiologia espermática, um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs no sêmen causa efeitos prejudiciais aos espermatozoides (30). A excessiva produção de EROs, também chamada de estresse oxidativo positivo, ocorre tanto pelo excesso de EROs como pela diminuição de antioxidantes (30).

Kessopoulo et al. (31) verificaram que, em sêmen humano, a maior fonte de produção de EROs seriam os leucócitos presentes mesmo em homens férteis. No entanto, Wolff (32) sugeriu que os EROs, gerados por leucócitos, são deletérios às células espermáticas humanas apenas na ausência de sistemas antioxidantes, como são vistos em infecções agudas nos testículos e epidídimo. Espermatozoides normais e não funcionais parecem gerar radicais superóxidos (O_2^\cdot) em maiores taxas que aqueles saudáveis. Geração excessiva de EROs no sêmen pode ser uma consequência de infertilidade (22). Zini et al. (33) observaram que o plasma seminal de homens inférteis não eram deficientes em enzimas superóxido dismutase e/ou catalase, e que o elevado teor de EROs no sêmen de alguns homens inférteis se deve a produção excessiva de EROs e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes. Halliwell & Gutteridge (34) evidenciaram que as células somáticas humanas contêm antioxidantes em seu citoplasma, mas que, os espermatozoides perdem a maioria do seu citoplasma durante o processo de maturação, levando-os a perderem os mecanismos endógenos de reparo e defesa enzimáticas observados em outros tipos celulares. Contudo, estes autores destacaram que os espermatozoides são protegidos dos ataques oxidativos pelo plasma seminal que contém uma quantidade grande de enzimas oxidativas, tais como, a superóxido dismutase e a catalase que remove os EROs.

MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO SÊMEN

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne

significativamente a oxidação deste substrato (34).

O espermatozóide das espécies animais possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as EROs, que consiste, principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase (SDO), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e a redutase, bem como, antioxidante não enzimáticos como: ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol ou vitamina E (21). Extracelularmente, o espermatozóide do homem é protegido pelo plasma seminal que contém vários redutores de EROs enzimáticos e não enzimáticos, contribuindo para uma poderosa atividade antioxidante (33), destacando-se o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, glutathione e outros tióis, taurina, hipotaurina e α -tocoferol. Foi descoberto, recentemente, que a tirosina, também exerce um papel importante como antioxidante no plasma seminal (35).

VITAMINA C OU ÁCIDO ASCÓRBICO

As vitaminas antioxidantes protegem as membranas plasmáticas, reagindo com e removendo os radicais livres, assim destruindo a cadeia de reações (6). Para este autor, mantendo uma dieta que forneça níveis apropriados de vitaminas antioxidantes, especialmente, a vitamina C e E ocorreria a redução dos danos nas membranas celulares.

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante (6). A vitamina C reduz o α -tocoferol, peróxidos e EROs, como superóxidos e age também, prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (19). Porém, quando ingerida em dose elevada ou na presença de metais como ferro ou cobre, a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando a lipoperoxidação (17). *In vitro*, a mistura Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos, levando a formação de radicais livres, os quais danificam o ácido desoxirribonucléico (ADN), lipídios e proteínas (17).

O ácido ascórbico (vit. C) é um dos componentes não enzimáticos que atuam como antioxidante e é essencial nas dietas de humanos e outros mamíferos e foi relacionado com a fertilidade (36). Alguns mamíferos como

o homem, o porco da índia e os morcegos não sintetizam o ácido ascórbico por não sintetizarem a enzima L- gulonalactona oxidase, assim, os níveis de ácido ascórbico, nestes animais, diminuem em períodos que ocorrem restrições alimentares (37). Gonul & Kaplan (38) verificaram que a restrição alimentar induzida causou a perda de peso de porcos da índia, mesmo tendo sido preservado os níveis ideais de vitamina C, via suplementação. Contudo, os autores constataram que ao testarem a peroxidação oxidativa no plasma com o ácido tiobarbitúrico (SRAT), os níveis de peroxidação se elevaram, mesmo tendo havido suplementação com ácido ascórbico, indicando a ausência de ação antioxidante no plasma sanguíneo, nesta condição de restrição alimentar.

Yousef et al. (39) demonstraram, em coelhos machos, que a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) foi significativamente diminuída com a suplementação de ácido ascórbico (vit. C) e α -tocoferol (vit. E). Resultados semelhantes foram encontrados em caprinos por Brzezinska-Slebodzinska et al. (40) e em humanos por Geva et al. (41) ao descreverem que a suplementação de vitamina E e/ou vitamina C reduziram as espécies reativas ao oxigênio (EROs), melhorando assim, a taxa de fertilização por reduzir a peroxidação lipídica. Fraga et al. (8) demonstraram que o ácido ascórbico está presente em altas concentrações no plasma seminal humano comparado com o plasma sanguíneo (400 vs 60 μ M), presumivelmente, refletindo o importante papel fisiológico. Além disso, o ácido ascórbico é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, atuando na prevenção de danos oxidativos ao ADN. Portanto, o dano oxidativo no ADN do espermatozóide resultaria em infertilidade e defeitos congênitos nas proles.

A eficiência do ácido ascórbico como antioxidante também foi demonstrada em estudos onde a suplementação de ácido ascórbico teve efeitos benéficos sobre as características do sêmen e os níveis de testosterona em coelhos (42). Foi sugerido por Thiele et al. (43) que as concentrações de ácido ascórbico no plasma seminal humano estão correlacionadas, positivamente, com as porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais e também foi sugerido que esta vitamina é protetora do epidídimo, agindo como proteção antioxidante das membranas celulares. Chinoy et al. (44)

relataram que o ácido ascórbico é importante para a manutenção fisiológica da integridade dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias e a deficiência de vitamina C nas dietas causariam rápida degeneração do sistema reprodutivo como um todo, como foram demonstrados pelos autores nas espécies de porcos da Índia.

Sonmez et al. (45) investigaram os efeitos da suplementação de ácido ascórbico sobre a qualidade do sêmen, peroxidação lipídica e os níveis de testosterona no plasma sanguíneo de ratos Wistar. Os autores concluíram que a suplementação do ácido ascórbico não aumentou o peso corporal, o peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata, mas a suplementação aumentou, significativamente, a concentração de ácido ascórbico nos testículos e plasma sanguíneo, diminuindo, consideravelmente, os níveis de peroxidação lipídica.

Altas concentrações de ácido ascórbico no sêmen de espécies como os homens e os peixes parecem ter um papel chave na manutenção da integridade genética das células espermáticas, prevenindo danos oxidativos ao ADN dos espermatozoides (8-46).

GLUTATIONA PEROXIDASE E SELÊNIO

Dentre os sistemas enzimáticos, destaca-se a Glutationa Peroxidase (GPx) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus álcoois correspondentes, convertendo Glutationa – forma reduzida (GSH) a Glutationa – forma oxidada (GSSG), que contém duas moléculas ligadas por uma ligação dissulfeto, sendo o selênio essencial para a atividade da enzima (19). Esta enzima contém um átomo de selênio (Se) ligado, covalentemente, na forma de selenocisteína (47). Em mamíferos existe GPx de 1 a 4 (48). Recentemente, estes autores descobriram que a GPx 4 tem dupla função na célula espermática: é enzimaticamente ativa na espermátide e insolúvel, funcionando como uma proteína estrutural no espermatozoide maduro. Destacaram também que a GPx 4 pode reagir com peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios, sendo portanto, considerada responsável pela

proteção da membrana contra os danos oxidativos.

Nos testículos, a GPx 4 encontra-se presente na forma de três isoformas que são derivadas dos mesmos genes e localizadas no citosol, mitocôndria e núcleo, tendo a função de auxiliar no desenvolvimento dos espermatozoides por proteger contra espécies reativas ao oxigênio (49). Estes autores constataram que homens com baixa fertilidade devido à reduzida concentração e pobre qualidade dos espermatozoides, continham pouca GPx nos espermatozoides.

Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a esfera reprodutiva de todas as espécies de machos e fêmeas (50). De acordo com Hafeman et al. (51), a atividade da glutathione peroxidase, nos tecidos de ratos, cai drasticamente em animais com dietas deficientes em selênio e aumenta quando ocorre reposição de selênio.

O selênio é encontrado e utilizado em dietas animais como selenito de sódio ou na forma orgânica como selenometionina e selenocisteína (15). Raras são as pesquisas que mostram a eficiência da forma selenometionina sobre a forma inorgânica, selenito de sódio. Mas, sabe-se que a forma selenometionina, por estar associada a aminoácidos, torna-se mais biodisponível por não apresentar cargas elétricas, favorecendo assim, sua absorção ao nível de trato gastrointestinal (12).

Foi observado por Lane et al. (52) que o aumento nas concentrações de selênio, nem sempre é observado um correspondente aumento na atividade da glutathione peroxidase (GPx), indicando que a GPx não poderia ser usada para monitorar o selênio em ratos, especialmente, se a forma de selênio administrada for como selenometionina.

Thompson & Stewart (15) demonstraram, em ratos, que a absorção intestinal de selenito e selenometionina é equivalente a 92% de selenito e a 96% de selenometionina, mas a retenção total no corpo indicou que a excreção do selenito absorvido foi maior do que a selenometionina.

A Glutationa-S-Transferase (GST) consiste de quatro principais classes: alfa (A), mu (M), pi (P) e theta (T), envolvidas na detoxificação de muitos compostos eletrofílicos

pela conjugação de reações com a Glutathione. Foi demonstrado que a glutathione e a glutathione-S-transferase teriam um importante papel na reprodução, mas as pesquisas sobre a glutathione e glutathione-S-transferase no plasma seminal são limitadas (54). Entretanto, para Raijmakers & Maarten (54), a glutathione-S-transferase está presente em quantidade considerável na maioria dos plasmas seminais de homens férteis, mostrando assim, que a glutathione parece ter um papel na fertilidade porque as concentrações de glutathione no plasma seminal estavam altas nos machos férteis, por melhorar a motilidade espermática e a morfologia dos espermatozoides.

Para Castellini et al. (55), a suplementação de selênio na dieta aumentou a atividade da glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos e sêmen de coelhos, mas a estabilidade oxidativa dos espermatozoides não foi observada.

Behne et al. (57) estudaram quatro gerações de ratos alimentados com deficiência em selênio. As gônadas dos machos das quatro gerações mostraram atrofia bilateral e diminuição nos diâmetros dos túbulos seminíferos, indicando que a morfologia e função testicular são severamente alteradas na deficiência de selênio, principalmente, a biossíntese da testosterona e o desenvolvimento normal dos espermatozoides.

Trabalhando com sêmen de carneiros, Sarlós et al. (58) avaliaram o efeito de vários antioxidantes, entre eles, a glutathione peroxidase, e observaram que a adição de antioxidante prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozóide e reduz o grau de danos celulares.

foi completamente elucidado, porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que o papel exercido pelos sistemas de defesa antioxidante do espermatozóide e do plasma seminal contra os danos oxidativos causados pelas EROs é evidente.

COMENTÁRIOS

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal do espermatozóide ainda não

Cristiane Arieta Alvarez

Gentil Vanini de Moraes

Endereço para correspondência: Rua Prof. Guido Inácio Bersch, 144, apto 41
CEP 87.020-250. Maringá, Paraná.
e-mail: cristiane@grupointegrado.br

Recebido em 10/02/06

Revisado em 29/03/06

Aceito em 03/04/06

REFERÊNCIAS

- (1) POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A. & WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, s.L., v.46, p.541-549, 1973, 1973.
- (2) HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, s.L., v.128, p.169-179, 1998.
- (3) ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, s.L., v.16, n.3., p.183-188, 1993.
- (4) AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, s.L., v.40, p.183-197, 1989.
- (5) SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Alternative Medicine Review**, s.L., v.5, p.28-38, 2000.
- (6) EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), **PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH. Human Kinetics**. Champaign: Illinois, 1994. pp.35-42.
- (7) FREI, B.; STOCKER, R.; ENGLAND, L. et al. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, s.L., v.264, p.155-163, 1990.
- (8) FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, s.L., v.88, p.11003-11006, 1992.
- (9) DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, s.L., v.58, p.1034-1039, 1992.
- (10) LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R.A. Minireview: ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, s.L., v.52, p.262-266, 1995.
- (11) ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, s.L., v.23, p.77-79, 1989.
- (12) WHANGER, P.D. & BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **Journal of Nutrition**, s.L., v.118, p.846-852, 1988.
- (13) VIRAG, G.Y.; MÉZES, M. Glutathione-peroxidase activity of seminal plasma in rabbits. **Magyar Allatorvosok Lapja**, s.L., v.49, p.296-297, 1994.
- (14) MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K. Effect of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue response, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, s.L., v.75, p.2994-3003, 1997.
- (15) THOMPSON, C.D.; STEWART, R.D.H. Metabolic studies of [⁷⁵Se] selenomethionine and [⁷⁵Se] selenite in the rat. **British Journal of Nutrition**, s.L., v.30, p.139-147, 1973.
- (16) STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

- (17) HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: New York, 1999.
- (18) HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, s.L., v.91, p.14-22, 1991.
- (19) NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, s.L., v.31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- (20) MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, s.L., v.32, p.595-603, 1999.
- (21) AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, s.L., v.7, p.659-668, 1995.
- (22) AITKEN, R.J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, s.L., v.16, p.259-267, 1994.
- (23) SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, s.L., v.48, n.6, p.835-850, 1996.
- (24) AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, s.L., v.25, p. 191-194, 2002.
- (25) GOMES, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, s.L., v.21, p.81-94, 1998.
- (26) AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, s.L., v.35, p.302-315, 1993.
- (27) ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, s.L., v.26, n.7/8, p.869-880, 1999.
- (28) ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, s.L., v.31, n.1, p.17-22, 1999.
- (29) DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, s.L., v.14, p.255-265, 1993.
- (30) DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, s.L., v.10, n.1, p.15-21, 1995.
- (31) KESSOPOULO, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRATT, C.L. et al. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?. **Journal of Reproduction and Fertility**, s.L., v.94, p.463-470, 1994.
- (32) WOLFF, H. The biological significance of white blood cells in semen. **Fertility and Sterility**, s.L., v.63, p.1143-1157, 1995.
- (33) ZINI, A.; GARRELS, K; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, s.L., v.55, n.6, p.922-926, 2000.
- (34) HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- (35) VAN OVERVELD, F.W.G.C.; HAENEN, G.R.M.M. & RHEMREV, J. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico Biological Interactions**, s.L., v.127, p.151-161, 2000.
- (36) MILLAR, J. Vitamin C: the primate fertility factor?. **Medical Hypotheses**, s.L., v.38, p.292-295, 1992.
- (37) LEVINE, M; MORITA, K. Ascorbic acid in endocrine systems. **Vitamins & Hormones**, s.L., v.42, p.1-64, 1985.
- (38) GONUL, B.; KAPLAN, B. Effects of vitamin C supplementation on plasma

antioxidant status in unfed periods. **General Pharmacology**, s.L., v.32, p.195-199, 1999.

(39) YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, s.L., v.76, p.99-111, 2003.

(40) BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, s.L., v.47, p.69-74, 1995.

(41) GEVA, E.; BARTOOV, B.; ZABLUDOVSKY, N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an *in vitro* fertilization program. **Fertility and Sterility**, s.L., v.66, p.430-434, 1996.

(42) SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I. et al. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B₁. **Toxicology**, s.L., v.162, p.209-218, 2001.

(43) THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J. et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, s.L., v.10, p.110-155, 1995.

(44) CHINOY, N.J.; BUCH-NEE, R.P.; MELITA, R.R. et al. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **International Journal of Fertility**, s.L., v.31, p.232-239, 1986.

(45) SONMEZ, M.; TURK, G. & YUCE, A. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, s.L., (Prelo), 2005.

(46) DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. **Experientia**, s.L., v.52, p.97-100, 1996.

(47) MAIORINO, M.; BOSELLO, V.; URSINI, F. et al. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in human. **Biology of Reproduction**, s.L., v.68, p.1134-1141, 2003.

(48) IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx 4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, s.L., v.34, n.2, p.145-169, 2003.

(49) BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, s.L., v.184, p.455-465, 2005.

(50) NOGUCHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **Journal of Nutrition**, s.L., v.103, p.1502-1511, 1973.

(51) HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**, s.L., v.104, p.580-587, 1974.

(52) LANE, H.W.; STRENGTH, R.; JOHNSON, J. et al. Glutathione peroxidase activity in intestinal and liver tissues of rats fed various levels of selenium, sulfur and α -tocopherol. **Journal of Nutrition**, s.L., v.109, p.444-452, 1979.

(53) OCHSENDORF, F.R.; BUHL, R.; BASTLEIN, A. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Human Reproduction**, s.L., v.13, p.353-359, 1998.

(54) RAIJMAKERS, M.; MAARTEN, T.M. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, s.L., v.79, n.1, p.169-172, 2003.

(55) CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A. et al. Effect of supranutritional level of dietary alpha-tocopherol acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, s.L., v.58, p.1723-1732, 2002.

(56) BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. et al. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, s.L., v.106, n.2, p.291-297, 1996.

(57) SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, s.L., v.50, n.2, p.235-245, 2002.