



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

O estresse oxidativo e as vitaminas na reprodução animal

Katiane Queiroz da Silva¹, Ana Gláudia Vasconcelos Catunda², Fátima Révia Granja Lima², Ítalo Cordeiro Silva Lima³

1 Mestra em reprodução animal

2 Aluna de doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

3 Aluno de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

RESUMO

Vários trabalhos demonstram que o oxigênio pode dar origem a várias espécies reativas (EROs) que, ao entrar em contato com a membrana plasmática dos espermatozóides, atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana e desencadeia o processo de peroxidação lipídica. As lesões oxidativas podem alterar a fluidez da membrana espermática comprometendo o desempenho dos espermatozóides no sêmen fresco e criopreservado. Os animais podem utilizar antioxidantes enzimáticos ou antioxidantes naturais como as vitaminas E e C para minimizar os efeitos da peroxidação lipídica nos espermatozóides. O objetivo deste trabalho é discutir como o processo oxidativo afeta o desempenho dos espermatozóides e as propriedades antioxidantes provenientes das vitaminas e minerais sobre o metabolismo dos espermatozóides de mamíferos.

Palavras-chave: antioxidante, espermatozóide, peroxidação lipídica, radicais livres, vitaminas

The oxidative stress and vitamins on animal reproduction

ABSTRACT

Several studies have shown that the oxygen can give rise to several reactive species (ROS) which, in contact with the plasma membrane of spermatozoa, attack the chain polyunsaturated fatty acids present in the membrane and triggers the process of lipid peroxidation. Oxidatives lesions can change the fluidity of sperm membrane compromising the performance of spermatozoa in fresh semen and cryopreserved. Animals can use enzymatic antioxidants or natural antioxidants such as vitamins E and C to minimize the effects of lipid peroxidation in spermatozoa. The objective of this work is to discuss how the oxidation process affects the performance of the spermatozoa and the antioxidant properties from vitamins and minerals on the metabolism of mammalian spermatozoa.

Key words: antioxidants, free radicals, lipid peroxidation, spermatozoa, vitamins

Introdução

O processo de peroxidação causado pela presença de oxigênio sobre os componentes biológicos já vem sendo objeto de estudo desde o final de século XIX (LORRAIN-SMITH, 1899), uma vez que o estresse oxidativo pode causar apoptose e morte de vários tipos de células (SANTANAM et al., 1998; LIU et al., 2003). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado com anomalias na fertilização e no desenvolvimento embrionário (NAVARRO et al., 2004; 2006).

ABDALLA et al. (2001), concluíram que o processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo

insaturado e se propagada por radicais peroxilas resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malonaldeído e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo.

Sabe-se que quanto maior a temperatura e concentração de oxigênio no meio, maior a taxa de peroxidação lipídica, a qual pode ser medida através da produção de malonaldeído (ALVAREZ et al., 1987). Inversamente, quanto maior a atividade das enzimas antioxidantes, menor a taxa de peroxidação lipídica. Sendo assim, o equilíbrio entre esses fatores determina a taxa final de peroxidação lipídica *in vitro* (ALVAREZ et al., 1987).

Peroxidação lipídica e agentes oxidantes

O processo de peroxidação oxida componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e é mediado por espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), conhecidas genericamente como radicais livres (RL), (GILLER e SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo na célula.

Um RL pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALIWELL, 1987). Já as EROs incluem todos os radicais do oxigênio tais como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical alquila (L^{\bullet}), alcoxila (LO^{\bullet}) e peroxila (LOO^{\bullet}), (BARBER e BERNHEIM, 1967; CHANGE et al., 1979). Já nas ERNs estão incluídos o peroxinitrito ($ONOO^-$), o óxido nítrico ($\bullet NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$), (EISERICH et al., 1998; HOGG, KALYANARAMAN, 1999). O ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio (O_2) e o ozônio (O_3) não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares no organismo, sendo por isso também considerados espécies reativas (PORTER, 1984; BENZIE, 1996; PATEL, 1999).

O oxigênio tem papel importante na produção de RL, pois forma as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou Radicais Livres de Oxigênio (RLOs) que podem ser oriundos do processo de fagocitose (MCCORNICK et al., 1996), ciclo das prostaglandinas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) e da respiração mitocondrial (KOWALTOWSKI, 2000; ABUJA e ALBERTINI, 2001).

O processo de peroxidação lipídica tem início quando as EROs retira o hidrogênio ($H\bullet$) de um grupo metil ($-CH_2-$) adjacente à dupla ligação do ácido graxo poliinsaturado. A retirada desse hidrogênio deixa um elétron desemparelhado no carbono formando um radical lipídico ou alila (GIROTTI, 1998). Após isso ocorre um rearranjo molecular e a adição de oxigênio ao radical alila o que forma o radical peroxila (ABUJA e ALBERTINI, 2001). Este radical pode retirar um hidrogênio de outro ácido graxo poliinsaturado formando hidroperóxido de lipídio e radical alila (KAPPUS, 1987; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O radical peroxila forma peróxidos cíclicos que ao final de uma cascata de eventos forma malondialdeído (MDA), (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O hidróxido de lipídio na presença de íon férrico (Fe_2+) sofre rápida decomposição gerando radical alcoxila e $HO\bullet$. Assim o $HO\bullet$ é altamente reativo e danifica lipídios, açúcares, proteínas e DNA (EMERIT et al, 2001). O radical alcoxila reage com ácido graxo adjacente formando radical lipídico que entrará novamente no processo de peroxidação lipídica.

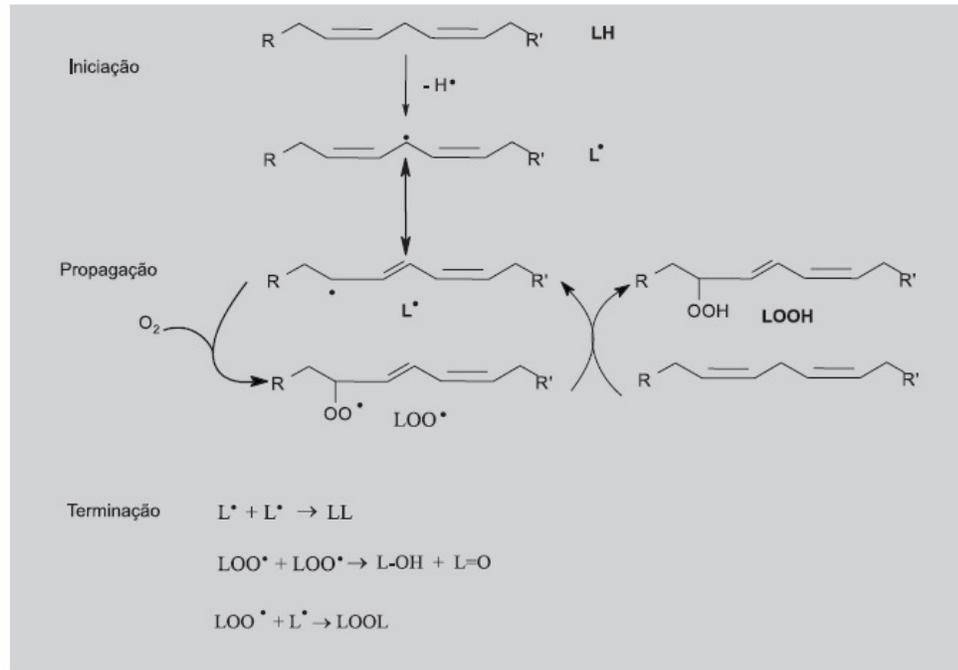


FIGURA 1 - Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.

Os organismos vivos têm um específico mecanismo antioxidante contra o ataque dos radicais livres que são constantemente produzidos pelas células (SURAI, 2002). Na natureza podem ser encontrados agentes antioxidantes nas formas lipossolúveis (vitamina E, carotenóides, coenzima Q, etc.), hidrossolúveis, sintetizadas pelo organismo (ácido ascóbio, glutathione, taurina, etc.) ou que fazem parte dos alimentos (minerais, vitamina E, carotenóides, etc.). Além disso, o organismo vivo produz enzimas antioxidantes que requer mineral como co-fator, um exemplo disso é o selênio (Se), um importante mineral para a família das enzimas glutathione peroxidases (GSH-Px), o Zn, Cu e Mn que fazem parte do funcionamento da família das enzimas peroxidases dismutases (SOD) e o ferro o qual é essencial para as catalases. Neste sentido, a deficiência orgânica desses elementos causa estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos as moléculas e membranas biológicas (SURAI, 2002).

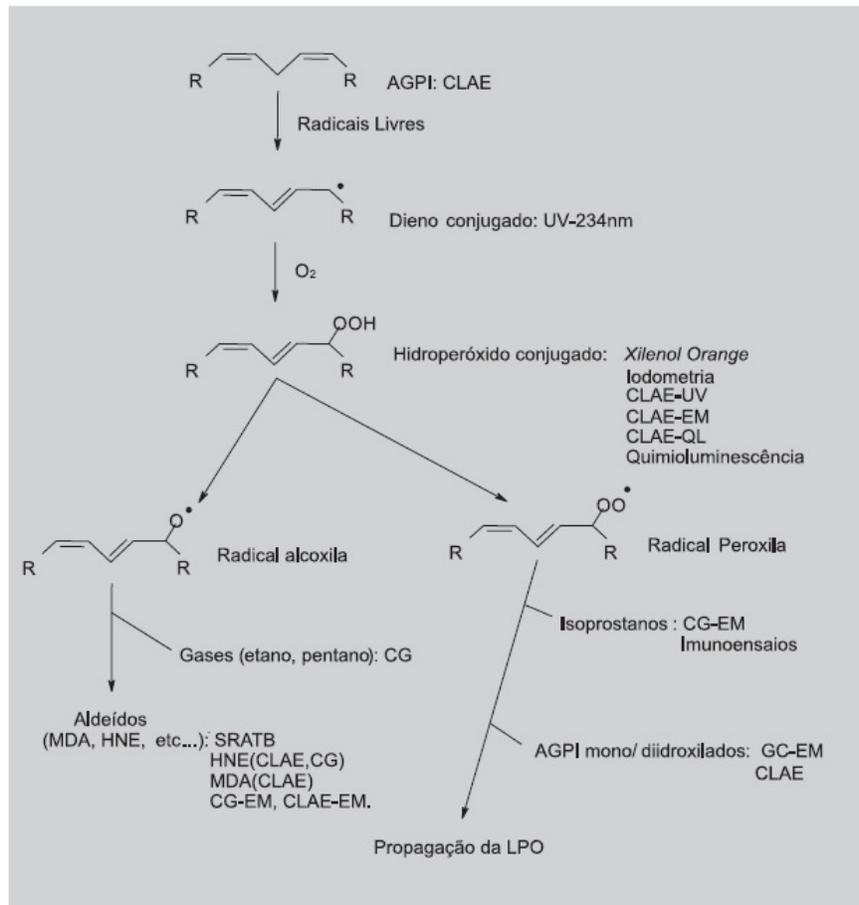


FIGURA 2 - Esquema representativo da peroxidação lipídica, enfocando as principais substâncias formadas durante o processo e as metodologias disponíveis para a sua avaliação.

Danos oxidativos na reprodução

Os espermatozóides são células susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (POULOS et al., 1973).

Recente estudo concluiu que a peroxidação lipídica da membrana plasmática prejudica a função espermática no sêmen fresco e após a criopreservação do mesmo (ARRUDA et al., 2007). O mecanismo de peroxidação está correlacionado com a diminuição da motilidade espermática em coelhos, uma vez que o efeito iônico necessário à

motilidade espermática exige uma membrana plasmática intacta (ALVAREZ e STOREY, 1982).

Segundo JONES e MANN (1976), a perda de fosfolipídios de membrana durante a peroxidação lipídica nos espermatozóides de ovinos, causou diminuição da motilidade dos espermatozóides, bem como danos ao acromossoma da célula. Além disso, ocorreu aglutinação espermática à medida que se perdeu fosfolipídios endógenos.

Espermatozóides de ovinos e touros, estocados a 4°C, sofreram a perda de fosfolipídios de membrana através da peroxidação lipídica que acarretou a toxicidade do meio e a diminuição da motilidade dos espermatozóides nas duas espécies (JONES e MANN, 1973; MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

Na espécie suína, o processo de peroxidação não diferiu estatisticamente no sêmen fresco e no sêmen contendo gema de ovo no diluente, quando os mesmos foram estocados a 5°C, durante três dias (MROTEK et al., 1966).

Vitaminas e minerais como antioxidantes

Os mais importantes agentes antioxidantes naturais são as vitaminas E e C. Além disso, as plantas pigmentadas contêm carotenóides que tem capacidade antioxidante (SURAI, 2002; 2006).

No organismo vivo todos os agentes antioxidantes são trabalhados em equipe, como um "sistema oxidante", responsável pela prevenção dos efeitos dos radicais livres e de produtos tóxicos do metabolismo ao organismo. Um exemplo deste mecanismo, é a "equipe" formada pelas vitaminas E e C e o mineral selênio (Se), que trabalham conjuntamente convertendo os radicais livres em espécies não reativas. A ajuda externa contra os radicais livres pode ser providenciada por uma dieta suplementar com antioxidantes e minerais como o selênio (SURAI, 2002; 2006).

As células eucarióticas contêm moléculas que limitam os danos oxidativos sobre as moléculas orgânicas. Este mecanismo de defesa utiliza a vitamina C, A e E e o β -caroteno (MCCALL e FREI, 1999). As enzimas antioxidantes e o ácido ascórbico reage com EROs protegendo as células

contra os efeitos nocivos da peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Neste sentido a vitamina C tem a capacidade de reduzir os metais que reagem com o O₂ para a formação de compostos oxidantes (GRIFFITHS e LUNEC, 2001). Além disso, as enzimas antioxidantes agem removendo as EROs inibindo, com isso, o processo de peroxidação lipídica (FRIDOVICK, 1986).

Outro elemento implicado na degradação dos peróxidos de hidrogênio é o selênio (Se), (ALVAREZ e STOREY, 1989). O mineral selênio é cofator da Glutathione Peroxidase (GPx), uma das enzimas que catalisa a degradação dos peróxidos (WHANGER e BUTLER, 1988). A atividade GPx é encontrada no sêmen de várias espécies, entre elas os coelhos e caprinos, nos quais exerce diferentes papéis de proteção na degradação de hidroperóxidos (VIRAG e MÉZES, 1994; MARIN-GUZMAN et al., 1997).

Durante o metabolismo aeróbico dos espermatozoides de touro, em meio de gema de ovo, o peróxido de hidrogênio formou-se inibindo a respiração e a motilidade. Este composto também tem sido detectado como um produto metabólico dos espermatozoides de javali e carneiro, em células lavadas e na presença de plasma (TOSIC e WALTON, 1950).

Autores relatam que durante a peroxidação lipídica ocorrem mudanças na membrana espermática e acrossômica, aumentando da permeabilidade celular e causando a perda de lipoproteínas, enzimas e coenzimas na célula espermática (JONES e MANN, 1973). Os antioxidantes desempenharam um papel importante na reprodução de ratos de laboratório (DAS et al., 2006). Neste sentido, antioxidantes incluindo vitamina E melhoraram a motilidade espermática, a qualidade do sêmen e a fertilidade em ratos (YOUSEF et al., 2003).

Nos últimos anos, a vitamina E e outros suplementos têm sido amplamente utilizados nas dietas de ratos, em vários níveis, para melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo destes animais (CHINOY e SHARMA, 1998). A suplementação com vitamina E também aumentou a produção total de espermatozoides e a concentração espermática (SONMEZ et al.,

2007) em javalis e aves. Outros estudos encontraram melhorias na quantidade e qualidade de espermatozóides de animais suplementados com vitaminas C e E (CEROLINI et al., 2006). Assim a vitamina E exerce efeito protetor sobre a integridade da membrana espermática (YOUSEF et al., 2003), uma vez que a fluidez da membrana é um importante determinante de funções celulares normais. Esta característica é, sobretudo, dependente da constituição lipídica e do grau de insaturação de AGPI. Um maior grau de insaturação de AGPI na membrana dos espermatozóides afetou a quantidade e a concentração espermática (LENZI et al., 2000).

NASEEM et al., (2007), revelaram que animais suplementados com níveis suficientes de vitamina E e gorduras nas dietas, tendem a ter maior concentração de espermatozóides. Entretanto, a suplementação de vitamina E na dieta de ratos exerceu efeitos mais significativos no aumento da concentração espermática quando comparado ao grupo arraçoado com gordura (óleo de soja).

A relação da deficiência de vitamina E, também chamada de "anti-esterilidade", com o baixo desempenho reprodutivo masculino foi estabelecida há mais de três décadas (UZUNHISARCIKLI et al, 2007). Nos ratos, a vitamina E mostrou evitar a peroxidação lipídica dos espermatozóides (RAO e SHARMA, 2001). UZUNHISARCIKLI et al., (2007), relataram que a vitamina E melhorou o estresse oxidativo nos espermatozóides ajudando-os a manter a melhor capacidade de fertilização. Além disso, acredita-se que a vitamina E seja um dos componentes principais do sistema antioxidante dos espermatozóides (WANG et al., 2007), pois é um dos principais protetores contra o ataque das EROs (YOUSEF et al., 2003).

Estudo mostrou que a dieta suplementada com ácido ascórbico melhorou a concentração, a motilidade e a capacidade fertilizantes dos espermatozóides (CANYURT et al., 2008). Já a adição de vitamina E aos espermatozóides de peru aumentou a sobrevivência espermática, a

integridade da membrana e reduziu a perda de motilidade após 48 h de armazenamento dos espermatozóides (DONOGHUE et al., 1997).

Estudo revelou que a adição de vitamina E ao diluidor de sêmen ovino, foi melhor que a adição de ácido ascórbico. Uma vez que a vitamina E foi capaz de manter a motilidade e a integridade da membrana espermática, após 48h de conservação dos espermatozóides a 5°C (HERADMAND et al., 2006).

Considerando que o teste de termo-resistência é um bom indicador da viabilidade espermática no sistema genital feminino, autores afirmam que a adição de 600mM/L de vitamina C ao diluidor tris-gema pode ser utilizada para minimizar os efeitos negativos da peroxidação lipídica em espermatozóides ovinos (PEIXOTO et al., 2008).

Considerações finais

Autores afirmam que o metabolismo espermático propicia o processo de peroxidação lipídica, sendo este um importante fator negativo na reprodução animal, à medida que traz danos aos espermatozóides. Estudos revelam que o aporte adequado de antioxidantes, como vitamina C, E, β -caroteno e minerais como o zinco e selênio, pode minimizar as conseqüências do processo peroxidativo sobre a membrana espermática dos animais. Em conclusão, estas evidências sugerem que os antioxidantes oriundos das vitaminas apresentam-se como um importante aliado contra os danos oxidativos nos espermatozóides, quando são administrados de tanto na alimentação quanto associados aos diluidores, visando com isso à preservação do sêmen de animais economicamente importantes.

Referências Bibliográficas

ABDALLA, P. S. D.; LIMA, S. E. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

SILVA, K.Q. et al. O estresse oxidativo e as vitaminas na reprodução animal. **PUBVET**, Londrina, V.4, N. 3, Ed. 108, Art. 729, 2010.

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, v. 306, p. 1-17, 2001.

ALVAREZ G. J.; STOREY T. B. Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Epididymal Spermatozoa: Its Effect on Sperm Motility. *Biology of Reproduction*, n 27, p. 1102-1108, 1982.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.*, v. 8, n. 5, p. 338-348, 1987.

ARRUDA, P. R.; ANDRADE, C. F. A.; PERES, R. K.; FERNANDES, C.; NASCIMENTO, J. R.; CELEGHINI, C. C. E. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

BARBER, A. A.; BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv. Gerontol. Res.*, v. 2, p.3 55-403, 1967.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.*, v. 47, p. 233-261, 1996.

CANYURT, A. M.; AKHAN, S. Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Sperm Quality of Rainbow Trout (*Onchorynchus my kiss*). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 8, p. 171-175, 2008.

CEROLINI, S.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T. Effect of docosahexaenoic acid and a-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, v. 66, p. 877-886, 2006.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHINOY, N. J., SHARMA, A. Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice. *Fluoride*, v. 31, p. 203-216, 1998.

DAS, S., MAITI, R., GHOSHA, D. Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat. *Reproductive Toxicology*, v. 22, p. 606-612, 2006.

DONOGHUE, M. A., DONOGHUE, J. D. Effects of Water- and Lipid-Soluble Antioxidants on Turkey Sperm Viability, Membrane Integrity, and Motility during Liquid Storage. *Poultry Science*, n. 76, p. 1440-1445, 1997.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects Med.*, v. 19, p. 221-357, 1998.

EMERIT, J.; BEAUMOND, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Phamacother*, v. 55, p. 333-339, 2001.

FRIDOVICK, I. Superoxides dismutases. *Methods Enzymology*, v. 58, p. 61-97, 1986.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. *Folia. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.

SILVA, K.Q. et al. O estresse oxidativo e as vitaminas na reprodução animal. **PUBVET**, Londrina, V.4, N. 3, Ed. 108, Art. 729, 2010.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, v. 39, p. 1529-1542, 1998.

GRIFFITHS, H. R; LUNEC, L. Ascorbic acid in the 21st century more than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 173-182, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. *Faseb. Journal*, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.

HERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHENAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, University of Shiraz, v. 7, n. 4, ser. n. 17, 2006.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1411, n.2-3.P.378-384, 1999.

JONES, R.; MANN, T. F. R. S. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 184, p. 103-107, 1973.

JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v. 193, p. 317-333, 1976.

KAPPUS, H. A. Survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 45, p. 105-115, 1987.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 241-250, 2000.

LENZI, A.; GANDINI, L.; MARESCA, V.; RAGO, R.; SGRÒ, P.; DONDERO, F.; PICARDO, M. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cell. *Molecular Human Reproduction*, v. 6, p. 226-231, 2000.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D. L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 34, p. 1998-2004, 2003.

LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *Journal Physiol.*, v. 24, p. 19-25, 1899.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, 1981.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; HUNG, 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*, v. 75, p. 2994-3003, 1997.

MCCALL, M. R; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

SILVA, K.Q. et al. O estresse oxidativo e as vitaminas na reprodução animal. **PUBVET**, Londrina, V.4, N. 3, Ed. 108, Art. 729, 2010.

MCCORNIC, M. L.; METWALI, A.; RAILSBACK, M. A.; WIENSTOCK, J. V.; BRITIGAN, E. B. Eosinofils from Schistosome-induced hepatic granulomas produce superoxide and hydroxyl radical. *The Journal of Immunology*, v. 157, p. 5009-5015, 1996.

MROTEK, J. J.; HOEKSTRA, G. W.; FIRST, L. N. Effect of Boar Semen Senility on Peroxidation of Semen Lipids. *J. Anim. Sci.*, n. 25, p. 688-692, 1966.

NASEEM, M.; GOH, Y. M.; HAFANDI, A.; AMAL, N. M.; KUFLI, C. N.; RAJION, M. A. Effects of vitamin E and soybean oil supplementation on sperm parameters in male Sprague-Dawley rats. *Tropical Biomedicine*, v. 24, n. 2, p. 45-48, 2007.

PATEL, R. P.; MCANDREW, J.; SELLAH, H.; WHITE, C. R.; JO, H.; FREEMAN, B. A.; DARLEY-USMAR, V. M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1411, p. 385-400, 1999.

PEIXOTO, A. V. A; MONTEIRO, J. J. L. P; CÂMARA, R. D; VALENÇA, B. M. R., SILVA, G. M. K.; GUERRA, P. M. M. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina C e trolox. *Ciênc. Vet. Tróp.*, Recife-PE, v. 11, n. 1, p. 16 - 24, 2008.

PORTER, N. A. Chemistry of Lipid peroxidation. *Method. Enzymols.*, v. 105, p. 273-282, 1984.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 46, p. 541-549, 1973.

RAO, M. V.; SHARMA, P. S. N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, v. 15, p. 705-712, 2001.

ROMERO, F. J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M. J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health. Perspect.*, v. 106, p. 1229-1234, 1998.

SANTANAM, N.; RAMACHANDRAN, S.; PARTHASARATHY, S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Seminal Reprod. Endocrinol.*, v. 16, n. 4, p. 275-280, 1998.

SONMEZ, M.; YUCE, A.; TURK, G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive Toxicology*, v. 23, p. 226-231, 2007.

SURAI, P. F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, Nottingham, 2002.

SURAI, P. F. Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, Nottingham, 2006.

TOSIC, J.; WALTON, A. Metabolism of Spermatozoa. The Formation and Elimination of Hydrogen Peroxide by Spermatozoa and Effects on Motility and Survival, Agricultural Research Council Unit of Animal Reproduction. Animal Research Station, Huntingdon Road, Cambridge, 1950.

UZUNHISARCIKLI, M.; KALENDER, Y.; DIRICAN, K.; KALENDER, S.; OGUTCU, A.; BUYUKKOMURCU, F. Acute, sub acute and sub chronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 87, p. 115-122, 2007.

SILVA, K.Q. et al. O estresse oxidativo e as vitaminas na reprodução animal. **PUBVET**, Londrina, V.4, N. 3, Ed. 108, Art. 729, 2010.

VIRAG, G.Y.; MÉZES, M. Glutathione-peroxidase activity of seminal plasma in rabbits. *Magyar Allatorvosok Lapja*, v. 49, p. 296-297, 1994.

WANG, S.; WANG, G.; BARTON, B. E.; MURPHY, T. F.; HUANG, H. F. S. Beneficial effects of vitamin E in sperm functions in the rat after spinal cord injury. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 2, p. 334-341, 2007.

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*, v. 118, p. 846-852, 1988.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, v. 76, p. 99-111, 2003.