

# 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\alpha$ -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