



Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes

Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms

E.R. Andrade^{1,4}, F.A. Melo-Sterza^{2,3}, M.M. Seneda³, A.A. Alfieri¹

¹Dep. de Medicina Veterinária Preventiva; Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

²Unidade Universitária de Aquidauana; Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, MS, Brasil;

³Dep. de Clínica Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

⁴Correspondência: evelyn_andrade@yahoo.com

Resumo

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é preciso reduzir a produção de ERO ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. O objetivo desta revisão é apresentar a influência do estresse oxidativo na reprodução animal bem como estratégias que possam ser realizadas para impedir o seu acontecimento, entre elas o uso de compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, o tocoferol e o ácido α -lipoico.

Palavras-chave: estresse oxidativo, ERO, antioxidante, reprodução

Abstract

Oxidative stress is a consequence of an imbalance in the amount of reactive oxygen species (ROS), which are also commonly known as free radicals. To reverse the oxidative stress framework is needed to reduce the production of ROS's or increase the amount of antioxidants available. In reproduction, oxidative stress, can cause deleterious effects to both the reproductive system of male and female. The objective of this review is to present the influence of oxidative stress in animal reproduction as well as strategies that may be made to prevent its occurrence, including the use of antioxidant compounds like ascorbic acid, tocopherol and the α -lipoic acid.

Keywords: oxidative stress, ROS, antioxidant, reproduction

Introdução

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e os antioxidantes encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado e uma quantidade excessiva de ERO é liberada, ocorre o estresse oxidativo.

Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. No que diz respeito às fêmeas, os problemas podem ocorrer desde o processo de maturação do oócito até à gestação, e nos machos os distúrbios podem ocorrer durante as várias etapas da espermatogênese. O estresse oxidativo também pode ocasionar lesões ao DNA das células da linha germinativa de ambos os sexos, e se tal processo não for contido, os descendentes do indivíduo em questão poderão apresentar defeitos de diversas ordens. O estresse oxidativo também pode influenciar a eficiência da produção *in vitro* de embriões. Consequências desse estresse podem provocar alterações negativas nos processos de maturação e fecundação dos oócitos bem como de cultivo dos prováveis embriões. Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é preciso reduzir a produção de ERO ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos.

O objetivo desta revisão é apresentar a influência do estresse oxidativo na reprodução animal bem como estratégias que possam ser realizadas para impedir o seu acontecimento, entre elas o uso de compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, o tocoferol e o ácido α -lipoico.

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre eles, pode-se citar, como exemplo, a nutrição inadequada e a permanência dos animais em condições de estresse.

O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio são radicais livres, e estes nem sempre são oxidantes (Maia, 2006). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (Souza e Ferreira, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As ERO incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (Agarwal et al., 2005).

A mitocôndria é o principal local de produção das ERO (Barja, 2007). Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica cinco complexos enzimáticos (Blier et al., 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações REDOX (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV, é convertida em uma das várias ERO, em vez de água. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para o desenvolvimento da vida dos eucariotos (fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de ERO. Essas espécies são produzidas, ainda, por outras reações REDOX, como aquelas envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos, por exemplo o caso da oxidase NADPH (Downling e Simmons, 2009).

A formação de radicais derivados do oxigênio em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Eles são dose dependentes e, quando em baixas concentrações, são responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (Downling e Simmons, 2009). As ERO passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes.

Os três principais tipos de ERO são: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\bullet$), os quais serão brevemente descritos a seguir.

Radical superóxido (O_2^-)

É um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001). É um radical pouco reativo e não tem habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (Nordberg e Arnér, 2001).

Radical hidroxila ($OH^\bullet$)

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ERO. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001; Maia, 2006). Este radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o $OH^\bullet$. Tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001; Maia, 2006).

Influência do estresse oxidativo no sistema reprodutor masculino

A ocorrência do estresse oxidativo na linha germinativa é profundamente influenciada pela presença de antioxidantes nas secreções do trato reprodutivo masculino. Esses antioxidantes incluem enzimas protetoras altamente especializadas que são secretadas no espaço extracelular. Alguns exemplos são: glutathione peroxidase (GPx) e a desmutase superóxida extracelular (SOD), produzidas na cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente (Vernet et al., 1996, 1997). O plasma seminal também possui removedores de radicais livres, tais como o ácido ascórbico, o tocoferol, a taurina, a hipotaurina e o ácido úrico, que contribuem

significativamente para a proteção antioxidante do espermatozoide (van Overveld et al., 2000).

O espermatozoide é um organismo aeróbico, sendo o oxigênio um elemento essencial para manutenção de suas funções. Porém, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, quando da elevada elaboração de ERO. Os danos provocados pelo excesso de ERO afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (Irvine et al., 2000; Valença e Guerra, 2007).

Há muito tempo, correlacionou-se a perda de motilidade espermática a efeitos do estresse oxidativo. Jones et al. (1979) demonstraram que os mecanismos responsáveis por esse fenômeno em mamíferos envolvem a indução de danos peroxidativos à membrana plasmática do espermatozoide, composta por ácidos graxos poli-insaturados que são essenciais para dar à membrana a permeabilidade necessária para participar da fecundação. Estudos têm demonstrado que o espermatozoide e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ERO e que os danos causados na célula espermática advêm de uma alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados oxidáveis. A elevada porcentagem destes elementos torna-os vulneráveis à atuação de agentes oxidantes, como os radicais livres, e, desse modo, torna-os também sensíveis à peroxidação lipídica. (Bilodeu et al., 2002). Quando as espécies reativas de oxigênio atacam as duplas ligações associadas aos ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia de peroxidação lipídica é iniciada, a qual, não sendo paralisada, leva a uma perda da permeabilidade da membrana e consequentemente da função espermática (Aitken e Krausz, 2001).

Sabe-se que a criopreservação induz à formação de ERO, as quais diminuem o desempenho espermático (Watson, 2000). O efeito da oxidação sobre o DNA mitocondrial e sobre a arquitetura da membrana espermática pode ser considerado o principal fator de redução da motilidade espermática e fertilidade do sêmen criopreservado (Cummins et al., 1994). O efeito protetor dos antioxidantes adicionados ao sêmen suíno antes da congelação permite a manutenção funcional das mitocôndrias (Peña et al., 2003).

Durante a descongelação, ocorre um aumento na elaboração de ERO (Chatterjee et al., 2001) devido a um acréscimo na síntese de superóxido, o qual está relacionado a uma queda nos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) e a uma redução da concentração de glutathione. A redução na concentração de glutathione intracelular e a elevação na concentração de ERO podem desencadear a peroxidação lipídica e consequentemente promover a perda da função espermática (Valença e Guerra, 2007).

Influência do estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino

As ERO promovem ações fisiológicas e deletérias no trato reprodutivo da fêmea. Esses radicais estão presentes nos ovários, na tuba uterina e nos embriões, e estão envolvidos nos processos fisiológicos, como maturação oocitária, esteroidogênese, e nas funções do corpo lúteo (Agarwal et al., 2005). O papel das ERO na patogênese da infertilidade dos machos já está bem definido, porém, nas fêmeas, sua função permanece incerta.

Acredita-se que a esteroidogênese esteja relacionada com a atividade enzimática antioxidante e que o oócito dentro do folículo esteja naturalmente exposto a um certo nível de estresse oxidativo. Altas concentrações de estrógeno contribuem para uma maior atividade antioxidante; por outro lado, o estresse oxidativo apresenta impacto na produção de hormônios esteroides produzidos pelas células da granulosa, principalmente o estrógeno. Dessa maneira, o estresse oxidativo contribui ainda para uma redução da atividade antioxidante, o que dificulta, então, o controle do estresse. Fenômenos de peroxidação lipídica parecem estar envolvidos nesse processo, influenciando também a produção de outras glicoproteínas produzidas pelas células da granulosa, como a inibina A, a inibina B, a ativina A e o hormônio antimülleriano, os quais têm sido investigados como marcadores da resposta ovariana e sua reserva folicular (Appasamy et al., 2007).

Diversos fatores, como o consumo de oxigênio, a interferência da luz, os próprios espermatozoides e leucócitos, bem como a ativação oocitária mediada pelo espermatozoide e a ativação do genoma embrionário, podem aumentar a produção de ERO (Wang et al., 2002; Livingston et al., 2009). O estresse oxidativo parece danificar os embriões por levar à peroxidação dos fosfolípidios de membrana e à alteração de grande parte dos tipos de moléculas celulares, tais como lípidios, proteínas e ácidos nucleicos. As consequências desses danos incluem alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento embrionário e apoptose (Wang et al., 2002). Oócitos e embriões parecem estar protegidos do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes dos fluidos folicular e do oviduto. Porém, quando os oócitos são tirados de seu ambiente natural, para a participação na produção *in vitro* de embriões, eles perdem a sua defesa natural, e, portanto, cuidados especiais, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo, devem ser tomados para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE; Wang et al., 2002). Livingston et al. (2009) sugeriram a existência de um reservatório de enzimas antioxidantes no oócito, as quais são armazenadas na forma de mRNA, presumivelmente para prevenir o estresse oxidativo e garantir o desenvolvimento futuro.

Antioxidantes

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem ERO em água para prevenir a superprodução destes compostos. Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

São conhecidos como antioxidantes naturais. Eles neutralizam as ERO excessivas e previnem danos da estrutura celular. São compostos pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx).

Antioxidantes não enzimáticos

São conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico (Nordberg e Årner, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathionas, betacaroteno e caroteno (Maia, 2006). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Ferreira e Matsubara, 1997).

Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido α -lipoico, que serão detalhados a seguir.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também denominado vitamina C ou ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel que tem sido considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular (Alvarez et al., 2006; Hossein et al., 2007). O ácido ascórbico reduz as ERO e age também prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (Annae e Creppy, 2001; Nordberg e Årner, 2001). Estudos *in vitro* sugerem que, em altas concentrações, o efeito antioxidante do ácido ascórbico é diretamente relacionado com a regeneração do tocoferol pela redução dos radicais tocoferil em um ciclo redox (Chow, 1991; Monteiro et al., 2005).

As três principais funções biológicas do ácido ascórbico (síntese de colágeno, secreção hormonal e antioxidação) podem explicar muitos dos efeitos conhecidos da vitamina sobre a reprodução. No tocante ao aparelho reprodutor feminino, foi demonstrado que o ácido ascórbico se acumula nas células da granulosa, da teca e no citoplasma periférico do oócito com o intuito de inibir o reinício da meiose espontânea em oócitos imaturos. O acúmulo de ácido ascórbico nas células da granulosa parece ser um processo essencial para o desenvolvimento folicular, pois ele é necessário para a secreção de colágeno e proteoglicanos no fluido folicular (Kao et al., 1990; Fisher et al., 1991; Luck et al., 1995). Thomas et al. (2001) testaram a ação do ácido ascórbico em meio sem soro e relataram um aumento no número de folículos pré-antrais intactos e uma diminuição na porcentagem de degeneração das células da granulosa e da teca.

Foi sugerido que a atresia folicular tem início como consequência da inadequada proteção das células da granulosa contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio. Os oxidantes induzem a apoptose em células da granulosa cultivadas, e a adição de antioxidantes, como o ácido ascórbico, inibe esta resposta (Tilly e Tilly, 1995). A adição do ácido ascórbico ao meio de cultivo reduz a apoptose folicular em ratos, camundongos e bovinos (Tilly e Tilly, 1995; Eppig et al., 2000; Wang et al., 2002; Kim et al., 2004).

Vários estudos relatam os efeitos diretos da deficiência do ácido ascórbico sobre a fertilidade masculina em animais de laboratório e em espécies domésticas. Baixas concentrações de ácido ascórbico em sêmen bovino foram associadas ao mau desempenho reprodutivo, enquanto cobaias sofreram degeneração do epitélio germinativo testicular (Luck, 1994). Concentrações baixas de ácido ascórbico foram associadas com baixa contagem espermática, aumento do número de espermatozoides anormais, redução da motilidade e aglutinação (Dawson et al., 1990). Já Yousef et al. (2007) trabalharam com suplementação de ácido ascórbico em coelhos machos e verificaram que este antioxidante reduziu significativamente as concentrações de radicais livres e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (GST, SOD e CAT) em comparação com animais não tratados.

Tocoferol

O tocoferol, ou vitamina E, é conhecido como o principal antioxidante lipossolúvel que protege os ácidos graxos poli-insaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ele é um potente removedor de radicais peroxil ($\text{LOO}\cdot$) e, provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (Halliwell e Gutteridge, 1999; Droge, 2002). Faz-se necessário destacar que os efeitos do tocoferol podem variar com a dose utilizada, pois, de acordo com a quantidade de radicais hidroxilas a serem inativados, o tocoferol poderá ter o efeito antioxidante ou estimular a oxidação (Cao e Cutler, 1997).

A adição de tocoferol aos ejaculados tem demonstrado efeitos variados, pois o processo de oxidação atua diferentemente entre as estruturas das células espermáticas das diversas espécies. No sêmen refrigerado de equinos, Ball et al. (2001) observaram pouco efeito da adição deste antioxidante. No entanto, trabalhando com sêmen ovino fresco, Sarlos et al. (2002) observaram que a adição de tocoferol prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozoide e reduz o grau de danos celulares. A habilidade do tocoferol na inibição da lipoperoxidação da membrana espermática também já foi demonstrada no sêmen fresco (Cerolini et al., 2000) e criopreservado (Breiningner et al., 2005) de varrão e no sêmen criopreservado de bovino (Beconi et al., 1993).

Uma quantidade significativa de tocoferol está presente no ovário e no fluido folicular, o que sugere sua ação sobre o sistema reprodutor feminino (Attaran et al., 2000). A adição de tocoferol ao meio de cultivo de embriões bovinos melhorou a competência de desenvolvimento ao estágio de blastocisto (Olson e Seidel, 2000), além de suprimir os danos oxidativos e potencializar o desenvolvimento de embriões suínos (Kitagawa et al., 2004). Das e Chowdhury (1999) alimentaram ratas com uma dieta deficiente em vitamina E por 70 dias. Entre seus achados, eles mostraram que houve aumento significativo de folículos ovarianos degenerados. Além disso, Vierk et al. (1998) trataram ovinos com doses luteolíticas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 10 do ciclo estral; nos ovinos que receberam doses sistêmicas de vitamina E, os tecidos luteínicos apresentaram mínimas evidências de apoptose, o que foi evidenciado pela diminuição da fragmentação do DNA. Coletivamente, os resultados destes investigadores sugerem que a vitamina E é um componente vital da fisiologia ovariana normal.

Ácido α -lipoico

O ácido α -lipoico (ALA - nome químico: ácido 1,2 ditiolano-3-valérico ou ácido 6,8-ditio-octanoico) é um composto natural conhecido por suas complexas propriedades antioxidantes (Moini et al., 2002; Bilska e Wlodek, 2005; Guibu et al., 2009). O ALA pode ser obtido a partir da dieta e pela síntese mitocondrial (Teichert et al., 2005). O ALA exógeno é rapidamente absorvido e transportado para o compartimento intracelular, sendo reduzido a ácido dihidrolipoico (DHLA). O processo de redução resulta em dois grupos tiol livres, que são responsáveis pelo efeito antioxidante superior da forma reduzida (DHLA) em comparação com a forma oxidada (ALA; Guibu et al., 2009).

ALA e DHLA parecem ser uma dupla antioxidante ideal devido a várias de suas propriedades: i) têm a capacidade de sequestrar algumas espécies reativas, (ii) podem reduzir as formas oxidadas do ácido ascórbico, glutatona e coenzima Q10, que são capazes de regenerar o tocoferol oxidado, formando uma rede antioxidante, e (iii) ambos têm atividade quelante de metal (Packer et al., 1995; Biewenga et al., 1997). A capacidade do ALA de atravessar a barreira hematoencefálica também é uma vantagem porque o cérebro é um importante alvo para a intoxicação por chumbo (Gurer et al., 1999).

Atualmente, apenas a forma oxidada (ALA) é utilizada (Melli et al., 2008). Vários estudos têm mostrado que o ALA exerce múltiplas ações farmacológicas capazes de prevenir a degeneração nervosa em modelos experimentais de doenças como diabetes (Vincent et al., 2005), Parkinson (Bharat et al., 2002), Alzheimer (Abdul e Butterfield, 2007) e síndrome metabólica (Guibu et al., 2009). Ele também inibe o estresse oxidativo na infecção por HIV em estudos experimentais (Packer et al., 1995) e reduz danos decorrentes de isquemia e reperfusão no sistema nervoso central e sistema cardiovascular em estudos com animais (Cao e Phillis, 1995; Freisleben, 2000).

Em um estudo recente, foi demonstrado que o pré-tratamento com ALA atenua a isquemia-reperfusão induzida por peroxidação lipídica, previne a isquemia ovariana pós-lesão e mantém a morfologia ovariana após torção ovariana em ratos (Cosar et al., 2007). Já Gurer et al. (1999) avaliaram a eficácia *in vitro* do ALA contra o efeito citotóxico do chumbo em ovários de hamster e observaram uma diminuição da peroxidação lipídica nas células ovarianas, resultando em considerável aumento da sobrevivência celular. Estes resultados obtidos com ovários estão de acordo com estudos prévios que mostram que o ALA reduz a injúria por reperfusão em vários tecidos (Scott et al., 1994; Biewenga et al., 1996; Guimarães et al., 2007).

Perspectivas

O potencial reprodutivo dos animais é diretamente influenciado pelos danos causados pelo estresse oxidativo. Os resultados obtidos sobre os benefícios proporcionados pelos antioxidantes sobre a viabilidade do sêmen fresco ou congelado, bem como sobre o desenvolvimento oocitário e embrionário, são de extrema importância para o direcionamento de trabalhos futuros que visem ao delineamento de protocolos alternativos de preservação espermática e ao cultivo folicular e embrionário que viabilizem as técnicas reprodutivas ao ponto de passarem a ser economicamente viáveis e empregadas de forma rotineira no Brasil. Por outro lado, é fundamental que mais estudos sejam realizados sobre o estresse oxidativo e as estratégias para que ele seja tratado ou evitado em animais de produção, especialmente no que diz respeito ao sistema reprodutor feminino.

Referências bibliográficas

- Abdul HM, Butterfield DA.** Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, v.42, p.371-384, 2007.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK.** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3:28, 2005.
- Aitken RJ, Krausz C.** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.
- Alvarez CA, Moraes GV, Scapinello C, Martins EN, Cardozo RM, Marcela Mataveli M, Kioshima RS.** Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. *Acta Sci Anim Sci*, v.28, p.165-175, 2006.
- Annae R, Creppy EE.** Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamin E and C. *Hum Exp Toxicol*, v.20, p.477-481, 2001.
- Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP, Muttukrishna S.** Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril*, v.89, p.912-921, 2007.
- Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg J, Miller K, Agarwal A, Sharma RK.** The effect of follicular fluid reactive oxygen species on outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil*, v.45, p.314-320, 2000.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J.** Effects of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.
- Barja G.** Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res*, v.10, p. 215-223, 2007.
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchio MA.** Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v.40, p.841-851, 1993.
- Bharat S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, Andersen JK.** Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology*, v.23, p.479-486, 2002.
- Biewenga GP, Dorstijn MA, Verhagen JV, Haenen GR, Bast A.** Reduction of lipoic acid by lipoamide dehydrogenase. *Biochem Pharmacol*, v.51, p.233-238, 1996.
- Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A.** The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol*, v.29, p.315-331, 1997.
- Bilodeu JF, Blanchete S, Cormier N, Sirad MA.** Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, p.1105-1122, 2002.
- Bilska A, Wlodek L.** Lipoic acid-the drug of the future? *Pharmacol Rep*, v.57, p.570-577, 2005.
- Blier PU, Dufresne F, Burton RS.** Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet*, v.17, p. 400-406, 2001.
- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT.** Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.2126-2135, 2005.
- Cao G, Cutler RG.** High concentration of antioxidants may not improvedefense against oxidative stress. *Arch Gerontol Geriatr*, v.17, p.189-201, 1997.
- Cao X, Phillis JW.** The free radical scavenger, alpha-lipoic acid, protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Free Radic Res*, v.23, p.365-370, 1995.
- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R.** Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, v.58, p.99-111, 2000.
- Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C.** Criopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.498-506, 2001.



- Chow CK.** Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v.11, p.215-232, 1991.
- Cosar E, Sahin FK, Köken G, Toy H, Basarali K, Büyükbaz S.** The protective effect of lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v.47, p.499-503, 2007.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R.** Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol Reprod*, v.37, p.345-362, 1994.
- Das P, Chowdhury M.** Vitamin E-deficiency induced changes in ovary and uterus. *Mol Cell Biochem*, v.198, p.151-159, 1999.
- Dawson EB, Harris WA, Powell LC.** Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Rev Nutr Diet*, v.62, p.1-26, 1990.
- Dowling DK, Simmons LW.** Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*, v.276, p.1737-1745, 2009.
- Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v.82, p.47-95, 2002.
- Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S.** Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.109-16, 2000.
- Ferreira ALA, Matsubara LS.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v.43, p.1-16, 1997.
- Fisher E, McLennan SV, Tada H, Heffernan S, Yue DK, Turtle JR.** Interaction of ascorbic acid and glucose on production of collagen and proteoglycan by fibroblasts. *Diabetes*, v.40, p.371-376, 1991.
- Freisleben HJ.** Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. *Toxicology*, v.148, p.159-171, 2000.
- Ghibu S, Lauzier B, Delemasure S, Amoureux S, Sicard P, Vergely C, Muresan A, Mogosan C, Rochette L.** Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. *Mol Cell Biochem*, v.320, p.141-148, 2009.
- Guimaraes SB, Santos JMV, Aragao AA, Kimura OS, Barbosa PHU, Vasconcelos PRL.** Protective effect of lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition*, v.23, p.76-80, 2007.
- Gurer H, Ozgunes H, Oztezcan S, Ercal N.** Antioxidant role of a-lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med*, v.27, p.75-81, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York: Oxford, 1999.
- Hossein SM, Hashem MA, Jeong YW, Lee MS, Kim S, Kim JH, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Park SW, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.** Temporal effects of α -tocopherol and l ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.107-117, 2007.
- Irvine DS, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J Androl*, v.21, p. 33-44, 2000.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ.** Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*, v.31, p. 531-537, 1979.
- Kao J, Huey G, Kao R, Stern R.** Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in cultured fibroblasts. *Exp Mol Pathol*, v.53, p.1-10, 1990.
- Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG.** Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril*, v.82, p.679-685, 2004.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T.** Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1186-1197, 2004.
- Livingston T, Rich K, MacKenzie S, Godkin JD.** Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.116, p.265-273, 2009.
- Luck MR.** The gonadal extra-cellular matrix. *Oxf Rev Rep Biol*, v.16, p.33-85, 1994.
- Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA.** Minireview: ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod*, v.52, p.262-266, 1995.
- Maia MS.** *Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase*. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- Melli G, Taiana M, Camozzi F, Triolo D, Podini P, Quattrini A, Taroni F, Lauria G.** Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol*, v.214, p.276-284, 2008.
- Moini H, Packer L, Saris NE.** Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.182, p.84-90, 2002.
- Monteiro SC, Matté C, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse ATS.** Vitamins E and C pretreatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. *Neurobiol Learn Mem*, v.84, p.192-199, 2005.
- Nordberg J, Årner ESJ.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free*



Radic Biol Med, v.31, p.1287-1312, 2001.

Olson SE, Seidel Jr GE. Culture of in vitro-produced bovine embryos with Vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod*, v.62, p.248-252, 2000.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*, v.19, p.227-250, 1995.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Antioxidante supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.85-98, 2003.

Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor GY, Rátky J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung*, v.50, p.235-245, 2002.

Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ. Lipoic acid and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Radic Res*, v.20, p.119-133, 1994.

Souza JDS, Ferreira WM. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. *Rev Eletr Nutr*, v.4, p.456-461, 2007.

Teichert J, Tuemmers T, Achenbach H, Preiss C, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Pharmacokinetics of α -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. *J Clin Pharmacol*, v.45, p.313-328, 2005.

Thomas FH, Leask R, V. Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, v.122, p.487-495, 2001.

Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, v.136, p.242-252, 1995.

Valença RMB, Guerra MMP. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.47-53, 2007.

van Overveld FW, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden JP, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact*, v.127, p.151-161, 2000.

Vernet P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev*, v.47, p.87-98, 1997.

Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck N, Dufaure JP, Drevet JR. In vitro expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase protein lacking selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*, v.74, p.125-131, 1996.

Vierk JE, Hansen TR, Austin KJ, Van Kirk EA, Hess BW, Murdoch WJ. Inhibition by tocopherol of prostaglandin-induced apoptosis in ovine corpora lutea. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.56, p.265-276, 1998.

Vincent AM, Stevens MJ, Backus C, McLean LL, Feldman EL. Cell culture modeling to test therapies against hyperglycemia-mediated oxidative stress and injury. *Antioxid Redox Signal*, v.7, p.1494-1506, 2005.

Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*, v.78, p.1272-1277, 2002.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.

Yousef MI, Awad TI, Elhag FA, Khaled FA. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. *Toxicology*, v.235, p.194-202, 2007.
