

## Estratégias para melhorar a qualidade seminal em garanhões

*Strategies to improve seminal quality in stallions*

Priscilla Nascimento Guasti<sup>1\*</sup>, José Antônio Dell'Áqua Júnior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Botupharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários, Botucatu, SP, Brasil

### Resumo

A grande quantidade de garanhões com alteração na qualidade seminal, seja pela idade, genética ou afecções do trato reprodutivo, resultou nos últimos anos, no rápido avanço do desenvolvimento de técnicas para recuperar e aumentar o potencial reprodutivo dos animais. Os detalhes antes e após a colheita seminal são fundamentais para alcançar o máximo da eficiência reprodutiva e obter índices de concepção adequados. Objetiva-se com esta revisão de literatura abordar as principais técnicas para melhorar a qualidade espermática em garanhões.

**Palavras-chave:** Cushion, equinos, seleção espermática, suplementação, sêmen.

### Abstract

*The large number of stallions with alterations in seminal quality, whether due to age, genetics or reproductive tract disorders, has resulted in the rapid advance of the development of techniques to recover and increase the reproductive potential of animals in recent years. Details before and after seminal collection are essential to achieve maximum reproductive efficiency and obtain adequate conception rates. The aim of this paper was to review the main techniques to improve sperm quality in stallions.*

**Keywords:** Cushion, horses, sperm selection, supplementation, semen.

### Introdução

Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque na criação de equinos, sendo o quarto maior rebanho do mundo (FEI, 2021) composto por 5.962.126 cabeças (IBGE, 2020) que participam da economia nacional de forma ativa, seja na lida, no lazer ou em esportes. Para se manter competitivo, é fundamental que haja o progresso genético das raças, com controle rigoroso da eficiência reprodutiva e do potencial genético de reprodutores e matrizes.

O melhoramento genético em equinos é baseado em características relacionadas a performance atlética, morfologia e pedigree (Varner et al., 2004). E, diferentemente do que ocorre na espécie bovina, as características reprodutivas não são consideradas em programas de melhoramento genético, contribuindo com a expressiva quantidade de reprodutores com baixa qualidade seminal e baixa fertilidade. Adicionado a esta circunstância, os reprodutores são expostos a níveis consideráveis de estresse devido à grande demanda de coberturas e/ou montas naturais, resultando na diminuição da qualidade seminal durante a estação de monta. Ainda, a utilização de reprodutores idosos exige ainda mais atenção nos programas reprodução assistida por possuírem qualidade seminal inferior em relação a animais jovens (Dowsett e Knott, 1996).

A fertilidade de garanhões é complexa e pode ser negativamente impactada por causas multifatoriais como distúrbios comportamentais, distúrbios nutricionais, doenças sistêmicas ou alterações reprodutivas relacionadas ou não a estrutura espermática (Varner et al., 2004). As biotecnologias aplicadas ao sêmen vêm sendo desenvolvidas como estratégias para melhorar o desempenho reprodutivo dos garanhões (Varner et al., 2010). Diferentes meios diluidores, técnicas para seleção e separação espermática, curvas de congelamento tem sido aplicados com o objetivo de melhorar a cinética e metabolismo espermático, de modo que seja possível alcançar níveis de concepção adequados. Da mesma forma, a suplementação na dieta, como na medicina humana, tem sido adotada como uma ferramenta para potencializar a fertilidade (Garolla et al., 2020). Assim sendo, o manejo correto do reprodutor, desde sua ambientação até o momento da cobertura/inseminação artificial podem influenciar o resultado final. Portanto, objetiva-se com esta revisão de literatura abordar técnicas para melhorar a qualidade

\*Correspondência: priguasti@gmail.com

Recebido: 4 de maio de 2022

Aceito: 17 de maio de 2022

espermática em garanhões.

### Suplementação alimentar

O trato digestório dos equinos é desenvolvido e adaptado para utilizar dietas com alto nível de fibras, sendo capazes de processar grandes quantidades de forragem para atender sua exigência nutricional. Com a expansão da equinocultura e aumento da produtividade, os criatórios fornecem dietas com alta proporção de alimentos concentrados (BRAGA, 2006), as quais são formuladas de acordo com a categoria animal.

Além da dieta, a suplementação surge como uma ferramenta para potencializar o desempenho de equinos (Artioli et al., 2010; Horohov et al., 2012; Fagan et al., 2020). De acordo com a European Food Safety Authority (EFSA, 2021), a suplementação alimentar não tem a intenção de tratar ou prevenir doenças mas promover suporte adicional a funções fisiológicas específicas.

Desta forma, a suplementação de macro e micronutrientes direcionada a aspectos reprodutivos do macho equino têm sido amplamente estudada, com certos componentes em evidência como L-carnitina, acetil-L-carnitina, selênio, zinco, coenzima Q10, vitamina C, vitamina B12, ômega 3, vitamina E, entre outros. Na Medicina Humana, a mudança hábitos alimentares acrescida a suplementação são rotineiramente indicados, com visível melhora clínica da fertilidade masculina (Garolla et al., 2022).

A L-carnitina (LC) e acetil-L-carnitina (ALC) atuam no metabolismo espermático ao fornecer energia prontamente disponível, afetando positivamente a motilidade espermática (Agarwal e Said, 2004). No trato reprodutivo, a LC e ALC se concentram no epidídimo, e no ejaculado estão disponíveis no plasma seminal e em pouca quantidade no espermatozoide (Bohmer et al., 1978). As carnitinas facilitam a entrada de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna, em que passam por  $\beta$ -oxidação, gerando produtos energéticos (FADH<sub>2</sub>, Acetil-CoA, NADH) (Matalliotakis et al., 2000). Adicionalmente, possuem função protetora contra radicais livres, por meio da remoção de ácidos graxos de cadeia curta e média que se acumulam como resultado do metabolismo normal e anormal (Vicari and Calogero, 2001).

A suplementação oral diária de 40 g de L-carnitina da dieta de garanhões por 3 meses promoveu melhora nos índices de concepção durante o período de administração (Morris e Gibbs, 2016). A LC ao atingir a corrente sanguínea alcança o lúmen epididimário e parênquima testicular por transporte ativo (Yeung et al., 1980), agindo sobre o metabolismo de espermatozoides epididimários, células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli (Agarwal e Said, 2004).

Em equinos, a suplementação com agentes antioxidantes como selênio, vitamina E, vitamina C está associada a melhora dos mecanismos de defesa antioxidantes e prevenção dos danos causados pelos radicais livres (peroxidação lipídica e fragmentação do DNA espermático), no ambiente testicular e epididimário (Deichsel et al., 2008).

O selênio é um importante antioxidante da função testicular. É um mineral essencial e cofator da enzima glutationa peroxidase (Brigelius-Flohe e Maiorino, 2013). A deficiência de selênio pode levar a falha na condensação do DNA espermático devido ao estresse oxidativo, resultando na diminuição dos índices de fertilidade (Sánchez-Gutiérrez et al., 2008). De acordo com o National Research Council's (NRC - Nutrient Requirements of Horses, 2007), o nível recomendado de selênio na dieta de equinos é de aproximadamente 1 mg/dia, a depender da idade e atividade do animal, não devendo exceder a 3 mg/dia (FDA, 2016). E a associação do selênio a vitamina E diminui o nível de peroxidação lipídica e promove melhora na qualidade seminal (Keskes-Ammar et al., 2003).

A coenzima Q-10 (CoQ) corresponde a um composto orgânico lipofílico natural, com propriedades antioxidantes, atuando na prevenção do estresse oxidativo nos espermatozoides (Balercia et al. 2004).

O zinco exerce função no ciclo celular e estabiliza as concentrações de testosterona (Prasad et al., 1996). Em homens inférteis, a suplementação alimentar com zinco melhorou o volume do ejaculado, motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides normais (Zhao et al., 2016).

A vitamina B12 está associada ao aumento da concentração e motilidade espermática, e redução dos danos ao DNA (Banihani, 2017). Ainda, possui importante função na maturação celular, com grande potencial de renovação do epitélio seminífero, levando ao aumento do número de espermatogônias e espermátócitos. Portanto, a deficiência de vitamina B12 pode levar a queda da concentração espermática (Beltrame et al., 2017).

A relação entre os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (ácido linolênico) e ômega 6 (ácido linolêico) é necessária para manter sob condições normais, as membranas celulares e metabolismo celular (Simopoulos, 2002). Em equinos não há um padrão para a relação ômega 6: ômega 3, no entanto,

considerando que os hábitos alimentares são baseados em forragens supõe-se que a dieta de equinos contenha maior quantidade de ômega 3 que ômega 6 (Simopoulos e DiNicolantonio, 2016). Com a domesticação e maior introdução de grãos, a quantidade de ômega 6 na dieta aumentou significativamente, principalmente em cavalos atletas. O excesso de ômega 6 e alta proporção ômega 6: ômega 3 induz a alterações inflamatórias, doenças cardiovasculares e autoimunes. Portanto, nota-se a importância da suplementação de ômega 3 para retornar ao equilíbrio fisiológico (Simopoulos, 2002). Com relação a aspectos reprodutivos, em homens, a suplementação com ômega 3 aumenta o nível de atividade antioxidante no plasma seminal, a concentração, motilidade e morfologia espermática (Safarinejad e Safarinejad, 2012).

Em equinos, a suplementação com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados aumenta a qualidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado (Freitas et al., 2016), sendo uma ferramenta de fácil acesso para melhorar a capacidade fecundante dos espermatozoides e obter satisfatórias taxas de fertilidade. Contudo, é importante lembrar que a suplementação, como o próprio nome sugere, corresponde a um adicional a alimentação diária, devendo ser levado em consideração os níveis nutricionais da dieta como um todo.

### Colheita e manipulação do sêmen

A qualidade seminal pode ser influenciada por fatores extragonadais, como a própria condução do reprodutor no momento da colheita. O mau condicionamento do garanhão pode levar ao maior número de montas para alcançar a ejaculação. Respeitando a individualidade de cada animal, o número de montas deve ser o mínimo possível. O grau elevado de excitação resulta em maior volume do ejaculado, devido a maior produção de plasma seminal, coincidindo com menor motilidade e concentração por mL (Kalmar et al., 2014).

O plasma seminal é composto por diferentes proteínas, em que especificamente a BSP-1 e BSP-2 representam cerca de 80% do total de proteínas do fluido seminal de equinos (Calvete et al. 1994). Durante a ejaculação tais proteínas se ligam a membrana espermática (Guasti et al., 2020) e atuam de maneira tempo-dependente, com contínuo efluxo de colesterol e fosfolípidios da superfície celular (Bergeron et al., 2004), causando a desestabilização da membrana plasmática (Manjunath e Thérien, 2002).

Os componentes dos meios diluidores como as proteínas do leite e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema do ovo interagem com as SP, prevenindo o efluxo de colesterol e consequentemente promovendo a manutenção da função espermática (Bergeron et al., 2004; Plante et al., 2015). Desta forma, logo após a colheita, a manipulação do sêmen deve ser realizada de maneira cuidadosa e ágil, com diminuição do intervalo entre a colheita e a diluição em meio diluidor.

### Meios diluidores

Atualmente, há uma grande diversidade de meios diluidores para equinos, desde a formulação mais simples até propostas para atender casos específicos, como reprodutores com sêmen de baixa motilidade e/ou baixa congelabilidade.

A pentoxifilina tem sido acrescida aos meios diluidores com o objetivo de aumentar a motilidade espermática por meio da inibição da atividade da enzima fosfodiesterase, que leva ao aumento subsequente dos níveis de AMPc intracelular (Nassar et al., 1999). Em humanos, a pentoxifilina possui o potencial de aumentar a motilidade espermática, aumentar a ligação a zona pelúcida assim como melhorar as taxas de concepção na fertilização *in vitro* (Tesarik et al., 1992; Yosev et al., 1995). Da mesma forma, em equinos, a adição de pentoxifilina ao sêmen de garanhões, até 48 horas após a resfrieração, foi benéfica à qualidade dos espermatozoides, com aumento dos parâmetros de motilidade e integridade de membrana plasmática (Esteves et al., 2004). A ação benéfica da pentoxifilina foi também descrita em espermatozoides epididimários, com aumento da cinética espermática e obtenção de índices satisfatórios de concepção com a utilização de menor dose inseminante com espermatozoides congelados (Guasti et al., 2013; Guasti et al., 2017).

Durante a criopreservação, ocorre a redução da fluidez da membrana espermática podendo levar a danos irreversíveis (Darin-Bennet e White, 1977). A proporção colesterol/fosfolípidios confere um importante fator para manutenção da integridade da membrana plasmática, já que o colesterol confere maior fluidez e estabilidade (Amann e Pickett, 1987). Assim, a adição do complexo ciclodextrina-colesterol no meio diluidor é capaz de aumentar os índices de fertilidade do sêmen de garanhões de baixa congelabilidade (Hartwig et al., 2014). O mesmo resultado foi encontrado quando o colesterol e a caseína

foram adicionados ao meio diluidor de equinos (Campos et al., 2020).

A caseína adicionada ao meio diluidor auxilia na manutenção da estabilidade da membrana plasmática, uma vez que as proteínas BSP de equinos interagem fortemente com agregados de proteína de soro de leite e micelas de caseína. Desta forma, meios diluidores contendo caseína protegem as células espermáticas durante a criopreservação pelo sequestro das proteínas BSP do plasma seminal (Plante et al., 2015).

### Separação do plasma seminal

A remoção do plasma seminal em equinos é indicada na criopreservação devido ao grande volume do ejaculado (Alvarenga et al., 2017). Apesar de sua grande importância na monta natural, alguns animais são visivelmente mais sensíveis aos efeitos da exposição prolongada do plasma seminal, sendo sua remoção necessária (Akçay et al., 2006).

Para separação do fluido seminal, é utilizada a centrifugação convencional por 600 xg durante 10 minutos (Dell'Áqua et al., 2001). Novas abordagens foram desenvolvidas nos últimos anos com o objetivo de minimizar os impactos da centrifugação, como o *cushion* e o filtro com membrana hidrofílica sintética (Alvarenga et al., 2017).

O *cushion* consiste em um gradiente de alta densidade que permite a utilização de maior força na centrifugação (1000 xg) por maior tempo (20 minutos). A técnica possibilita a recuperação de maior quantidade de espermatozoides sem danificar a membrana espermática, pois o gradiente de densidade tem função amortecedora do impacto da centrifugação (Bliss et al., 2012). A utilização do Red Cushion (Botupharma, Brasil) permite maior visualização do pellet formado, facilitando sua recuperação.

Já a filtragem do sêmen com a membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter, Botupharma, Brasil) é realizada de forma manual, sem o impacto da centrifugação. A membrana é composta por poros de 2 µm, os quais permitem a passagem do plasma seminal e bactérias, e, conseqüente retenção dos espermatozoides (Ramires et al., 2015). Consiste em um processo manual, de baixo custo e fácil manuseio podendo ser utilizado em substituição à centrifugação convencional.

### Seleção espermática

A seleção espermática é realizada por meio da centrifugação em gradiente de densidade, que consiste em uma solução coloidal composta por partículas de sílica recobertas com silano (Morrel, 2012).

Na seleção espermática é aplicada menor força na centrifugação, cerca de 400 xg, por 20 minutos. Sob centrifugação, o gradiente confere um desafio para a passagem dos espermatozoides, sendo aptos a atravessarem somente os espermatozoides com motilidade adequada e morfologia normal (Alvarenga et al., 2017).

O uso da seleção espermática é indicado para reprodutores com baixa qualidade seminal, sendo o sêmen fresco, refrigerado ou congelado. A taxa de recuperação é variável, cerca de 40%, a depender da qualidade seminal inicial (EquiPure, Nidacon, Suécia). A centrifugação com o gradiente de densidade é capaz de reter espermatozoides imóveis, espermatozoides com defeitos morfológicos, além de bactérias, células inflamatórias e outros tipos celulares, conferindo ao *pellet* recuperado adequada qualidade espermática (Samardzija et al., 2006).

Portanto, apesar dos métodos de seleção dos reprodutores equinos não considerarem os aspectos reprodutivos, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos com intuito de aumentar o potencial reprodutivo de garanhões. Devido ao grande número de animais com alterações seminais, seja por idade, genética ou afecções do trato reprodutivo, os detalhes desde o manuseio do reprodutor, condução na colheita seminal até a manipulação do sêmen influenciam a qualidade do sêmen. A escolha das melhores estratégias deve ser baseada na individualidade de cada garanhão, para assim alcançar o sucesso nos programas reprodutivos.

### Referências

- Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online*, v.8, p. 376–384, 2004.
- Akçay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, v.53, p.481-5, 2006.
- Alvarenga MA, Papa FO, Ramires Neto C. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, p.81-85, 2017.

- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-73, 1987.
- Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AH Jr.** Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc*, v.42, p.1162-73, 2010.
- Banihani SA.** Vitamin B12 and Semen Quality. *Biomolecules*, v.7, p.42, 2017.
- Belframe FL, Sasso-Cerri E.** Vitamin B12-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian J Androl*, v.19, p.567-72, 2017.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P.** Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD.** The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, v.77, p.1232-9, 2012.
- Bohmer T, Hoel P, Purvis K, Hansson V.** Carnitine levels in human accessory sex organs. *Arch Androl*, v.1, p.53-59, 1978.
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M.** Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, v.1830, p.3289-3303, 2013.
- Campos GA, Garcia VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Segabinazzi LGTM, Maciel LFS, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA.** Sodium Caseinate and Cholesterol Improve Bad Cooler Stallion Fertility. *J Equine Vet Sci*, v.93, 103201, 2020.
- Darin-Bennett A, White IG.** Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, p.466-70, 1977.
- Deichsel K, Palm F, Koblichke P, Budik S, Aurich C.** Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, v.69, p.940-945, 2008.
- Dell'Aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS.** Effect of centrifugation an packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.324-5, 2001.
- Dowsett KF, Knott LM.** The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, v.46. p.397-412, 1996.
- Fagan MM, Harris P, Adams A, Pazdro R, Krotky A, Call J, Duberstein KJ.** Form of Vitamin E Supplementation Affects Oxidative and Inflammatory Response in Exercising Horses. *J Equine Vet Sci*, v.91, 103103, 2020.
- Freitas ML, Bouéres CS, Pignataro TA, Oliveira FJG, Viu MAO, Oliveira RA.** Quality of Fresh, Cooled, and Frozen Semen From Stallions Supplemented with Antioxidants and Fatty Acids. *J Equine Vet Sci*, v.46, p.1-6, 2016.
- Goulart HM, Silva AEDF, McManus C, Papa FO.** Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. *R. Bras. Zootec.*, v.33, p.112-122, 2004.
- Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Martin I, Avanzi BR, Dell'Aqua JA, Papa FO.** Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.1153-1156, 2013.
- Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Carmo MT, Dell'Aqua JA, Crespilho AM, Rifai EA, Papa FO.** Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci*, v.179, p.27-34, 2017.
- Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-Dell'aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua Jr JA.** Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, v.81, 340e6, 2014.
- Horohov DW, Sinatra ST, Chopra RK, Jankowitz S, Betancourt A, Bloomer RJ.** The Effect of Exercise and Nutritional Supplementation on Proinflammatory Cytokine Expression in Young Racehorses During Training. *J Equine Vet Sci*, v.32, p.805-815, 2012.
- Kalmar JJ, Ball BA, Troedsson MHT, McQuerry KJ, Baumber-Skaife J, Loomis PR, Squires EL.** Effect of number of mounts and pre-freeze concentration on stallion seminal parameters. *J Equine Vet Sci* 34, p.30, 2014.
- Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, Zghal K, Fki H, Damak J, Bahloul A.** Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl*, v.49, p.83-94, 2003.
- Morrell JM.** Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *J Equine Vet Sci*, v.32, p.436-440, 2012.
- Manjunath P, Thérien I.** Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-19, 2002.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S.** Modulation of sperm tail

- protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril*, v.7, p.919–923, 1999.
- NRC.** *Nutrient Requirements of Horses*. 6th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press 2007; p. 94-97.
- Plante G, Lusignan MF, Lafleur M, Manjunath P.** Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod Biol Endocrinol*, v.13, p.92, 2015.
- Ramires Neto C, Sancler da Silva YFR, Resende HL, Guasti PN, Monteiro GA, Papa PM, Dell'Áqua Junior JA, Puoli Filho, JNP, Alvarenga MA, Papa FO.** Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. *J Equine Vet Sci*, v.35, p.277–282, 2015.
- Safarinejad MR, Safarinejad S.** The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. *Asian J Androl*, v.14, p.514-515, 2012.
- Samardzija M, Karadjole M., Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T.** A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.237-247, 2006.
- Sánchez-Gutiérrez M., García-Montalvo E., Izquierdo-Vega J., Del Razo L.** Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biol Toxicol*, v.24, p.321–329, 2008.
- Sheikh N, Goodarzi M, Bab Al-Havaejee H, Safari M, Amiri I, Najafi R, Hadeie J.** L-Carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. *International Journal of Fertility*, v.45, p.236–240, 2000.
- Simopoulos AP.** The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.365-79, 2002.
- Simopoulos AP, DiNicolantonio JJ.** The importance of a balanced  $\omega$ -6 to  $\omega$ -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Heart*, v.3, e000385, 2016.
- Tesarik J, Mendoza C, Carreras A.** Effect of phosphodiesterase inhibitors, caffeine and pentoxifylline, on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril*, v.58, p.185–90, 1992.
- Vicari E, Calogero A.** Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatico-vesiculourethritides. *Hum Reprod*, v.16, p.2338–2342, 2001.
- Yogev L, Amit A, Gamzu R, Lessing JB, Botchan A, Paz G, Yavetz H.** Pentoxifylline improves sperm binding to the zona pellucida in the hemizona assay. *Fertil Steril*, v.64, p.146–9, 1995.
- Zhao J, Dong X, Hu X, Long Z, Wang L, Liu Q, Sun B, Wang Q, Wu Q, Li L.** Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, v.6, 22386, 2016.
-