Atividades da superóxido-dismutase e catalase no sêmen de homens férteis e inférteis

Seminal superoxide-dismutase and catalase activities in fertile and infertile men

FABIO FIRMBACH PASQUALOTTO – Professor Doutor Titular de Anatomia e Embriologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.
ELEONORA BEDIN PASQUALOTTO – Professora Doutora Titular de Ginecologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do sul, RS, Brasil.
FERNANDA DE MEDEIROS UMEZU – Estudante de Farmácia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
MIRIAN SALVADOR – Professora Doutora Titular de Bioquímica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

Estudo apresentado no 60º Congresso Anual da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, Filadélfia, EUA, 2004, apoio FAPERGS.

✉ Endereço para correspondência:
Fábio Firmbach Pasqualotto
CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana.
Rua Pinheiro Machado, 2569, salas 23/24
95020-170 – Caxias do Sul – RS, Brasil
Fone: (54) 3214-4095
(54) 3215-1695
fabio@conception-rs.com.br
www.conception-rs.com.br

RESUMO

Objetivo: O objetivo do estudo foi avaliar e comparar a atividade das enzimas antioxidantes seminais superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT) entre homens férteis e inférteis.

Metodologia: Dez doadores férteis e 63 pacientes inférteis foram incluídos no estudo. Pacientes inférteis foram subdivididos em pacientes com parâmetros seminais normais (n = 19) e alterados (n = 44). Análise seminal foi realizada de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS). A atividade das enzimas SOD e CAT foi medida espectrofotometricamente e está representada pela média aritmética (± desvio-padrão) de dados referentes a três repetições.

Resultados: A atividade enzimática da SOD mostra-se menor nos pacientes inférteis quando comparada à dos doadores férteis (P < 0,0001). Uma diferença significativa foi notada nos níveis medianos de SOD entre os pacientes com parâmetros seminais normais e alterados (15,15 *vs* 9,74; *P* = 0,021). Diferença similar foi igualmente observada com a CAT (23,19 *vs* 12,44; *P* = 0,032). Uma correlação significativa entre CAT e SOD foi observada (r = 0,461, *P* = 0,0001).

Conclusões: Diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT estão associadas com infertilidade. Elevado grau de correlação entre morfologia espermática e enzimas antioxidantes sugerem a capacidade dos espermatozóides alterados em produzir espécies reativas de oxigênio, resultando em níveis reduzidos de enzimas antioxidantes.

UNITERMOS: Estresse Oxidativo, Infertilidade, Masculino, Antioxidante.

ABSTRACT

Objective: *The goal of our study was to evaluate and compare the seminal antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) among fertile and infertile men.*

Methodology: *Ten fertile donors and 63 infertile patients were included in the study. Infertile patients were subdivided into patients with normal (n = 19) or abnormal semen parameters (n = 44). Semen analysis was performed according to the World Health Organization (WHO) criteria. SOD and CAT activities were measured spectrophotometricaly and it is represented by the mean (± standart deviation) of three experiments.*

Results: *The enzymatic activity of SOD was lower in infertile patients compared to fertile donors (P < 0,0001). A significant difference was noted in the median levels of SOD between patients with normal and abnormal semen parameters (15.15* vs *9.74;* P = *0.021). Similar difference was also noted with CAT (23.19* vs *12.44;* P = *0.032). A significant correlation between CAT and SOD was observed (r = 0.461,* P = *0.000).*

Conclusions: *Decreased SOD and CAT activities are associated with infertility. High degree of correlation between sperm morphology and antioxidant enzymes suggests the ability of abnormal spermatozoa to produce reactive oxygen species resulting in reduced levels of antioxidant enzyme.*

KEYWORDS: *Oxidative Stress, Infertility, Male, Antioxidants.*

INTRODUÇÃO

Infertilidade é definida como a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer gravidez dentro de um ano, período no qual por volta de 90% dos casais conseguem engravidar, independente dos fatores socioeconômicos ou culturais (1,2). Estatísticas demonstram que em 35 a 50% dos casos de infertilidade conjugal a causa está relacionada ao menos parcialmente, com o homem (1,2).

É necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade. O número absoluto de espermatozóides não prediz o prognóstico de fertilidade; por isso, testes *in vitro* foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células (3,4). O entendimento da bioquímica e fisiopatologia dos espermatozóides, assim como o conhecimento das técnicas diagnósticas atualmente utilizadas são essenciais para o adequado manejo da infertilidade. Defeitos na função espermática causam infertilidade masculina em até 24% dos casais que procuram um serviço de infertilidade (5). Essa condição abrange uma extensa gama de funções alteradas, incluindo: movimento anormal do flagelo, falha no reconhecimento da zona pelúcida e

Recebido: 04/05/2005 – Aprovado: 16/03/2006

inibição da fusão do espermatozóide com o oócito (6, 7).

Um dos parâmetros bioquímicos que tem sido muito estudado nos últimos anos são as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (3-7). A toxicidade ao oxigênio é um fenômeno inerente a todas as espécies que necessitam de ambiente aeróbio para a sua sobrevivência (4, 5). Assim como outras células que vivem em condições aeróbias, a produção de ERO pelos espermatozóides origina-se principalmente da atividade metabólica normal (3-7).

Estresse oxidativo é definido como uma situação onde existe uma concentração elevada de ERO devido à sua hiperprodução ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes (8-10). Dessa forma, para que exista o estresse oxidativo é necessário um desequilíbrio entre produção de ERO e sua neutralização. Um aumento nas ERO no sêmen e secreção vaginal pode induzir o estresse oxidativo; concomitantemente, uma diminuição na atividade antioxidante correlaciona-se com infertilidade idiopática (11).

Estresse oxidativo moderado por um longo período pode alterar o estado de condensação do DNA do espermatozóide, um efeito que pode não ser observado antes da fertilização (12). Efeitos diretos e indiretos das Espécies Reativas de Oxigênio podem ocorrer em moléculas dos ácidos ribonucleico (RNA) e desoxirribonucleico (DNA), em proteínas e lipídios (3-5, 8-10, 13). As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ERO por possuírem grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolipídios, os quais são particularmente sensíveis a reações oxidativas (3). A peroxidação lipídica (LPO) está geralmente associada com uma diminuição da função e viabilidade espermática (3-5). Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento do espermatozóide e a sua fusão com o oócito, além de danificar a motilidade espermática normal (3, 6, 7, 13).

O estresse oxidativo é altamente variável devido aos níveis de antioxidantes. Enzimas que neutralizam as ações das ERO incluem a superóxido-dismutase (SOD) e a catalase (CAT), as quais estão presentes no espermatozóide e plasma seminal humano, assim como em outras espécies (3).

O estresse oxidativo em excesso pode estar relacionado com defeitos graves nas características seminais, como oligozoospermia grave e teratozoospermia (4, 5). Entretanto, muitos homens que procuram atendimento para a infertilidade masculina apresentam características seminais normais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (1). Os objetivos do nosso estudo foram: I, avaliar e comparar os níveis das atividades de SOD e CAT no sêmen de pacientes inférteis e em um grupo de doadores férteis de sêmen; II, comparar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT de pacientes inférteis com análise seminal normal e pacientes inférteis com análise seminal alterada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Caxias do Sul e todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado. Dez homens férteis (doadores de sêmen) e 63 homens inférteis foram incluídos no estudo. Os homens inférteis foram divididos em 2 grupos: parâmetros seminais normais (n = 19) e alterados (n = 44). A análise seminal foi realizada de acordo com os padrões da Organização Mundial da Saúde.

As amostras seminais foram coletadas no ambulatório da Universidade de Caxias do Sul, por meio da masturbação após um período de abstinência de 48-72 horas. Pelo programa de controle de qualidade do laboratório onde as amostras foram avaliadas (CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana), uma amostra do recipiente plástico foi previamente testada quanto à sua citotoxicidade, para avaliar a existência ou não de eventuais efeitos deletérios sobre a motilidade espermática. As amostras seminais foram coletadas em uma sala individual destinada especialmente para esse uso.

As amostras foram acondicionadas em uma estufa, à temperatura de 37°C, por 30min, para que se procedesse à liquefação seminal antes da avaliação da concentração espermática e demais parâmetros avaliados no estudo. O intervalo de tempo entre a coleta de uma amostra de sêmen e a sua avaliação inicial variou de 30 até 60min.

A avaliação macroscópica do ejaculado foi realizada no sentido de avaliar os seguintes aspectos: cor, volume, viscosidade e liquefação. O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada acoplada a um pipetador eletrônico. Para averiguação do critério viscosidade (se normal ou alterada), uma amostra de sêmen foi pipetada através de uma agulha de 21Gauge (G) e se observou a extensão do filamento formado. Uma extensão superior a 2,0cm foi considerada alterada, enquanto que, se normal, o sêmen deveria sair da seringa em gotas.

Para determinação da concentração e motilidade espermáticas, uma alíquota de 5µl de sêmen foi colocada em uma câmara de contagem "Makler" e analisada com o uso de um microscópio óptico equipado com uma objetiva de contraste de fase de 20x e uma magnificação de 200x. Dois esfregaços de cada amostra foram preparados e corados pelo método Panótico do hemograma, ou seja, a lâmina foi imersa na solução fixadora do Panótico do hemograma. Pelo menos quatro áreas de diferentes campos foram analisadas em cada esfregaço. A avaliação foi feita por meio da utilização de objetivas de imersão com óleo antidissipador de fluorescência de alta qualidade (x 1000). Os espermatozóides foram classificados como formas normais ou alteradas.

A presença de leucócitos granulócitos nas amostras seminais foi avaliada pelo teste de Endtz (14). Este teste é baseado no fato de que os leucócitos presentes na amostra seminal coram-se de marrom-escuro, ou seja, são células peroxidase-positivo. Para a rea-

lização do teste, um volume de 20µL de sêmen liquefeito foi colocado em um tubo de criopreservação de 1,2 mL. A esse volume seminal, adicionou-se 20µL de solução tampão de fosfato (PBS) e 40µL de solução de benzidina. A solução foi agitada e, após, deixada à temperatura-ambiente por 5min. As células peroxidase-positivo foram contadas em todos os 100 quadrados do retículo da câmara de Makler com uma objetiva de 10x de magnificação. Resultados superiores a 1 x 106/mL foram considerados anormalmente elevados.

A atividade da superóxido-dismutase foi determinada a 480nm, pela medida da inibição da formação de adrenocromo. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a formação de adenocromo por grama de proteína (15). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. A determinação da catalase foi realizada segundo o método descrito por Maehly e Chance (16). Uma unidade de catalase decompõe 1 µmol de H_2O_2 por mg de proteína em 1 minuto a pH 7,4. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteínas/min. A determinação das proteínas totais nas amostras foi realizada empregando-se o kit "Proteínas Totais" (Labtest Diagnóstica, Brasil). Todos os ensaios foram repetidos três vezes.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico específico através do teste U de Mann-Whitney. Para realizar correlações foi utilizado o teste de Spearman. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A concentração espermática foi superior nos doadores de sêmen (85,2 ± 41,2 × 106 espermatozóides/mL) comparado aos pacientes com infertilidade (16,3 ± 7,2 × 106 espermatozóides/mL) (P = 0,02). A motilidade espermática igualmente foi significativamente superior nos doadores (69,2 ± 23,6%), comparado aos pacientes inférteis (38,2 ± 12,5%) (P = 0,04). A morfologia espermática foi superior nos doadores de sêmen (31,2 ± 6,5%) comparados aos pacientes inférteis (18,2 ± 8,1) (P = 0,04) (Tabela 1).

Os resultados mostraram que a mediana da atividade de SOD foi significativamente menor nos pacientes inférteis (10,72) do que nos doadores férteis (28,36) (P < 0,001). Da mesma forma, a mediana da atividade de CAT foi significativamente menor nos pacientes inférteis (4,22) do que nos doadores férteis (30,51) (P = 0,0138) (Tabela 2).

Uma diferença significativa foi notada na mediana da atividade de SOD entre os pacientes inférteis com parâmetros seminais normais e anormais (15,15 *vs* 9,74, respectivamente; P = 0,021). Diferença similar foi igualmente observada com a CAT (23,19 *vs* 12,44, respectivamente; P = 0,032) (Tabela 3).

A morfologia do espermatozóide pelo critério da OMS apresentou uma correlação positiva com os níveis de SOD (r = 0,434, P = 0,012) e CAT (r = 0,395, P = 0,001). Observaram-se correlações positivas entre a atividade de SOD e a concentração espermática (r = 0,303, P = 0,012) e entre a atividade de SOD e a motilidade (r = 0,295, P = 0,014). Uma correlação direta entre a CAT e a SOD foi igualmente observada (r = 0,461, P = 0,0001).

DISCUSSÃO

Concentração espermática normal e outras variáveis avaliadas na análise seminal de rotina não asseguram a fertilidade masculina. Muitos estudos isolados sugerem uma associação entre o dano peroxidativo ao espermatozóide e a incidência de infertilidade masculina (3-7). Estresse oxidativo moderado por um longo período pode alterar o estado de condensação do DNA do espermatozóide, um efeito que pode não ser observado antes da fertilização (12,17-19). Todavia, é importante destacar que existe grande variabilidade nos níveis do estresse oxidativo seminal mesmo em homens inférteis (9).

Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano esteja correlacionada positiva-

Tabela 1 – Parâmetros seminais nos homens avaliados

Parâmetro seminal	Doadores férteis	Pacientes inférteis	P
Concentração (x 10^6 espermatozóides/mL)	85,2 ± 41,2	16,3 ± 7,2	0,02
Motilidade (%)	69,2 ± 23,6	38,2 ± 12,5	0,04
Morfologia (%)	31,2 ± 6,5	18,2 ± 8,1	0,04

P < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 2 – Atividades enzimáticas da superóxido-dismutase e catalase na população estudada

	Doadores férteis	Pacientes inférteis	Valor de P
Superóxido-dismutase	28,36 (25,15 – 46,49)	10,72 (7,18 – 16,36)	0,001
Catalase	30,51 (18,71 – 47,58)	4,22 (5,25 – 24,7)	0,0138

Valores apresentados como mediana (percentis 25 e 75). Valor de *P* < 0,05 foi considerado significante.

Tabela 3 – Atividades enzimáticas da superóxido-dismutase e catalase em pacientes férteis com normozoospermia e parâmetros seminais alterados

Normozoospermia	Parâmetros seminais alterados		Valor de P
Superóxido-dismutase	15,15 (10,63 – 18,73)	9,74 (6,53 – 13,32)	0,0217
Catalase	23,19 (9,52 – 36,81)	12,44 (4,61 – 21,3)	0,0329

Valores apresentados como mediana (percentis 25 e 75). Valor de *P* < 0,05 foi considerado significante.

mente com a geração de espécies reativas de oxigênio por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Esta enzima regula a disponibilidade do NADPH intracelular. A excessiva geração de NADPH está relacionada com os níveis de ERO, as quais são geradas espontaneamente pelos espermatozóides humanos após sua liberação da cauda do epidídimo. Em condições normais, existe um balanço entre a quantidade de ERO produzida e neutralizada. Os danos celulares surgem quando essa condição de equilíbrio é alterada, especialmente quando os sistemas celulares enzimáticos (SOD e CAT) não conseguem eliminar as concentrações aumentadas de ERO (13).

Alguns profissionais envolvidos no atendimento da mulher infértil apenas encaminham o homem para investigação da infertilidade masculina quando na análise seminal existe alguma anormalidade na concentração, motilidade ou morfologia espermática. Infelizmente, essa atitude pode ser um grande engano. Apesar de o nosso estudo ter demonstrado diferenças na concentração, motilidade e morfologia espermática entre os homens inférteis e férteis, alguns homens com parâmetros seminais normais permanecem sem engravidar suas esposas, a despeito do tratamento agressivo utilizado na parceira, porque o parceiro apresenta anormalidades na capacidade de fertilização do espermatozóide, as quais não são detectadas na simples análise seminal. Em virtude disso, neste trabalho avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no sêmen de doadores férteis e pacientes inférteis.

Nosso estudo demonstrou que os níveis das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram inferiores nos pacientes inférteis quando comparados aos férteis. Esse achado corrobora estudos anteriores, demonstrando que a diminuição da atividade enzimática antioxidante talvez esteja relacionada com a origem da infertilidade masculina em determinados grupos de casais inférteis (3,4). Os achados de diminuição de ambos os antioxidantes avaliados endossam a assertiva de que o fenômeno gerador de uma atividade enzimática antioxidante inferior nos pacientes inférteis afetam mais de um antioxidante, ou seja, existe uma correlação direta entre os níveis de atividade enzimática antioxidante da SOD e CAT.

Parece ser aceito o conceito de que as ERO talvez estejam aumentadas em infecções crônicas urogenitais associadas com aumento no número de leucócitos (19, 20). Nosso estudo demonstrou uma correlação negativa entre a leucospermia e os níveis de SOD. Por outro lado, apesar de alguns estudos publicados na literatura, a relevância clínica da geração de ERO durante uma infecção do trato genital masculino não está resolvida e o seu significado biológico na prostatite permanece por ser estabelecido completamente (10). O impacto dos leucócitos contaminantes na função espermática depende do número de células envolvidas, do estado de ativação leucocitária, da geração dos radicais livres e do sítio de produção dos leucócitos (próstata, epidídimo, uretra, etc.). O dano causado aos espermatozóides pode ser moderado se a infiltração leucocitária ficar confinada à próstata ou às vesículas seminais. Nessas circunstâncias, o espermatozóide apenas entra em contato com as ERO geradas pelos leucócitos no momento da ejaculação. Entretanto, se eles foram originados no epidídimo ou testículo, as ERO poderão interagir com a membrana espermática por um longo período, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozóides (10,19,20).

Nosso estudo demonstra que a morfologia espermática está relacionada com a diminuição da atividade enzimática antioxidante da SOD e CAT, sugerindo que a diminuição da fertilidade desses homens talvez não esteja relacionada apenas à diminuição da qualidade morfológica dos espermatozóides, mas também à diminuição da atividade antioxidante nesses indivíduos. Os achados de correlação inversa entre concentração e motilidade espermática e níveis de SOD igualmente sugerem um possível mecanismo fisiopatológico da infertilidade masculina nesses indivíduos.

Quando comparamos os antioxidantes avaliados entre os pacientes inférteis com características seminais normais e alteradas, observamos que os níveis de SOD e CAT foram inferiores nos pacientes com características seminais alteradas. Esse achado endossa estudo anterior, no qual homens normozoospérmicos que estão com infertilidade devem ser avaliados quanto à presença do estresse oxidativo seminal (9).

A diminuição das enzimas antioxidantes SOD e CAT demonstrada neste estudo sugere um potencial mecanismo fisiopatológico para disfunção espermática em pacientes inférteis. Estudos futuros são necessários para avaliar os benefícios da suplementação oral de antioxidantes em pacientes inférteis.

CONCLUSÕES

Níveis diminuídos de enzimas antioxidantes SOD e CAT podem estar associados com homens apresentando infertilidade. Os níveis de SOD e CAT são inferiores nos pacientes com parâmetros seminais alterados, comparados a pacientes com parâmetros seminais normais. A correlação positiva detectada entre a morfologia espermática e enzimas antioxidantes sugere que talvez o consumo de antioxidantes seja maior quando do excesso de espécies reativas de oxigênio produzidas por espermatozóides com alterações morfológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Cambridge, Cambridge University Press, 1999.
2. GALLARNEAU, G.J.; NAGLER, H.M. Cost-effective infertility therapies in the ‘90s: To treat or to cure? Contemporary Urology 1999; 11: 32-45.

3. 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 major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl 1987; 8: 338-48.
4. PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril 2000; 73: 459-64.
5. SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. Hum Reprod 1999; 14:2801-7.
6. AITKEN, R.J.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 542-51.
7. AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; HARGREAVE, T.B.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. J Androl 1989; 10: 214-20.
8. PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; POTTS, J.M.; NELSON, D.R.; THOMAS, AJ, J.R.; AGARWAL, A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. Urology 2000; 55 881-5.
9. PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.JR.; AGARWAL, A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. J Androl 2001; 22: 316-22.
10. POTTS, J.M.; PASQUALOTTO, F.F. Relationship between chronic prostatitis and oxidative stress. Andrologia 2003; 35: 304-8.
11. ALKAN, I.; SIMSEK, F.; HAKLAR, G.; KERVANCIOUGLU, E.; OZVERI, H.; YALCIN, S. et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. J Urol 1997; 157: 140-3.
12. SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R.; NADA, E.A.; EL-TONSY, M.H.; ALVAREZ, J.G. et al. Increased sperm nuclear damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. Fertil Steril 2002; 78: 313-18.
13. AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin N Am 2002; 29: 817-827.
14. SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 70-4.
15. MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. J Biol Chem 1972; 247: 6960-2.
16. MAEHLY, Y.A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. Methods Biochem Anal 1954; 1: 357-424.
17. PASQUALOTTO, E.B.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.; IZZO, V.M.; PINOTTI, J.A.; JOSHI, N.J., et al. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. Fertil Steril 2004; 81: 973-6.
18. KOLETTIS, P.N.; SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.; THOMAS, A.J.JR.; AGARWAL, A. Effect of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal. Fertil Steril 1999; 71: 249-55.
19. SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.JR.; AGARWAL, A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J Androl 2001; 22: 575-83.
20. POTTS, J.M.; SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; AGARWAL, A. Ureaplasma urealyticum infection in men associated with abnormal seminal reactive oxygen species (ROS) and absence of leukocytospermia. J Urol 2000, 163: 1775-78.