

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ANTIOXIDANTES EN LA PRESERVACIÓN DE SEMEN. UNA REVISIÓN

AGUSTÍN MEMBRILLO ORTEGA, ALEJANDRO CÓRDOVA IZQUIERDO, JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ, IVONNE MARÍA OLIVARES-CORICHI, VÍCTOR MANUEL MARTÍNEZ TORRES y JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ

Después de la espermiación y de abandonar los testículos, los espermatozoides de mamíferos no tienen habilidad para fecundar; esta capacidad es adquirida inicialmente en el epidídimo, después se pierde al entrar en contacto con el plasma seminal y posteriormente se reestablece en el aparato reproductivo o genital de la hembra durante el proceso de capacitación (Hicks *et al.*, 1972; Visconti y Kopf, 1998). La capacitación culmina con la adecuada reacción acrosomal que permite la interacción de los gametos maduros de machos y hembras y la fecundación del ovocito. Finalmente, en el caso de que haya ocurrido la implantación, sigue el proceso de desarrollo y diferenciación conducente al nacimiento de un individuo (Vilar-Rojas *et al.*, 1982a, b; Darszon *et al.*, 1999).

Por medio de las técnicas de inseminación artificial (IA) se

han alcanzado avances sustantivos en la reproducción. Esta técnica se ha desarrollado desde finales de los años 50, siendo uno de los principales factores de interés que contribuyeron a su desarrollo la certeza de que el germoplasma de los machos reproductores no estuviera contaminado con patógenos (Thibier y Guerin, 2000). El descubrimiento del glicerol como crioprotector marcó otro avance en la tecnología de congelación de semen; sin embargo, el éxito que se ha tenido con semen de toro, no se ha podido reproducir en otros mamíferos como el suino, el ovino, el caprino y especies exóticas (Holt, 2000a). Esto obedece a que el éxito de la congelación del semen depende de numerosos factores que pueden ser peculiares en cada especie y deben ser optimizados de acuerdo al tipo de semen que se va a preservar (Sansone *et al.*, 2000). Las diferentes especies presentan una serie de factores de variabilidad que deben

considerarse, como son la fisiología y la bioquímica de los espermatozoides, la variación en la anatomía y fisiología del transporte espermático en el aparato reproductivo de la hembra y las características de la implantación del cigoto. Mientras que para la fecundación del ovocito en la vaca se requieren pocos millones de espermatozoides, en las cerdas se necesitan cantidades sensiblemente mayores. Esta diferencia cuantitativa entre las especies constituye una desventaja cuando se utiliza semen criopreservado, ya que en ciertos casos se requiere un mayor número de espermatozoides para lograr la concepción, lo que se dificulta debido a una menor supervivencia espermática durante el proceso de congelación (Holt, 2000a).

Independientemente de la técnica de congelación y descongelación del material germinal criopreservado de que se trate, el número de células apoptóticas aumenta en comparación

PALABRAS CLAVE / Criopreservación / Semen / Radicales Libres / ROS / Estrés Oxidante / Peroxidación Lipídica /

Recibido: 20/11/2003. Aceptado: 8/12/2003

Agustín Membrillo Ortega. Médico Veterinario Zootecnista y Estudiante de Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Xochimilco, México.

Alejandro Córdova Izquierdo. Doctor en Veterinaria, UAM. Profesor-investigador, Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM, Unidad Xochimilco, México.

Juan José Hicks Gómez. M.C., Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Doctor en Ciencias, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México. Investigador, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México.

Ivonne María Olivares Corichi. Bióloga y M.C. en Química, UNAM. Candidata a Doctora en Ciencias, IPN. Investigador, INER, México.

Víctor Manuel Martínez Torres. Médico Veterinario Zootecnista y M.C, UNAM. Profesor, Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Javier de Jesús Valencia Méndez. Doctor en Medicina Veterinaria, Hanover, Alemania. Investigador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Dirección: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. C.P. 04510. México e-mail: jjvm@servidor.unam.mx

con el semen fresco (Anzar *et al.*, 2002). El semen criopreservado es utilizado con éxito en pocas especies y su aplicación a otras puede ser un problema. Como se mencionó, la pobre supervivencia espermática es uno de los principales problemas, por lo que el conocimiento de las características biofísicas de la membrana plasmática espermática es fundamental para proponer soluciones (Holt, 2000b). El almacenamiento de semen, particularmente en estado congelado, causa cambios bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, resultando en una reducción de la movilidad y la viabilidad, con el obvio perjuicio posterior durante el transporte y la fertilidad (Leboeuf *et al.*, 2000). La fertilidad se ve reducida debido a que los espermatozoides dañados o defectuosos generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y éstas son responsables del daño oxidativo (Ball *et al.*, 2001a).

Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas (Hicks, 2001); pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin y Bendich, 1987; Vilar-Rojas *et al.*, 1996; Beckman y Ames, 1998). Entre las especies reactivas de oxígenos, conocidas como 'ROS' por sus siglas en inglés, destacan fundamentalmente (Beckman y Ames, 1998; Sommer *et al.*, 2000) el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último es la principal especie reactiva, y aunque no es un radical libre, es la molécula que más se ha involucrado en el daño de los espermatozoides de equino (Baumber *et al.*, 2000). El H_2O_2 no posee electrones libres y por lo tanto no es un radical libre, sin embargo, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales $\cdot OH$ en presencia de metales de transición (Hicks y Medina-Navarro, 1995; Hicks, 2001). La reacción inicial de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados se denomina lipoperoxidación y es generada por las ROS que inducen una reacción en cadena (Medina-Navarro *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que la síntesis del óxido nítrico (NO), que es un radical libre del nitrógeno, en espermatozoides de ratón y de humano puede inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática (Herrero *et al.*, 1996), en este proceso se involucra adicionalmente el anión superóxido (O_2^-) que es una ROS que al interactuar con el óxido nítrico forma peroxinitrito, una molécula precursora de radicales $\cdot OH$, que realmente sería la responsable de la lipoperoxidación.

La interacción del radical $\cdot OH$ con el material genético modifica el ADN, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula. Los radicales libres han sido asociados a procesos tan diversos como son la inducción de apoptosis neuronal por daño oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Al-Abdulla y Lee, 1998).

Las ROS inducen daño a los fosfolípidos de la membrana y del ADN en espermatozoides humanos y están implicados en la infertilidad masculina. La producción de ROS y el daño del ADN son mayores en espermatozoides inmaduros con retención citoplásmica y anomalías morfológicas de la cabeza (Ollero *et al.*, 2001). La peroxidación lipídica asociada a ROS provoca una disminución de la movilidad y viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (Baumber *et al.*, 2000).

Estrés Oxidante

Aunque los radicales libres del O_2 representan uno de los mecanismos de defensa del organismo durante una infección ya que causan la lisis bacteriana, se ha demostrado que un exceso en la producción de estas especies reactivas produce daño a los organismos vivos por el estrés oxidante (Hicks, 2001). Este tipo de estrés se ha definido como un desequilibrio entre oxidantes y los mecanismos antioxidantes de los organismos, que involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen algunas vitaminas, como la E y la C (Hernández-Alvarado *et al.*, 1995; Frei, 1999).

Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002). El estrés oxidante causado por el H_2O_2 provoca un mal funcionamiento en la mito-

condria y conduce a una muerte celular programada (Liu *et al.*, 2000). La interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, o la inhibición de la misma, predispone a una formación de radicales libres (Hicks, 2001).

En espermatozoides humanos, el H_2O_2 causa una elevada fragmentación del ADN, además de reducir su movilidad y capacidad de fusión con los ovocitos (Aitken *et al.*, 1998). La peroxidación lipídica es un ejemplo de daño oxidante en membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. La peroxidación suele acompañar a diversos procesos degenerativos (Girotti, 1998).

Peroxidación Lipídica

La dinámica de la membrana plasmática de la célula espermática cumple un papel importante en los procesos de maduración, capacitación y fecundación (Wolfe *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999); sin embargo, el aumento de las ROS pueden dañarla (Clarkson y Thompson, 2000) y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante que causa peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, modifica su fluidez y altera la permeabilidad, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular (Batellier *et al.*, 2001).

Con base en lo anterior se puede considerar que un área prometedora de estudio es el posible pre-tratamiento contra los procesos de peroxidación de los espermatozoides o en el medio de dilución para proteger o conservar la integridad de su membrana durante el proceso de congelación y descongelación (Leboeuf *et al.*, 2000), ya que se sabe que los metabolitos generados por las ROS durante los procesos oxidantes trastornan la fusión espermatozoide-ovocito, la movilidad espermática y la integridad del ADN (Aitken *et al.*, 1998).

Mientras que los espermatozoides de pavo *in vitro* requieren condiciones aeróbicas para mantener su viabilidad, los espermatozoides de mamífero que son mantenidos *in vitro* con exceso de O_2 sufren una peroxidación lipídica que les causa daño en la membrana, reduce su movilidad y subsecuentemente su fertilidad (Donoghue y Donoghue, 1997).

En el equino, el uso del semen almacenado en refrigeración se ha visto limitado debido a la baja capacidad de fecundación. Una de las causas de la disminución en la fertilidad es la peroxidación de los lípidos de

la membrana de los espermatozoides, pues el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los hace sumamente susceptibles (Aurich *et al.*, 1997).

La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados puede ser analizada por medio de la cuantificación de malondialdehído (Miller *et al.*, 1998; Poovala *et al.*, 1999), cuya formación se considera como un indicador de lipoperoxidación ya que es uno de los productos resultantes de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular (Lysiac *et al.*, 2002). Por lo tanto, altas concentraciones de este compuesto indican un aumento en la peroxidación.

El malondialdehído, al ser mezclado con el ácido tiobarbitúrico, reacciona formando un pigmento rojo que puede ser detectado a una longitud de onda de 530nm (Takacs *et al.*, 2000). En el equino, la prueba del ácido tiobarbitúrico se ha usado para cuantificar la producción de malondialdehído en los espermatozoides, siendo esta proporcional a la concentración celular (Stradaoli y Magistrini, 2002). La peroxidación ocurre principalmente en la pieza media del flagelo de los espermatozoides equinos (Neild *et al.*, 2002).

Generación de Radicales y ROS

Los radicales libres se pueden formar a partir de moléculas estables mediante ruptura homolítica y reacciones de transferencia de electrones. Estas reacciones se dan por 1) absorción de energía ionizante, como radiaciones ionizantes, ultravioleta, visible y térmica; 2) reacciones redox de transferencia no enzimática de electrones en el caso de reacciones catalizadas por metales de transición; y 3) reacciones catalizadas por enzimas como la superóxido dismutasa que cataliza la formación del H_2O_2 (Hicks, 2001).

Aunque fisiológicamente se forman radicales libres durante la respiración mitocondrial, las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a su producción excesiva (Al-Abdulla y Lee, 1998; Thannickal y Fanburg, 2000; Yves, 2000).

Los espermatozoides dañados durante una rápida congelación o aquellos espermatozoides morfológicamente anormales generan una cantidad mayor de ROS que los espermatozoides morfológicamente normales (Ball *et al.*, 2001a).

La presencia de leucocitos en el eyaculado también es una importante fuente de ROS en el semen humano. Cuando están presentes en

grandes cantidades puede haber una disminución de la capacidad fecundante. En el equino, se ha podido comprobar que la incubación del semen con 5×10^6 neutrofilos/ml aumenta la generación de H_2O_2 y reduce la movilidad espermática *in vitro* (Baumber *et al.*, 2002b). Los neutrófilos secretan ROS hacia el plasma seminal, lo que se suma a la cantidad de ROS producida intracelularmente por los espermatozoides como resultado de la actividad flagelar.

La presencia de un estado de estrés oxidante se cree que regula la función espermática en dos sentidos, tanto benéfico como perjudicial. Resulta benéfico que una peroxidación leve puede promover la capacitación y la activación del espermatozoide, actúa como interruptor en la tirosina cinasa, ocurre una hipermovilidad inducida por el anión O_2^- y un aumento en la afinidad por la zona pelúcida. Es perjudicial el hecho que la peroxidación excesiva resulta en daño espermático (Gadella *et al.*, 2001).

Almacenamiento de Semen

Todos los organismos aeróbicos derivan su energía metabólica de la reducción del O_2 y consecuentemente son susceptibles al daño por peroxidación causada por los radicales libres (Wang *et al.*, 2001). Las reacciones producidas por estos radicales son más activas cuando el semen es almacenado a temperatura ambiente que en estado congelado (Vishwanath y Shannon, 2000). Sin embargo, durante la congelación y descongelación se forman radicales libres y estos tienen un efecto perjudicial (Limaye, 1997). Además, la generación de ROS por espermatozoides dañados tiene un importante impacto sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides en almacenamiento (Ball *et al.*, 2001a).

Existe un estrés asociado a la congelación causado por los cambios de temperatura a que los espermatozoides son sometidos durante el proceso de enfriamiento, los efectos de los componentes del medio y los mismos crioprotectores durante el proceso y, finalmente, por los efectos de la descongelación (Vishwanath y Shannon, 2000). Los espermatozoides de equino generan ROS en forma natural, pero esta generación aumenta con la congelación y descongelación. La criopreservación somete al espermatozoide a un estrés oxidante y posible daño del ADN (Baumber *et al.*, 2002a).

El proceso de congelación del semen causa daños bioquímicos y funcionales a los espermatozoides resultando en una reducción de la movilidad y la viabilidad, perjudicando el transporte y la capacidad de fecundación, por lo que la fertilidad del semen congelado es más baja comparada con el semen fresco (Leboeuf *et al.*, 2000). El daño a bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática, en la membrana acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema. Generalmente, el daño es más severo en el espermatozoide de carnero que en el de toro (Salamon y Maxwell, 2000).

La membrana plasmática y la membrana del acrosoma son más sensibles que la parte locomotora de la célula espermática. La membrana externa del acrosoma es más vulnerable que la parte interna. El daño por congelación y descongelación está acompañado por cambios bioquímicos como la liberación de transaminasa glutámica oxaloacética, pérdida de lipoproteínas y ácidos, disminución en la actividad de fosfatasa, liberación del colesterol, aumento de Na y disminución de K, inactivación de la hialuronidasa, pérdida de prostaglandinas, disminución de ATP y síntesis de ADP, y disminución de la actividad proteolítica acrosomal. Estos cambios pueden ser los responsables de una disminución de la integridad funcional, de la sobrevivencia *in vivo* y de la capacidad de fecundación (Salamon y Maxwell, 2000).

El procesamiento y almacenamiento de semen reduce la movilidad y causa un trastorno de la integridad de la membrana del espermatozoide y estos cambios están asociados con pérdida de la capacidad de fecundación (Maxwell y Stojanov, 1996). Los cambios en la composición de los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides, en la movilidad, viabilidad e integridad de los espermatozoides han sido evaluados en semen de pavo en almacenamiento líquido *in vitro*, donde la movilidad, viabilidad y la integridad morfológica de los espermatozoides se ha visto reducida durante el almacenamiento; cambios en el contenido de los lípidos pueden ser explicados por la lisis de los fosfolípidos de la membrana seguidos por el metabolismo endógeno o por una compleja combinación de lisis, metabolismo y peroxidación (Douard *et al.*, 2000).

Antioxidantes

Un antioxidante con función biológica se define como una

sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato resultando un agente reductor más potente (Hicks, 2001).

Para intentar minimizar la peroxidación se han ensayado diversos antioxidantes, examinando sus efectos sobre los espermatozoides. En el carnero se han analizado los sistemas enzimáticos superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y citocromo C líquido (CHc), antioxidantes que han mejorado la movilidad y la integridad acrosomal del espermatozoide (Maxwell y Stojanov, 1996).

Por el contrario, la adición de sulfato ferroso al semen equino almacenado a 5°C aumenta la peroxidación, disminuyendo la movilidad espermática debido a que coadyuva a la generación de ROS (Ball y Vo, 2002). La preservación de semen líquido a 5°C es una técnica utilizada en el manejo reproductivo de los equinos y el daño oxidativo en los espermatozoides durante el almacenamiento es una causa potencial en la disminución de la movilidad y fertilidad, por lo que se ha evaluado el efecto de adicionar antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos para mantener la movilidad. Sin embargo, la adición de catalasa no ha logrado mejorar significativamente el mantenimiento de la movilidad, la viabilidad y la integridad acrosomal del espermatozoide de equino (Ball *et al.*, 2001b). De hecho, incluso la catalasa puede disminuir la movilidad progresiva de los espermatozoides en semen almacenado a 5°C (Aurich *et al.*, 1997). Sin embargo los niveles de catalasa y superóxido dismutasa han sido evaluados en muestras de semen humano, en donde la astenospermia está relacionada con una disminución de antioxidantes en el eyaculado (Siciliano *et al.*, 2001).

Los espermatozoides del epidídimo son protegidos de los agentes reactivos del O₂ que pueden perjudicar el complejo proceso de maduración (Hinton *et al.*, 1995; Tramer *et al.*, 1998). La protección radica en cinco enzimas principales (Jung y Henke, 1996; Tramer *et al.*, 1998): glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Las enzimas intracelulares SOD, CAT y GR inhiben el daño oxidativo (Borek, 2001).

En el eyaculado de humano, las mitocondrias de los espermatozoides contienen grandes cantidades de PHGPx, una de las principales en-

zimas que ayuda contra la peroxidación producida por el H₂O₂. La disminución en los niveles de esta enzima en los espermatozoides del hombre está asociada con infertilidad (Imai *et al.*, 2001).

El glutatión reducido es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide de carneros y equinos (Fouchécourt *et al.*, 1999); funciona en una variedad de importantes procesos fisiológicos y metabólicos en todas las células de mamíferos, incluyendo la desintoxicación de los radicales libres, metales y otros compuestos electrofílicos (Wang y Ballatori, 1998).

El sistema endógeno de defensa antioxidante reduce la toxicidad molecular del O₂ y de las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Entre las moléculas antioxidantes se ha mencionado repetidamente a la melatonina, que es un eficiente "scavenger", aunque bajo ciertas circunstancias también puede ser pro-oxidante (Guzmán-Grenfell *et al.*, 1999). La melatonina inactiva a radicales altamente reactivos como es el caso del radical ·OH, el singlete de O₂, H₂O₂, NO, y el anión peroxinitrito. Además estimula las diversas enzimas antioxidantes (El-Sokkary *et al.*, 1999; Reiter, 2000). De la misma manera, la albúmina sérica representa el principal y predominante antioxidante en el plasma (Bourdon *et al.*, 1999).

El sistema de defensa antioxidante exógeno derivado de los componentes de la dieta comprende a las vitaminas E y C, el β-caroteno (Tribble, 1999), el retinol y los carotenoides, que son poderosos antioxidantes (Schuneman *et al.*, 2001). Las vitaminas C y especialmente la vitamina E disminuyen el grado de peroxidación lipídica. En los últimos 10 años la función celular antioxidante del α-tocoferol ha sido ampliamente investigada (Azzi *et al.*, 2000). Sin embargo, la vitamina E en el semen equino almacenado a 5°C no mejoró significativamente la movilidad (Ball *et al.*, 2001b). Además de la vitamina E, se ha evaluado el butil hidroxitolueno (Sommer *et al.*, 2000) en espermatozoides de pavo durante el almacenamiento líquido, logrando un mejoramiento en la integridad de la membrana, en la movilidad y en la sobrevivencia espermática (Donoghue y Donoghue, 1997).

La vitamina C o ácido ascórbico es el principal antioxidante en el plasma y dentro de la célula, al donar electrones al radical tocoperóxido de la vitamina E oxidada; de esta manera recicla la función antioxidante del α-tocoferol, ayudando a proteger la

membrana lipídica de la peroxidación (May, 1999). Se le ha utilizado para prevenir el efecto oxidante (Donoghue y Donoghue, 1997) de las lipoproteínas de baja densidad (Carr *et al.*, 2000a).

En semen equino, la vitamina C ha tenido efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5°C (Aurich *et al.*, 1997), sin embargo, no mejora significativamente el mantenimiento de la movilidad (Ball *et al.*, 2001b). En el pavo tampoco ha tenido efectos benéficos sobre las características seminales (Donoghue y Donoghue, 1997).

Por otra parte, las proteínas aisladas del plasma seminal de carnero revierten los daños causados por el choque por frío, aumentan la proporción de membranas intactas de los espermatozoides y se repara el daño causado, restaurándose la permeabilidad de la membrana plasmática (Barrios *et al.*, 2000). De la misma manera, una fracción del plasma seminal de equino contiene fosfocaseinato y parece estar implicada en una actividad antioxidante (Batellier *et al.*, 2001).

Los compuestos como los carotenoides y el α-tocoferol son antioxidantes lipofílicos de la dieta que protegen a las lipoproteínas plasmáticas contra la oxidación (Dugas *et al.*, 1998; Tribble, 1999; Schunemann *et al.*, 2001). Entre las propiedades benéficas de los carotenoides puede haber efectos alentadores, ya que parecen prevenir enfermedades cardiovasculares e incluso el cáncer. Sin embargo, en humanos que consumen vegetales ricos en carotenoides se tienen pocos datos de los efectos antioxidantes (Bub *et al.*, 2000). La modificación oxidativa del ADN, proteínas y lípidos por ROS participa en los mecanismos de envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas (Borek, 2001). Estudios epidemiológicos indican que las frutas y los vegetales son promotores de la salud y protegen contra enfermedades, protección que es debida al efecto antioxidante (Eastwood, 1999).

La vitamina E tiene un impacto en la prevención de enfermedades crónicas; se cree que este efecto está asociado al estrés oxidante y sus efectos benéficos han sido demostrados (Upreti *et al.*, 1997; Brigelius-Flohé y Traber, 1999; Upston *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2000a). Sin embargo, como ya se mencionó la adición de α-tocoferol al semen equino a 5°C no reduce la peroxidación (Ball y Vo, 2002).

Además de la vitamina E, también se han evaluado el butil

hidrooxianisol, el n-propil galato, y el feroxamina mesilato, por su habilidad para preservar la movilidad de espermatozoides de carnero, aunque el diluyente definido puede anular los efectos benéficos de estos (Upreti *et al.*, 1997). El α -tocoferol puede actuar como un antioxidante o pro-oxidante, ya que inhibe o facilita la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad. La actividad pro-oxidante del α -tocoferol es prevenida por el ascorbato, por lo que la vitamina E solo puede ser efectiva en combinación con la vitamina C (Carr *et al.*, 2000b). La combinación de la vitamina E, un antioxidante lipofílico, con vitamina C, un antioxidante hidrofílico, y/o selenio, desintoxica los lípidos de los peróxidos (Schwenke y Behr, 1998).

Por último, se ha demostrado que los extractos de ajo fresco y los flavonoides contienen antioxidantes que previenen el daño oxidativo (Eastwood, 1999; Borek, 2001). Los flavonoides están presentes en las plantas y contribuyen a la defensa antioxidante (Borek, 1997; Fremont *et al.*, 1998). El consumo de soya se ha aconsejado porque contiene de manera natural y en cantidades considerables la isoflavona, un fitoestrógeno que reduce la peroxidación lipídica *in vivo* y aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad en el humano (Wiseman *et al.*, 2000).

Conclusiones

El proceso de congelación y descongelación de células espermáticas reduce la viabilidad de los espermatozoides. Los cambios de temperatura a los que son sometidos provocan un choque por frío, lo que ocasiona que una cantidad considerable de células mueran y otras sean dañadas, afectándose la movilidad, la viabilidad, y la fertilidad. Los radicales libres generados por el proceso de congelación-descongelación y por el metabolismo celular dañan la membrana plasmática espermática, que al estar formada por ácidos grasos poliinsaturados es altamente susceptible a una lipoperoxidación. Aunque los espermatozoides son protegidos por sistemas de defensa antioxidante, estos pueden ser rebasados bajo situaciones en las que las ROS son generadas en exceso, lo que conduce al estrés oxidante, por lo cual puede resultar benéfico el adicionar antioxidantes a los diluyentes definidos para preservación de semen de los machos reproductores.

REFERENCIAS

- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046.
- Al-Abdulla AN, Lee JM (1998) Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. *Am. J. Pathol.* 153: 447-456.
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP (2002) Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.* 66: 354-360.
- Aurich JE, Schöner U, Hoppe H, Aurich C (1997) Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenol.* 48: 185-192.
- Azzi A, Breyer I, Feher M, Pastori M, Ricciarelli R, Spycher S, Staffieri M, Stocker A, Zimmer S, Zingg J (2000) Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *J. Nutr.* 130: 1649-1652.
- Ball BA, Vo A (2002) Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁-BODIPY^{581/591}. *J. Androl.* 23: 259-269.
- Ball BA, Vo AT, Baumber J (2001a) Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62: 508-515.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J (2001b) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenol.* 56: 577-589.
- Ball BA, Baumber J, Sabeur K (2002) Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenol.* 58: 299-300.
- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA (2000) Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63: 1531-1537.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 181-190.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21: 895-902.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA (2002a) Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenol.* 58: 301-302.
- Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA (2002b) Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenol.* 57: 1025-1033.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.
- Borek C (1997) Antioxidants and cancer. *Sci. Med.* 4: 52-61.
- Borek C (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* 131: 1010S-1015S.
- Bourdon E, Loreau N, Blache D (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *Faseb J.* 13: 233-244.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J.* 13: 1145-1155.
- Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincée H, Adam S, Wever J, Müller H, Reckemmer G (2000) Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. *J. Nutr.* 130: 2200-2206.
- Clarkson PM, Thompson SH (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 637S-646S.
- Carr AC, McCall MR, Frei B (2000a) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1716-1723.
- Carr AC, Zhu BZ, Frei B (2000b) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ. Res.* 87: 349-354.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F (1999) Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* 79: 481-510.
- Donoghue AM, Donoghue DJ (1997) Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Sci.* 76: 1440-1445.
- Douard V, Hermier D, Blesbois E (2000) Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biol. Reprod.* 63: 1450-1456.
- Dugas TR, Morel DW, Harrison EH (1998) Impact of LDL carotenoid and α -tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. *J. Lipid Res.* 39: 999-1007.
- Eastwood MA (1999) Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *Quart. J. Med.* 92: 527-530.
- El-Sokkary GH, Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cabrera J (1999) Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol & Alcoholism* 34: 842-850.
- Fouchécourt S, Dacheux F, Dacheux JL (1999) Glutathione-independent prostaglandin D₂ synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. *Biol. Reprod.* 60: 558-566.
- Frei B (1999) Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J.* 13: 963-964.
- Fremont L, Gozzélino MT, Franchi MP, Linard A (1998) Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *J. Nutr.* 128: 1495-1502.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TAE, Colenbrander B (2001) Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249-265.

- Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39: 1529-1542.
- Guzmán-Grenfell AM, Hernández SR, González-Martínez MT, Hicks JJ (1999) Effect of nitric oxide releasers on some metabolic process of rabbit spermatozoa. *Arch. Androl.* 42: 119-123.
- Hernández-Alvarado S, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ (1995) Especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide. *Rev. Ginecol. Obstet. México* 63: 50-54.
- Herrero MB, Pérez MS, Viggiano JM, Polak JM, de Gimeno MF (1996) Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 931-934.
- Hicks JJ (2001) *Bioquímica*. McGraw-Hill. México. 900 pp.
- Hicks JJ, Medina-Navarro R (1995) Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. *Arch. Med. Res.* 26: 169-172.
- Hicks JJ, Pedrón N, Rosado A (1972) Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. *Fertil. Steril.* 23: 172-181.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC (1995) The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 731-745.
- Holt WV (2000a) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- Holt WV (2000b) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenol.* 53: 47-58.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y (2001) Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 64: 674-683.
- Jung K, Henke W (1996) Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 613-617.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Limaye LS (1997) Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. *Stem Cells* 15: 353-358.
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL (2000) Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.* 62: 1745-1753.
- Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT (2002) Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J. Androl.* 23: 400-409.
- Machlin LJ, Bendich A (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J.* 1: 441-445.
- May JM (1999) Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J.* 13: 995-1006.
- Maxwell WM, Stojanov T (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1013-1020.
- Medina-Navarro R, Lifshitz A, Wachter N, Hicks JJ (1997) Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch. Med.* 28: 205-208.
- Miller ER, Appel LJ, Risby TH (1998) Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation* 98: 2390-2395.
- Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A (1999) Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell Sci.* 112: 11-20.
- Neild DM, Gadella BM, Colenbrander B, Agüero A, Brouwers JFHM (2002) Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenol.* 58: 295-298.
- Ollero M, Gil-Guzmán E, López MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas JA, Álvarez CJ (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* 16: 1912-1921.
- Poovala VS, Huang H, Salahudeen AK (1999) Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1746-1752.
- Reiter RJ (2000) Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.* 15: 246-250.
- Salamon S, Maxwell WM (2000) Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- Sansone G, Nastri MJ, Fabbrocini A (2000) Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 55-76.
- Schunemann HJ, Grant BJ, Freudenheim JL, Muti P, Browne RW, Drake JA, Klocke RA, Trevisan M (2001) The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163: 1246-1255.
- Schwenke DC, Behr SR (1998) Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ. Res.* 83: 366-377.
- Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A (2001) Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl.* 22: 798-803.
- Sommer D, Fakata KL, Swanson SA, Stemmer PM (2000) Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro. *Eur. J. Biochem.* 267: 2312-2322.
- Stradaoli G, Magistrini M (2002) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. *Theriogenol.* 58: 347-350.
- Takacs P, Kauma SW, Sholley MM, Walsh SW, Dinsmoor MJ, Green K (2000) Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF- κ B and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *Faseb J.* 10: 1096.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* 279: L1005-L1028.
- Thibier M, Guerin B (2000) Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 233-251.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E (1998) Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 753-758.
- Tribble DL (1999) Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and β -carotene: A statement for healthcare professionals. *Am. Heart Assoc. Circ.* 99: 591-595.
- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF (1997) Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 269-278.
- Upston JM, Terentis AC, Stocker R (1999) Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *Faseb J.* 13: 977-994.
- Vilar-Rojas C, Castro-Osuna Ga, Hicks JJ (1982a) Cyclic AMP and cyclic GMP in the implantation site of the rat. *Int. J. Fertil.* 27: 56.
- Vilar-Rojas C, Ruíz de Chávez I, González-Angulo A, Hicks JJ (1982b) Inhibition of implantation by the intrauterine administration of phospholipases in the rat. *Contraception* 25: 107.
- Vilar-Rojas C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ (1996) Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch. Med. Res.* 27: 1-6.
- Visconti PE, Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.
- Vishwanath R, Shannon P (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- Wang W, Ballatori N (1998) Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50: 335-355.
- Wang XL, Rainwater DL, Vandenberg JF, Mitchell BD, Mahaney MC (2001) Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1190-1195.
- Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TA (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 395-400.
- Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R (1998) Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1506-1514.
- Yves C (2000) Free radicals are in fact potent oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 621S-629S.