

T
677

103856

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN EL
DILUYENTE DE SEMEN DE MACHO CABRÍO ANTES DE
CONGELAR Y DESPUÉS DE DESCONGELAR

T E S I S

(Idónea comunicación de resultados)

**Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

P R E S E N T A

M.V.Z. AGUSTÍN MEMBRILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

DR. ALEJANDRO CÓRDOVA IZQUIERDO

ASESOR

DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ

ASESOR

M. en C. JULIO CERVANTES MORALLI

México D. F.



**XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO**

Julio de 2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero darte las gracias a ti mi Dios por permitir cumplir una más de mis metas, aunque no te conozco físicamente yo sé que siempre has caminado cerca de mí en todos los momentos de mi vida, sean momentos de felicidad o de tristeza, tú siempre me has dado una fuerza infinita para salir adelante en todos los retos que a mi vida han llegado; algunas personas dicen que soy un verdadero ateo y yo con una sonrisa en los labios medito y me digo que no puedo ser lo que dicen por que mi amigo de toda la vida en quien siempre he confiado eres tú Dios.

A ti madre que además de darme la vida también me has impulsado como el arco que lanza la flecha siempre hacia lo más alto y adelante, con tu mirada llena de ternura siempre me has expresado tu cariño y me has colmado de atenciones sin esperar nunca nada a cambio, por todo lo que me has dado a lo largo de toda mi vida hoy y siempre estaré agradecido, lo que te ofrezco es una muestra de gratitud y cariño y quiero decirte gracias por ser mi madre.

A ti padre me hubiera dado tanto gusto darte esta satisfacción de manera personal, también te agradezco el que me hayas dado la vida y quiero decirte que nunca me olvidé de ti, en donde quiera que te encuentres siempre estarás en mi corazón y en mi pensamiento.

Dr. Alejandro Córdova Izquierdo gracias por no perder nunca la confianza en mí, sin su apoyo realmente no hubiera podido llegar a cumplir esta meta.

Dr. Javier Valencia Méndez gracias por todas sus enseñanzas, aun recuerdo los primeros días de trabajo con los chivos en el Rancho de Topilejo y parece que todavía los estoy viviendo quiero decirle que disfruté esos momentos y siempre quedaran gravados en mi mente.

Dr. Fausto Sánchez, Dr. Román Espinosa ustedes han sido mis maestros no se en que orden ponerlos por que igual de importantes han sido en mi vida académica, gracias por sus enseñanzas, pero sobre todo gracias por su amistad.

Dr. Héctor Castillo Juárez quiero agradecerle sinceramente toda su ayuda y todo el apoyo que siempre me ha brindado, tengo muy buenos recuerdos de cuando cursé la maestría y lo único que puedo externar es gracias, muchas gracias.

Dr. Luis Arturo García Hernández aunque es poco el tiempo que lo conozco su ayuda supera en mucho el tiempo y la distancia gracias por todo.

M. en C. Edith Cortés Barberena te doy las gracias por todo el apoyo que me diste para la culminación de esta meta, así mismo al Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa y también agradezco al citómetro: FOMES-98-35-28 de la misma Universidad.

Quiero externar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido en mi formación y para el logro de la culminación de esta meta, y a ti mi querida UAM te doy las gracias por tener un lugar para mi, primero en la licenciatura y después en la maestría ahora voy por el doctorado.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis hijos Ulises, Lorena y Agustín quienes han sido a lo largo de su corta vida el motor de mi existencia a quienes con sus sonrisas han borrado los malos momentos que he pasado, y con su inocencia han preguntado que y para que estudio, a ustedes que con justa razón han cuestionado por que no les dedico más tiempo, a ustedes que han llenado mi vida de cariño, hoy quiero decirles que esta maestría también les pertenece, por que con su animo han contribuido para que este trabajo sea más fructífero y placentero y como el padre que aprende de los hijos he tomado de cada uno de ustedes la fuerza de tres gigantes para seguir adelante; de ti Ulises he tomado la buena disposición para hacer las cosas, la fuerza de tu juventud para no romperme con los primeros vientos y la determinación para siempre lograr lo que quiere.

De ti Lorena, mi niña bonita siempre he admirado la franqueza con que dices las cosas, a veces tienes la razón otras no pero siempre dices lo que piensas, siempre cuestionas, siempre quieres saber más y eso es grandioso por que te hace única.

Agustín eres el espejo de mi persona, somos casi iguales como dos gotas de agua que se dejan caer, no se si yo me parezco a ti o tu a mi, siempre dándole el toque agradable a lo que haces y hacerlo parecer como si fuera un juego pero siempre dedicado al trabajo con toda la responsabilidad que se requiere.

Espero que esta meta sea para ustedes siempre motivación a lo largo de toda su vida, quiero decirles que los quiero mucho y siempre estaré con ustedes y recuerden que GAVIOTA QUE VE LEJOS VUELA MUY ALTO y a mi me gusta volar, espero que a ustedes les guste ver lejos.

CONTENIDO

Índice de cuadros6

Resumen7

Abstract.....9

Prefacio.....10

Introducción12

Materiales y métodos15

Resultados20

Discusión22

Conclusiones25

Colorario.....26

Bibliografía27

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Escala de evaluación de calidad de movimiento de los espermatozoides...	16
Cuadro 2. Promedio de motilidad de los espermatozoides	20
Cuadro 3. Valores de las lecturas de citometría de flujo antes de congelar y después de descongelar el semen.....	20

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN EL DILUYENTE DE SEMEN DE MACHO CABRÍO ANTES DE CONGELAR Y DESPUÉS DE DESCONGELAR.

EFFECT OF THE ADDITION OF ANTIOXIDANTS IN THE EXTENDER OF SEMEN OF MALE GOAT BEFORE OF FREEZING AND AFTER THAWING.

RESUMEN

En la congelación del semen de los machos reproductores se generan especies reactivas del oxígeno que dañan la membrana plasmática del espermatozoide, por lo que la adición de antioxidantes al semen antes de congelar podría anular los efectos perjudiciales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las vitaminas C y E como antioxidantes en el semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar y su efecto sobre la condensación de la cromatina espermática y grado de oxidación de los espermatozoides. Se utilizaron 4 machos cabríos de la raza Alpino Francesa y se analizaron 8 eyaculados de cada semental. Cada eyaculado fue dividido en cuatro grupos, control, con vitamina C, con vitamina E y la combinación de ambas (C+E). La determinación de la condensación de la cromatina espermática se realizó mediante citometría de flujo, utilizando el fluorocromo yoduro de propidio. Los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa en el semen antes y después de la congelación ($P>0.05$), lo cual indica que con la adición de antioxidantes, la condensación de la cromatina espermática en semen antes y después de la congelación fue similar. Para valorar el grado de oxidación de los espermatozoides antes y después de la congelación, se utilizó la reacción mediante el ácido tiobarbitúrico; que detecta peroxidación de los lípidos de la membrana espermática. Se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($P>0.05$). Después de descongelar las muestras de los mismos grupos, solamente hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo testigo y el de

C+E, y se observó que la mezcla de antioxidantes redujo el estrés oxidativo ($P<0.05$).

Siendo menor la cantidad de nanomoles de malondialdehído por miligramo de proteína.

Se concluye que la adición de antioxidantes puede reducir el estrés oxidativo causado por la congelación y descongelación de las células espermáticas.

Palabras clave: Criopreservación, semen, macho cabrío, radicales libres, antioxidantes, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

During preservation of semen in frozen state, oxygen reactivation agents are generated resulting in the damage of the plasmatic membrane of the sperm. Several antioxidant agents have been evaluated to prevent these harmful effects. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of the vitamins C and E on the semen of male goats before freezing and after thawing, as well as its effect on the condensation of the spermatic chromatin and grade of oxidation of the sperms. Four male goats of the French Alpine breed were used analyzing 8 ejaculates from each sire. Every ejaculation sample was split into four groups: control, with vitamin C, with vitamin E and with their combination (C+E). Flow citometry was used to determine the condensation of the spermatic chromatin, by using fluorochrome iodide of propidio. No statistical differences were found ($P>0.05$) when comparing the semen before and after the freezing. To evaluate the oxidation level of the sperms before and after the freezing, the reaction of the acid thiobarbituric was used; which allows to detect per-oxidation of the lipids from the spermatic membrane. There were not statistical differences among the analyzed groups ($P>0.05$). After thawing the samples, there were only differences between control group and C+E group ($P<0.05$). The combination of C+E antioxidants reduced the stress oxidative, showing the lower malondialdehyde levels in the analyzed protein. The addition of antioxidants can reduce the oxidative stress caused by the freezing and thawing of the spermatic cells, is concluded.

Key words: Criopreservation, semen, male goat, free radical, antioxidants, peroxidation lipid.

PREFACIO

La congelación de las células espermáticas de los sementales genéticamente superiores ha contribuido a un mejoramiento genético de los hatos, sin embargo, con el proceso de congelación de las células espermáticas ha traído una variedad de inconvenientes que disminuyen la calidad seminal de los machos reproductores y por lo tanto la viabilidad y la motilidad se ven afectados de manera negativa, se ha comprobado que algunos de estos inconvenientes son la generación de especies reactivas del oxígeno.

Con el proceso de congelación se generan cantidades considerables de especies reactivas del oxígeno, las cuales se suman a las generadas por el metabolismo del espermatozoide y al haber una superproducción de estas especies reactivas se produce un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre producción y degradación por los antioxidantes endógenos.

Para contrarrestar los efectos del proceso de congelación y de la generación de especies reactivas del oxígeno que dañan la membrana plasmática del espermatozoide, algunas investigaciones han probado diferentes antioxidantes para disminuir el estrés oxidativo, encontrando una variedad de resultados en donde algunos sugieren que estos antioxidantes protegen y mantienen la motilidad del material seminal, por el contrario otros no tienen efecto sobre este parámetro; sin embargo, se siguen probando los antioxidantes porque también se ha encontrado que los espermatozoides de algunas especies animales son más resistentes al proceso de congelación que otras, las cuales necesitan de una protección adicional para una mejor calidad del semen.

La vitamina C y la vitamina E se han probado por separado y en combinación, esta investigación realizada con estos antioxidantes sugiere que se deben emplear de manera conjunta, ya que su efecto es más efectivo al actuar de manera sinérgica.

La peroxidación de los ácidos grasos de la membrana plasmática se cuantificó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico, que detecta malondialdehído, siendo este el resultado de una lipoperoxidación.

También algunos estudios sugieren que el proceso de congelación tiene efecto sobre una mayor condensación de la cromatina espermática; sin embargo, este estudio demostró que la congelación no tuvo efecto sobre la condensación de la cromatina de los espermatozoides.

1. INTRODUCCIÓN

El éxito de la congelación del semen depende de numerosos factores y de características particulares de cada especie, por lo que los espermatozoides deberán ser tratados de acuerdo al tipo de semen que se va a preservar (Sansone *et al.*, 2000). Para tener éxito en la inseminación artificial de las especies domésticas, se requiere en general de menos millones de espermatozoides cuando se utiliza semen fresco, en comparación con semen congelado. En el bovino, por ejemplo, al inseminar con semen fresco se necesita de 1 a 3 millones de espermatozoides para alcanzar índices óptimos de fertilidad y más de 20 millones con semen congelado (Seidel, 1999). Esta diferencia cuantitativa se debe a una menor supervivencia espermática durante el proceso de congelación (Holt, 2000). El proceso de congelación de semen da como resultado un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco (Anzar *et al.*, 2002). En células espermáticas también se provoca un estrés que afecta la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de la motilidad y viabilidad, por lo cual la fertilidad del semen congelado es más baja comparada con el semen fresco, debido a que disminuye su capacidad de fecundación (Maxwell y Stojanov, 1996; Leboeuf *et al.*, 2000). Dentro de los principales factores perjudiciales durante la congelación están los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso (Limaye, 1997; Baumber *et al.*, 2002a) siendo los responsables del daño oxidativo (Ball *et al.*, 2001a).

Las bajas temperaturas dañan la membrana plasmática, la membrana acrosomal, las mitocondrias y la vaina del axonema debido a que estas estructuras son más sensibles (Salamon y Maxwell, 2000). Aunque fisiológicamente se forman radicales

libres durante la respiración mitocondrial, es importante tener en cuenta que las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a la producción excesiva de los mismos (Al-Abdulla *et al.*, 1998; Thannickal y Fanburg, 2000; Yves, 2000). La generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) procedentes de los espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides que serán almacenados (Ball *et al.*, 2001a). Entre las ERO destacan fundamentalmente el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Beckman y Ames, 1998; Sommer *et al.*, 2000). Este último es el principal de las especies reactivas 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 peróxido de hidrógeno es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales hidroxilo en presencia de metales de transición (Hicks y Medina-Navarro, 1995; Hicks, 2001). La reacción inicial de la oxidación de los ácidos grasos consiste en una lipoperoxidación y es generada por las ERO que inducen una reacción en cadena, provocando un rompimiento de dobles enlaces en los lípidos de las membranas (Medina-Navarro *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). En espermatozoides humanos las ERO dañan los fosfolípidos de la membrana y están implicados en la infertilidad masculina (Ollero *et al.*, 2001). Los cambios en el contenido de los lípidos pueden ser explicados por la lisis de los fosfolípidos de la membrana seguidos por el metabolismo celular interno o por una compleja combinación de lisis, metabolismo y peroxidación (Douard *et al.*, 2000).

La peroxidación de los ácidos grasos puede ser analizada por medio de la cuantificación de malondialdehído (Miller *et al.*, 1998; Poovala *et al.*, 1999), al

considerarse como un indicador de lipoperoxidación de los lípidos de la membrana celular (Lysiac *et al.*, 2002). Las ERO cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, ya que pueden activar al espermatozoide en la fecundación (Hicks, 2001). Sin embargo, un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002), provocando un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los mecanismos antioxidantes de los organismos. Éstos involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen vitaminas como la E y la C (Hernández-Alvarado *et al.*, 1995; Frei, 1999). La vitamina C y E cumplen una función antioxidante al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica (Azzi *et al.*, 2000). La vitamina C al donar electrones al radical tocoperoxil de la vitamina E oxidada recicla la función antioxidante del α -tocoferol, ayudando a proteger la membrana lipídica de la peroxidación (May, 1999). Por ello, la vitamina E sólo puede ser efectiva en combinación con la vitamina C (Carr *et al.*, 2000b).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las vitaminas C y E como antioxidantes en el semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar y su efecto sobre la condensación de la cromatina espermática y grado de oxidación de los espermatozoides.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 4 machos cabríos de la raza Alpino Francesa entre 2 y 4 años de edad de fertilidad probada pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos en corrales individuales en las instalaciones de la facultad y fueron alimentados con una ración de ensilado de maíz y alimento balanceado comercial.

Colección de semen

Se obtuvieron 8 eyaculados por semental; la colección del semen se realizó por medio de una vagina artificial a una temperatura interna de $42 \pm 1^\circ \text{C}$. Una vez colectado el semen se colocó en baño María a 37°C para la valoración de características como volumen, motilidad y concentración (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997; Kutty y Stephan, 1999; Blash *et al.*, 2000).

Valoración seminal

El volumen del eyaculado fue medido en un tubo colector graduado. La motilidad en masa y la motilidad individual fueron valoradas usando $20 \mu\text{l}$ de semen, que fue colocado en un porta objetos a 37°C , en un microscopio de contraste de fase a una magnificación de 100 X. La motilidad individual fue registrada de acuerdo a la escala

que se muestra en el cuadro 1 colocando el semen bajo un cubre objetos (Das, 1996; Roca, 1997; Bera, 1999; Blash *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Escala de evaluación de calidad de movimiento de los espermatozoides

1	Movimiento no perceptible
2	Movimiento débil con formación de alguna ola
3	Movimiento lento con olas
4	Movimiento vigoroso con moderada rapidez de olas y remolinos
5	Denso, y movimiento muy rápido con olas y remolinos

Basado en: Blash *et al.*, 2000; Shamsuddin, 2000.

Concentración espermática

El número de espermatozoides en el semen fresco fue determinado con una cámara de Neubauer (Barrios *et al.*, 2000).

Lavado de semen

Las muestras de semen fueron centrifugadas a 300 X g por 15 minutos para remover el plasma seminal (Shing, 1995), para lo cual se utilizó un medio de lavado a 37° C, en una proporción de 1:10. El medio de lavado contenía los siguientes ingredientes: 1.60 g de TRIS (hidroximetil aminometano), 1.89 g de glucosa y 1.48 g de ácido cítrico en 100 ml de agua destilada. Se separó el plasma seminal y el precipitado celular se suspendió en un medio de dilución definitivo, cuyos componentes fueron los mismos del medio de lavado más 20% de yema de huevo y 6% de glicerol (Martínez, 2001).

Adición de Antioxidantes

Para la adición de antioxidantes en cada tratamiento se tomaron 20 ml del medio de dilución definitivo formando cuatro grupos: grupo testigo, grupo con 5 mg/ml de vitamina C, grupo con 5 mg/ml de vitamina E, y grupo C+E con 5 mg/ml de cada una de las vitaminas C y E.

Criopreservación espermática

El semen diluido fue envasado en pajillas de 0.5 ml (Bag *et al.*, 1999) y fueron selladas con perlas de cristal. La concentración por pajilla fue de 100 millones de espermatozoides (Purbey, 1995). Las pajillas, fueron previamente rotuladas con el número de semental y el tratamiento, después fueron puestas en un recipiente con agua a 37° C y enfriadas a 5° C en un tiempo aproximado de 2.5 horas (Blash *et al.*, 2000). Una vez alcanzados los 5° C, las pajillas fueron colocadas en posición horizontal y expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos a una altura aproximada de 5 cm por encima del nivel de nitrógeno. Inmediatamente después fueron sumergidas en el termo de nitrógeno líquido y almacenadas hasta su análisis (Aisen *et al.*, 2000; Córdova *et al.*, 2000).

Descongelación de las muestras

La descongelación de las pajillas se realizó en baño María a 37° C durante 15 segundos (Shing, 1995).

Análisis de la condensación de la cromatina espermática

Para analizar la condensación de la cromatina espermática se utilizó el kit (Cycle

TEST™ Plus DNA Reagent KIT. Cat. No. 340242. Becton Dickinson, S.A. San José, CA, USA), constituido por tres soluciones: A, B y C. La solución A, contiene tripsina para la degradación enzimática y digestión de membranas y el citoesqueleto celular. La solución B, contiene un inhibidor de tripsina y ribonucleasa para degradar el ARN. La solución C, contiene yoduro de propidio (IP).

Preparación de las muestras

Las muestras de semen fueron analizadas antes y después de la congelación. Para su análisis se tomaron 10 µl de semen de cada tratamiento, para obtener una concentración final de 2 millones de células espermáticas. Cada una de las muestras fue colocada en tubos de plástico y se les adicionó 2 ml del amortiguador fosfato de sodio (PBS) se mezclaron en vortex, y se centrifugaron a 300 X g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se adicionó 2 ml de la misma solución amortiguadora y fueron centrifugadas a 400 X g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Inmediatamente después se añadieron 250 µl de la solución A del kit cycle test™ plus DNA reagent; se mezclaron suavemente, dejando incubar 10 minutos a temperatura ambiente (TA), e inmediatamente después se añadieron 200 µl de la solución B. Se mezclaron suavemente y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se agregó la solución C, dejando incubar por otros 10 minutos en la oscuridad y en refrigeración a 4° C. Al cabo de este tiempo se analizaron por citometría de flujo.

Evaluación de estrés oxidativo

Para determinar el grado de estrés oxidativo, se evaluó la presencia de

malondialdehído mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA), antes y después de congelar las muestras. De cada tratamiento se tomaron 200 μ l y fueron diluidos con 600 μ l de agua destilada, (dilución 1:4) se mezclaron en vortex y se centrifugaron a 2500 rpm, posteriormente se separó el sobrenadante y el paquete celular fue desechado. Se colocaron 40 μ l del sobrenadante de cada tratamiento en tubos de ensaye de cristal con tapa de rosca, junto con 60 μ l de agua bidestilada y 1 ml de TBA al 0.375 % en ácido clorhídrico (HCl) 0.2 N. A continuación las muestras se calentaron en baño María durante 15 minutos, se dejaron enfriar y se les adicionó 500 μ l de ácido clorhídrico 0.2 N. Finalmente, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda 532 nm. Cada tratamiento se realizó por duplicado, se utilizó 1,1,3,3 tetrametoxipropano como estándar. Los resultados fueron expresados en nanomoles de malondialdehído por miligramo de proteína (nm MDA/mg de proteína) (Lowry *et al.*, 1951).

Análisis estadístico

Para la valoración del grado de oxidación de los lípidos de la membrana plasmática y el grado de condensación de la cromatina espermática, en los cuatro tratamientos empleados fueron comparados antes y después de descongelar por medio del análisis de la varianza.

3. RESULTADOS

Cuadro 2. Motilidad de los espermatozoides (%) después de descongelar el semen

Grupos			
Testigo vitaminas C+E	Con Vitamina C	Con Vitamina E	Con
40	30	60	60
45	40	50	40
45	30	60	70
40	30	50	70

Cada número corresponde al promedio de 8 eyaculados de cada macho y de cada tratamiento, y un total global de 384 pajillas analizadas.

Citometría de Flujo

El cuadro 3 muestra los valores de las lecturas con citometría de flujo antes de congelar y después de descongelar.

Cuadro 3. Resultados del análisis por medio de citometría de flujo antes de congelar y después de descongelar, expresados en medias de intensidad de fluorescencia emitida

Grupos		
	Antes de congelar	Después de descongelar
Testigo	278.46 ± 9.47	288.48 ± 10.23
Vitamina C	259.82 ± 31.24	260.32 ± 12.63
Vitamina E	293.68 ± 10.14	268.60 ± 23.26
Vitaminas C+E	272.0 ± 20.63	269.86 ± 9.86

Los valores son expresados en las medias de cada tratamiento ± S.E.M. n = 33.

Estos valores corresponden a la intensidad de fluorescencia emitido por cada tratamiento, relacionado con el yoduro de propidio que se introduce dentro de la cromatina espermática, entre mas condensada este la cromatina el valor de fluorescencia es menor; entre menos condensada este la cromatina mayor es la fluorescencia.

El análisis del grado de condensación de la cromatina espermática antes de congelar y después de descongelar mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Estrés oxidativo

Entre los grupos analizados antes de congelar no hubo diferencia estadísticamente significativa para la disminución del grado oxidativo ($P > 0.05$), lo que indica que la adición de antioxidantes no tuvo un efecto protector en los ácidos grasos de las membranas plasmáticas de los espermatozoides. Lo cual puede explicarse que acabado de colocar las vitaminas todavía no cumplían su función antioxidante. Después de descongelar las muestras si existió diferencia significativa entre el grupo testigo y la combinación de vitaminas C+E ya que estos antioxidantes si protegieron las membranas plasmáticas de los espermatozoides contra el estrés oxidativo ($P < 0.05$) ($P = 0.0395$).

4. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la adición de vitaminas C y E mejora la motilidad al descongelar ya que la motilidad en este grupo mostró diferencia con respecto al testigo, mientras que la adición por separado de cada una de las vitaminas no tuvo efecto. Lo anterior contrasta con lo reportado por Ball *et al.*, (2001b) quienes encontraron que la combinación de antioxidantes no mejora significativamente el mantenimiento de la motilidad. La adición de los antioxidantes C+E también redujo el grado de estrés oxidativo en relación al grupo testigo después de descongelar, mientras que la adición de las vitaminas en forma separada no tuvo efecto.

La citometría de flujo puede valorar múltiples características celulares de manera precisa y objetiva (Graham *et al.*, 1999; Januskauskas *et al.*, 2000) tales como las células espermáticas apoptóticas (Anzar *et al.*, 2002); viabilidad espermática (Maxwell y Jonson 1997; Catt *et al.*, 1997), función de las mitocondrias (Papaioannou *et al.*, 1997), y la estructura de la cromatina (Karabinus *et al.*, 1990; Evenson *et al.*, 1995; Sailer *et al.*, 1996; Karabinus *et al.*, 1997; Bochenek *et al.*, 2001). También se puede evaluar la condensación de la cromatina espermática y la estabilidad del núcleo (Molina *et al.*, 1995; Kenney *et al.*, 1995; Córdova *et al.*, 2002), aunque se ha observado que la estructura de la cromatina puede variar entre los individuos y entre los eyaculados (Bochenek *et al.*, 2001). La calidad de la estructura de la cromatina es un factor importante en la fecundación (Golan *et al.*, 1997).

Nuestros resultados mostraron que no hubo diferencia en la condensación de la cromatina espermática antes de congelar y después de descongelar, lo que contrasta

con lo reportado por Córdova *et al.*, (2002) quienes encontraron que el semen de porcino congelado y descongelado tuvo una menor absorción de yoduro de propidio indicando una compactación o mayor condensación de la cromatina comparado con espermatozoides frescos. La fertilidad de los machos reproductores puede relacionarse con los defectos de la cromatina provocados por un aumento en la susceptibilidad, aunque se reconoce que durante la espermatogénesis y el transporte por el epidídimo hay una condensación de la cromatina espermática (Golan *et al.*, 1996). Sin embargo, en el momento de la fecundación es necesario una descondensación, ya que alteraciones en la estructura de la cromatina se asocian con infertilidad (Molina *et al.*, 1995). El estrés oxidativo es el resultado de una super producción de ERO con una consecuente fragmentación del ADN nuclear y peroxidación lipídica de la membrana plasmática (Enciso *et al.*, 2006).

La congelación causa apoptosis de las células espermáticas, una fragmentación y una mayor condensación del DNA espermático (Anzar *et al.*, 2002). Además, la estructura de la membrana espermática sufre cambios durante el periodo de equilibrio, también en el proceso de congelación y descongelación, disminuyendo la proporción de espermatozoides vivos (Maxwell y Jonson, 1997).

Aunque una de las funciones del epidídimo es la protección de los espermatozoides contra el estrés oxidativo (Hinton *et al.*, 1995). Se han adicionado antioxidantes en el medio de dilución de semen de los machos reproductores para minimizar los daños causados por las ERO y evitar la peroxidación. Los antioxidantes que han sido probados son el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), citocromo

C (CHC), glutathion peroxidasa (GP), butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), n-propil galato (n-PG), mesilato de deferoxamina (Desferal), vitamina E, vitamina C y albúmina sérica bovina (BSA). Estos antioxidantes se han probado en semen de carnero (Maxwell y Stojanov, 1996; Upreti *et al.*, 1997), pavo (Donoghue y Donoghue, 1997), equino (Aurich *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2001b) y bovino (Foote *et al.*, 2002; Bilodeau *et al.*, 2001; Bilodeau *et al.*, 2002).

En nuestro estudio se utilizó la vitamina C y la vitamina E por separado y en combinación; antioxidantes que se encuentran intra y extra celularmente; el α -tocoferol se encuentra también en las membranas celulares (Frei, 1999). La vitamina C provee uno de los mecanismos de defensa contra las ERO (Kankofer, 2001), y puede prevenir el daño oxidativo en macromoléculas semejantes al ADN, lípidos y proteínas por una protección antioxidante en fluidos biológicos de animales y en el humano (Carr y Frei, 1999), pero no influencia el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides en almacenamiento por una reducción en el pH (Aurich *et al.*, 1997). En semen de pavo, la vitamina C no mejoró la motilidad (Donoghue y Donoghue, 1997), lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio. La suplementación de vitamina C y E como antioxidantes en el agua de bebida en conejos mejoró la calidad de semen al reducir la producción de radicales libres (Yousef *et al.*, 2003), lo que se asoció con estabilidad oxidativa del semen, relacionada con el consumo de α -tocoferol y de vitamina C (Castellini *et al.*, 2000). La vitamina E puede tener efectos adversos sobre la motilidad de los espermatozoides (Upreti *et al.*, 1997) ya que puede actuar como un antioxidante o un pro-oxidante al inhibir o facilitar la peroxidación, esta actividad pro-

oxidante del α -tocoferol es prevenida por el ascorbato que actúa como un co-antioxidante (Carr et al., 2000).

5. CONCLUSIONES

Se concluye que la adición conjunta de las vitaminas C y E como antioxidantes al semen caprino aumenta la motilidad de los espermatozoides al ser descongelados y se reduce el grado de oxidación de las membranas espermáticas, dando como resultado una mayor calidad en la conservación de los espermatozoides en estado congelado. Lo que es determinante para alcanzar una mayor fertilidad. En cambio, la adición de las vitaminas C y E como antioxidantes en el semen de macho cabrío no tiene efecto sobre el grado de la condensación de la cromatina de los espermatozoides.

6. COROLARIO

Aunque se han adicionado una cantidad considerable de antioxidantes en el semen de diferentes especies animales, el presente estudio representa la primera contribución de adicionar antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío; los resultados encontrados son satisfactorios, sin embargo, es necesario seguir investigando.

Después de la descongelación del material germinal, lo ideal hubiera sido la inseminación de las hembras con los diferentes tratamientos del semen de los machos, para tener resultados más contundentes lo cual se recomienda para estudios posteriores. Aunque cabe mencionar que debido a la gran cantidad de hembras requeridas el número fue una limitante.

Por otro lado, con la combinación de antioxidantes se obtuvieron resultados favorables lo cual es benéfico para los programas de mejoramiento genético y para mejorar la calidad del material seminal que se va a almacenar en estado congelado por tiempo indefinido y conservar sus características, como son viabilidad y motilidad, principalmente.

Con la búsqueda de la información para fundamentar esta investigación se tuvo como resultado la publicación de un artículo de revisión, cuyo título es " PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ANTIOXIDANTES EN LA PRESERVACIÓN DE SEMEN. UNA REVISIÓN " en la revista INTERCIENCIA DEC 2003, 28(12): 699-704.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective actino ram semen diluents. *Theriogenology*. 53(5):1053-1051.

Al-Abdulla A. N and 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 Muhammad, He Liwei, Buhr Mary M, Kroetsch Thomas G, Pauls Karl P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*. 66(2):354-360.

Aurich JE, Schöner U, Hoppe H, Aurich C. 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*. 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(7):1649-1652.

Ball BA, Vo AT, Baumber J. 2001a. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*. 62(4):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. *Theriogenology*. 56(4):577-589.

Ball BA, Baumber J, Sabeur K. 2002. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 58(2-4):299-300.

- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.* 63(5):1531-1537.
- 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(6):895-902.
- Bag Sadhan Joshil Anil, Mathur AK, Rawat PS and Mittal JP. 1999. Effect of thawing temperature on motion characteristics of frozen-Thawed ram spermatozoa. *Indian Journal of Animal Science.* 69 (1):16-18.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. 2002a. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology.* 58(2-4):301-302.
- Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78(2):547-81.
- Bera T. K. and S V Singh. 1999. Relationship between physical and biochemical constituents of crossbred buck semen. *Indian Journal Animal Science.* 69 (4): 235-236.
- Bilodeau J-F, Blanchette S, Gagnon C and Sirard M-A. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 56:275-286.
- Bilodeau Jean-Francois, Blanchette Sophie, Cormier Nathaly, Sirard Marc. André. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in yolk tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology.* 57:1105-1122.

- Blash S, Melican D, and Gavin W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*. 54: 899-905.
- Bochenek M, Smorag Z, and Pilch J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56:557-567.
- Carr Anitra and Frei Balz. 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *FASEB J*.13:1007-1024.
- Carr AC, Zhu BZ, Frei B. 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha- tocopherol (vitamin E). *Circ Res*. 87(5):349-354.
- Castellini C, Lattaioli P, Bernardini M, Dal Bosco A. 2000. Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5°C. *Theriogenology*. 54:523-533.
- Catt SL, O'Brien JK, Maxwell WMC and Evans G. 1997. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod Dom Anim*. 32:251-258.
- Córdova Alejandro, Pérez-Gutiérrez José Félix, Lleó Belém, García-Artiga Carlos, Alvarez Alberto, Drobchak Volodymyr, Martín-Rillo Santiago. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* . 57:2119-2128.
- Das KK and Rajkonwar CK. 1996. Acrosomal changes of buck spermatozoa at different stages of freezing with maltose egg yolk glycerol extender. *Indian J. Anim. Hlth*. 35(2):175-178.
- Donoghue AM, Donoghue DJ. 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci*. 76(10):1440-1445.

Douard V, Hermier D, Blesbois E. 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biol Reprod.* 63(5):1450-1456.

Enciso Maria, Muriel Lourdes, Fernández José Luis, Goyanes Vicente, Segrelles Enrique, Marcos Mercedes, Montejo Juan Manuel, Ardoy Manolo, Pacheco Alberto and Gosálvez Jaime. 2006. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion Test. *Journal of Andrology*, 27(1):106–111

Evenson Donald, Jost Lorna, Gandour Donna, Rhodes Lori, Stanton Barbara, Clausen Ole Petter, De Angelis Paula, Coico Richard, Daley Andrew, Becker Kevin, and Yopp Tim. 1995. Comparative sperm chromatin structure assay measurements on epiillumination and orthogonal axes flow cytometers. *Cytometry.* 19:295-303.

Foote Robert H, Brockett Charles C, Kaproth Michael T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Rep Sci.* 71:13-23.

Frei B. 1999. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J.* 13(9):963-964.

Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y and Lewin LM. 1997. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using Acridine orange staining. *Molecular human Reproduction.* 3(1):47-54.

Golan R, Cooper TG, Oschry Y, Oberpenning F, Schulze L, and Lewin LM. 1996. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Human reproduction* 11(7):1457-1462.

Graham JK, Kunze E, and Hammerstedt RH. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol of Reprod.* 43:55-64.

- Hernández-Alvarado S, Guzmán-Grenfell AM, y Hicks JJ. 1995. Especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide. *Rev Ginecol Obstet. México*. 63:50-54.
- Hicks JJ. And Medina-Navarro R. 1995. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. *Arch Med Res*. 26:169-172.
- Hicks JJ. 2001. *Bioquímica*. McGraw-Hill: México. P 900.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC. 1995. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 7(4):731-745.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 62(1-3):3-22.
- Januskauskas A, Johannisson A and Rodriguez-Martinez H. 2000. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*. 55:947-961.
- Kankofer M. 2001. Non-enzymatic antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine-retained and not-retained placenta: vitamin C and Glutathione. *Rep Dom Anim*. 36:203-206.
- Karabinus DS, Evenson DP, Jost LK and Baer RK. 1990. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci*. 73(9):2364-2371.
- Karabinus David S, Vogler Cherly J, Saacke Richard G and Evenson Donald P. 1997. Chromatin structure changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *Journal of Andrology*. 18(5):549-555.
- Kenney Robert M, Evenson Donald P, Garcia Marolo C and Love Charles C. 1995. Relationship between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. *Biol Reprod Mono*. 1:647-653.

- Kutty C Ibraheem and Mathew Stephan. 1999. Effectiveness of modified milavanov's test to assess the spermatozoan resistance and its seasonal variations. *Indian J Anim Res.* 33(2):111-114.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 62(1-3):113-141.
- Limaye LS. 1997. Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. *Stem Cells.* 15(5):353-358.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. 2002. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl.* 23(3):400-409.
- Maxwell WM, Stojanov T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev.* 8(6):1013-1020.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology.* 48(2):209-219.
- May JM. 1999. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J.* 13(9):995-1006.
- Medina-Navarro R, Lifshitz A, Wachter N, and Hicks JJ. 1997. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxitox after four months of exposure to air pollutants. *Arch Med.* 28:205-208.
- Miller III ER, MD, Appel LJ, Risby TH. 1998. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation.* 98(22):2390-2395.
- Molina Jorge, Castilla Jose Antonio, Gil Teresa, Hortas Maria Luisa, Vergara Francisco and Herruzo Alfonso. 1995. Influence of incubation on the chromatin condensation and

nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Human Reproduction*. 10(5):1280-1286.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas JA, Alvarez 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(9):1912-1921.

Papaioannou KZ, Murphy RP, Monks RS, Hynes N, Ryan MP, Boland MP and Roche JF. 1997. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology*. 48(2):299-312.

Pellicer-Rubio Maria-Teresa, Thierry Magallon, and Yves Combarnous. 1997. Deterioration of Goat Sperm Viability in Milk Extenders Is Due to a Bulbourethral 60-Kilodalton Glycoprotein with Triglyceride Lipase Activity. *Biology of Reproduction*. 57, 1023-1031

Poovala VS, Huang H, Salahudeen AK. 1999. Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 10(8):1746-1752.

Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vazquez JM, Martinez E. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25(1):147-153.

Sailer Brian L, Jost Lorna K, and Evenson Donald P. 1996. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*. 24:167-173.

Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 62(1-3):77-111.

- Sansone G, Nastri MJ, Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim Reprod Sci 62(1-3):55-76.
- Shamsuddin M, Y Amiri and MMU Bhuiyan. 2000. Characteristics of Buck Semen with Regard to ejaculate Numbers, Collection intervals, Diluents and Preservation Periods. Reproduction in Domestic Animal. 35(2):53-57
- Shing MP, Sinha AK and Shing BK. 1995 Effect of cryoprotectantson certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. Theriogenology. 43(6):1047-1053.
- 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(8):2312-22.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 279(6):L1005-L1028.
- 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(2-4):269-278.
- Wang XL, Rainwater DL, VandeBerg JF, Mitchell BD, Mahaney MC. 2001. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21(7):1190-1195.
- Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Ani Rep Sci. 76:99111.
- Yves C. 2000. Free radicals are in fact potent oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr (suppl). 71:621S–629S.

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 Guérin, 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 oxígeno, 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 interaccionar 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; Poova *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 (Stradaioli 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

substancia 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 O_2 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 hidroxiperoxido 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 H_2O_2 . 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 (Fouché-court *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 O_2 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 O_2 , H_2O_2 , 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 -tocopherol 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 -tocopherol, 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 -tocopherol 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 -tocopherol 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 soja 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 J, Feher M, Pastori M, Ricciarelli P, 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^{FL}. *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, Sabour 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, Muñoz-Blanco T, Cebrián-Pérez JA (2000) Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63: 1531-1537.
- Battellier 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, Sabour 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: 2200-2205.
- 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, Gozzelino 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, Rath R, Brouwers JF, Stout TAE, Colenbrander B (2001) Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249-265.

- Girrotti 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 lipid peroxidation. *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, Ishizuka 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.
- Lebneuf 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.
- Müller 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.
- Stradaolli 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, Ruiz 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, Mahlet 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.