



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Efecto antioxidante del glutati3n aplicado en el  
medio de descongelaci3n seminal de tres especies  
con inter3s pecuario

**D. David Gumbao Baño**

2015

Si caminas solo irás más rápido;  
Pero si caminas acompañado llegarás más lejos

---

Proverbio chino

---

## AGRADECIMIENTOS

Así es.

Tal y como dice este proverbio, si he conseguido llegar hasta aquí después de tanto tiempo, es porque no he viajado solo. En el camino, han sido muchas las personas que me acompañaron y a las que debo estar profundamente agradecido.

En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Joaquín Gadea, que confió en mí y me apadrinó desde el principio de los principios, sin compromiso alguno, tan solo el de compartir conmigo la aventura de aprender a saber. Gracias por compartir tus conocimientos, por tu apoyo constante y por tratarme siempre de la mejor manera. Gracias Quino.

A mis profesores y compañeros del GRUPO de fisiología de la reproducción. Y digo grupo con mayúsculas, porque es un enorme orgullo haber podido pertenecer a un equipo tan comprometido con la siempre difícil tarea de investigar y enseñar con escasez de recursos. Haber podido aportar mi granito de arena es una enorme satisfacción. A los profesores Salvador Ruíz, Pilar Coy, Carmen Matás, Raquel Romar; muchas gracias por vuestros conocimientos y vuestra amistad.

A Sole y Juan por vuestra simpatía, cariño y ayuda en la ingrata labor de aguantar al investigador, siempre insatisfecho.

A mis compañeros y amigos, Empar, Diana Patricia, José Guillermo, Luis César, Sebastián, Aitor; gracias por vuestro apoyo y amistad, por hacer tan inolvidables esos días en el laboratorio. Pero en especial, a Fran, Manolo, Luisito, Juan Carlos y Juan Antonio, porque buena parte de los preciosos recuerdos que quedarán en mí para siempre os los debo a vosotros. Amigos míos, os echo de menos.

Igualmente, tengo que agradecer a los profesores del departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina por su acogida y por la atención prestada, por sus conocimientos y por darme la oportunidad de compartirlos. A los profesores José Ballesta, José Ángel Martínez, Adelina Zuasti, Juan Francisco Madrid, María Jiménez y María Teresa Castell.

Y agradecer, en especial, al profesor Manolo Avilés, por tus enseñanzas, apoyo infatigable y amistad. Pocas personas tan apasionadas por la investigación conoceré en mi vida. Gracias Manolo.

A las chicas del laboratorio, María José, Mari Carmen y Emma; que buenas risas y algún desaguisado que otro liamos.

A todos y cada uno de los sinvergüenzas que forman parte del grupo VS, porque pese a la distancia y el tiempo, hay sentimientos y experiencias imborrables. Aunque a veces a uno le puedan costar la salud y puede que algo más; sois muy grandes.

A los de siempre, los de toda la vida, Dani, Manuel, Valen, Paco, Joaquín, Alberto, Juan; gracias por vuestra amistad.

A Lorena por tu cariño y tu amistad, porque a pesar de la distancia no te olvidamos.

A mis compañeros de trabajo de IVI Murcia por su apoyo, su amistad y aguantarme en los buenos y malos momentos. Y en especial a mis chicas del FIV, un regalo que no me merezco. Gracias por vuestro cariño, por los buenos momentos que pasamos juntos y los que quedan por venir, ya sabéis lo mucho que os quiero.

A Emilio Gómez y José Landeras por darme la oportunidad de trabajar con ese grupo de personas maravillosas con las que me siento tan afortunado de compartir el día a día.

A Antonio y Sensi por vuestro constante apoyo y participación en este trabajo. Gracias por tratarme siempre con tanto cariño.

A mis padres y mi hermano por estar siempre que os necesito y quererme como lo hacéis.

A María, por tu apoyo, paciencia y amor durante todos estos años de felicidad. Por ser la persona sin la que nada tendría sentido, mi faro.

# *I*NDICE

---

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
---------------------	----------

<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
----------------------	-----------

---

<b>I.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
--	-----------

1.1 Estrés oxidativo.....	15
---------------------------	----

1.2 Radicales libres.....	17
---------------------------	----

1.3 Antioxidantes .....	27
-------------------------	----

1.4 Estrés oxidativo en la reproducción.....	33
--	----

1.5 Estrés oxidativo en el espermatozoide .....	34
---	----

1.6 Medida de estrés oxidativo y capacidad antioxidante .....	45
---	----

1.7 Estrés oxidativo en procesos de criopreservación .....	48
--	----

1.8 Uso de antioxidantes in vitro .....	50
---	----

1.9 Importancia de la criopreservación espermática en la producción animal.....	55
---	----

1.10 Importancia de la criopreservación espermática en la preservación de especies .....	57
--	----

---

<b>II.-MATERIAL y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
-------------------------------------	-----------

2.1 Diseño experimental.....	60
------------------------------	----

2.2 Descripción del material biológico.....	61
---	----

2.3 Análisis microscópico de los parámetros seminales.....	62
--	----

2.4 Análisis mediante citometría de flujo .....	63
---	----

2.5 Test de fecundación in Vitro .....	69
--	----

2.6 Análisis estadístico .....	72
--------------------------------	----

---

<b>III.- RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
-------------------------------	-----------

3.1 Efecto de la adición de glutatión sobre la movilidad espermática .....	74
--	----

3.2	Efecto de la adición de glutatión en la viabilidad y el desorden lipídico de la membrana espermática.....	74
3.3	Efecto de la adición de glutatión sobre la viabilidad y el estado del acrosoma .....	75
3.4	Efecto de la adición de glutatión en la generación de ERO .....	75
3.5	Efecto de la adición glutatión en la presencia de grupos sulfhidrilo en las proteínas de la membrana espermática .....	76
3.6	Efecto de la adición de GSH en la integridad del ADN espermático y en la condensación de la cromatina .....	76
3.7	Efecto de la adición GSH en la capacidad de penetración y fecundación in vitro .....	77
<hr/>		
<b>IV.-</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>78</b>
<hr/>		
<b>V.-</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>90</b>
<hr/>		
<b>VI.-</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>92</b>
<hr/>		
<b>VII.-</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>

# *R*ESUMEN

---



El uso de muestras seminales criopreservadas es muy habitual en la reproducción asistida humana y de animales con interés en ganadería, así como en la conservación de razas y especies en peligro de extinción. Sin embargo, la congelación y descongelación de muestras seminales implica alteraciones en la membrana y en el ADN del espermatozoide, procesos de apoptosis y modificaciones asociadas al estrés oxidativo (Polge y Jakobsen, 1959; Pursel y Johnson, 1975; Holt, 2000; Thomson et al. 2009).

Los espermatozoides y las células del sistema reproductor masculino presentan sistemas de defensa frente a los radicales libres (Sies, 1993). En este contexto, el glutatión es uno de los antioxidantes más ubicuos e importantes en los sistemas biológicos (Gadea et al., 2005). Sin embargo, en ocasiones tiene lugar una producción excesiva de radicales libres, un detrimento en la capacidad total antioxidante o ambas situaciones a la vez. Esta circunstancia implica un desbalance denominado “estrés oxidativo” (Sies y Cadenas, 1985).

La adición de antioxidantes a los medios de congelación y descongelación seminal es una alternativa frente al estrés oxidativo (Agarwal et al, 2013).

El objetivo principal de esta Tesis fue evaluar el efecto antioxidante del GSH aplicado al medio de descongelación, sobre muestras seminales procedentes de tres especies de mamíferos con importancia en ganadería (porcina, bovina y caprina).

En el primer trabajo (Experiencia 1) se evaluó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de GSH (1 mM y 5 mM) al medio de descongelación de semen porcino. Las técnicas aplicadas incluyeron el análisis computarizado de imagen (CASA), citometría de flujo y ensayos de fecundación in vitro. En los resultados se observó una reducción en el número de espermatozoides viables capacitados, el número de espermatozoides con cambios en los grupos sulfhidrilo de sus proteínas de membrana, la producción de ERO y la condensación de la cromatina. Se obtuvo un incremento en el número de ovocitos penetrados y en la proporción de cabezas espermáticas descondensadas. Sin embargo, no se evidenció cambio alguno en los parámetros de movilidad evaluados con CASA.

En el segundo trabajo (Experiencia 2), desarrollado en bovino, se realizaron ensayos similares a los de la experiencia 1 y se incluyeron nuevos análisis centrados en el estudio del ADN espermático, mediante las técnicas de TUNEL y SCSA. Además, se evaluaron los resultados de las técnicas de fecundación in vitro y desarrollo embrionario. La adición de GSH supuso un incremento en el número de espermatozoides viables no capacitados, en el porcentaje de penetración y desarrollo embrionario in vitro. Se obtuvo un descenso en la

producción de ERO y la fragmentación del ADN. No se observó mejoría en los parámetros de movilidad (CASA) y de reacción acrosómica.

El último trabajo (Experiencia 3) tuvo lugar en caprino y fue diseñado con el objetivo de saber si la presencia de la forma reducida (GSH) y/o oxidada del glutatión (GSSG) en el medio de descongelación tenía algún efecto sobre la funcionalidad espermática. Los ensayos incluyeron la valoración por CASA y citometría de flujo. La adición de GSH supuso un incremento en la movilidad y viabilidad espermática, el número de espermatozoides viables no capacitados y con membrana acrosomal intacta. Se observó una reducción en la producción de ERO y la condensación de la cromatina. A diferencia de lo ocurrido con GSH, la adición de GSSG no reveló efecto alguno sobre los parámetros seminales evaluados.

Estos trabajos demuestran que la adición de GSH al medio de descongelación seminal mejora los parámetros seminales y la fertilidad de las muestras.

# SUMMARY

---

Sperm cryopreservation is widely used in assisted reproduction procedures in humans and in animals, such as domestic livestock and endangered species. Although being the most effective method for the maintenance of seminal samples on a long term, cryopreservation has a negative effect on semen quality and fertility (Aitken et al., 2004), because of the temperature drops and osmotic changes (Polge & Jakobsen, 1959). In addition to changes in the plasma membrane and in DNA of spermatozoa. (Pursel & Johnson, 1975; Holt, 2000).

The spermatozoa and other masculine reproductive cells have different defense systems against free radicals, including antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses (Sies, 1993).

In some conditions, an excess on the production of free radicals, a diminished antioxidant capacity or both situations can lead to an imbalanced condition called "oxidative stress" (Sies & Cadenas, 1985).

Supplementation of antioxidants in the freezing and thawing media is an alternative against oxidative stress (Agarwal et al, 2013) In this sense, glutathione is one of the most ubiquitous and important antioxidants in the biological systems. (Gadea et al., 2005).

The main aim of this thesis was to evaluate the antioxidant effect of GSH when added to the thawing solution in seminal samples from three species with importance in livestock.

In the first study (Experiment 1) it was evaluated the addition of 3 different concentrations of GSH (1 mM and 5 mM) to the thawing solution of boar semen, with an incubation time of 0 and 30 minutes. The techniques used were computer assisted sperm analysis CASA, flow cytometry and in vitro assays. The results obtained support the hypothesis, the presence of GSH had a protective effect in some of the seminal parameters studied. It was observed a reduction in the number of capacitated viable spermatozoa, in the number of sperm with changes in sulfhydryl group content in membrane proteins, in the ERO production as well as the chromatin condensation. An increase on the number of penetrated oocytes and decondensed sperm heads was also noted. Nevertheless, there was no evidence of any change in the motility scores recorded by CASA.

The second study (Experiment 2), conducted on bovine, includes apart from the studies developed on experiment 1 new analysis on sperm DNA, by TUNEL and SCSA techniques. Furthermore, it was evaluated the results of the in vitro techniques and the embryo development in presence of GSH in the thawing solution. The collected data from Experiment

2 showed concordance with the results from Experiment 1. With the addition GSH in the thawing solution, it was observed an increase in non-capacitated viable spermatozoa, in the percentage of penetration and in vitro development. ERO production and DNA fragmentation values were reduced. No changes were observed on sperm motility (CASA) o presence of spontaneous acrosome reaction.

The third study (Experiment 3) on caprine, was designed with the propose of knowing if the presence of GSH 1 mM and 5 mM or GSSG 2.5 mM in the thawing media has any effect on sperm motility and sperm functionality. This assay included CASA evaluation and flow cytometry. In this case, the samples were incubated 30 and 60 minutes. The collected results demonstrated and increase on motility and sperm viability, in the number of non- capacitated viable spermatozoa and spermatozoa with acrosome membrane untouched. A reduction on the ERO production and on the condensation of chromatin was also observed. Opposite to GSH, the addition of GSSG did not show any effect on the evaluated seminal parameters independent to the exposure time.

These studies demonstrate that the addition of GSH to the thawing media improves seminal parameters and fertility on the samples studied.

1.

---

*R*EVISIÓN

*B*IBLIOGRÁFICA

---

## 1.1

### Estrés oxidativo

Entender el concepto de estrés oxidativo no sería posible si no fuésemos capaces de imaginar la existencia de un escenario aerobio, en el que las células y su entorno establecen un balance entre la producción de radicales libres y la de aquellas herramientas implicadas en compensar una producción excesiva de los mismos, bloqueando o reparando cualquier efecto perjudicial que pudiera comprometer el rendimiento global de los procesos biológicos (Miquel, 1991; de Lamirande, 1995; Harman, 2003). Dentro de este escenario, el estrés oxidativo haría referencia al resultado del desequilibrio creado en ese balance fisiológico, producto de un incremento excesivo de los radicales libres, de una incapacidad del sistema compensador o de ambos sucesos a la vez (Sies y Cadenas, 1985).

Algunos autores han interpretado estos sistemas desde un punto de vista evolutivo, imaginando cómo los organismos celulares, en su evolución hacia un sistema de respiración aerobio energéticamente más eficiente, tuvieron que generar un complejo sistema antioxidante para hacer frente a la formación de subproductos altamente reactivos; dando origen a multitud de moléculas e iones destinadas a establecer un “equilibrio redox” que garantizase el desarrollo sostenible de la vida en nuevos entornos biológicos, donde la presencia de estos fenómenos nocivos actuaría de herramienta de selección evolutiva (Freeman y Grapo 1982). En algunos casos, incluso podría estar asociado a un mecanismo de competencia, desarrollado por algunas células con el fin de eliminar a otras de su mismo entorno (Miquel, 1991; Harman, 2003).

Para entender la importancia y peculiaridad de este sistema, algunos autores defienden la existencia de una “paradoja del oxígeno”, por la que en la misma manera que el oxígeno representa la base de la vida aerobia (Sies, 1993; 2003; Miquel, 1998; Harman), también es responsable de gran cantidad de procesos degenerativos, entre los que se encuentran el envejecimiento, el cáncer, enfermedades como el Parkinson o la artritis reumatoide, la infertilidad, etc. (Gerschman, 1954; Martínez-Cayuela, 1995; Agarwal et al., 2006)

En la mayor parte de los casos, el estrés oxidativo se encuentra asociado a un efecto negativo sobre todo tipo de moléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) y procesos biológicos como la mutagénesis, carcinogénesis, daños de membrana celular, peroxidación lipídica, oxidación proteica, fragmentación del ADN o metabolismo de carbohidratos (Sies y Cadenas, 1985; Agarwal et al., 2006). No obstante, pequeñas concentraciones, bien

controladas, de radicales libres resultarían de gran importancia para el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos (Baker y Aitken 2004; Sanocka y Kurpisz 2004).

El origen de este fenómeno reside fundamentalmente en la formación de los denominados radicales libres, que pueden derivar de la respiración celular en presencia de oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN). Si bien, en este trabajo nos centraremos en los primeros, dada su especial relevancia.



---

## 1.2

### Radicales libres

Formalmente, se puede definir un radical libre como aquella molécula o átomo capaz de existir independientemente en un estado temporal de desequilibrio electrónico (Pryor, 1976). El término radical libre incluye una serie de especies químicas que se producen de forma independiente y en bajas concentraciones, resultado de diferentes procesos físico-químicos (Pryor et al., 1986).

En todos los sistemas biológicos aerobios tienen lugar reacciones en las que participan los radicales libres, capaces de convertirse en moléculas altamente inestables, gracias a su posibilidad de ganar o perder electrones, actuando directamente, o bien participando como precursores o elementos necesarios del propio sistema (Pryor et al., 1986; Halliwell y Gutteridge, 1989; Martín-Romero y Álvarez, 2008).

Su presencia fue descrita a partir de los estudios encaminados a dar explicación a ciertos fenómenos de toxicidad celular, producidos de forma inexplicable tras la exposición a grandes cantidades de oxígeno (Loew, 1902; Malcolm, 1925), especialmente evidente en el tejido nervioso (Gray y Scott, 1964). Se supo entonces que un elemento o molécula química puede convertirse en radical libre o pro-oxidante, adquiriendo ese estado reactivo que le obliga a interactuar con otros radicales libres o moléculas de diferente naturaleza que se encuentran formando parte de membranas u otro tipo de estructuras funcionales (Beckman y Ames, 1998).

Existen radicales libres de diverso origen, pero debido a su importancia para los sistemas biológicos cabe destacar aquellos derivados del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) (Martín-Romero y Álvarez 2008). Las ERO, pese a su baja concentración y tiempo de vida media, son los responsables de la mayor parte de los daños ocasionados en células y tejidos (Freeman y Grapo 1982; Harman, 2003).

#### Origen de los radicales libres.

Los radicales libres se pueden originar por la propia rotura de enlaces covalentes en las moléculas (fisión homolítica), de manera que cada electrón de la pareja compartida queda desapareado en un átomo. Debido a la energía necesaria para desaparecer electrones, las vías de adquisición o pérdida de electrones tienen lugar a través de mecanismos enzimáticos y no

enzimáticos, entre las que se incluyen reacciones redox, autoxidación o transferencia de electrones. La mayor parte de los compuestos se activan por vías catalizadas enzimáticamente e iones metálicos de transición, por ejemplo, hierro o cobre (Halliwell y Gutteridge 1989).

Los radicales libres de interés biológico suelen ser muy reactivos e inestables, de manera que su periodo de vida media es muy corto y sus concentraciones en el estado estacionario son bajas (Armstrong et al., 1984; Cadenas, 1989; Pryor, 1986). Sin embargo, cuando un radical libre reacciona con otra molécula, puede dar lugar a nuevos radicales, generándose reacciones en cadena con efectos en sistemas biológicos diferentes al que originó el primer radical (Pryor 1986; Blake et al., 1987; Harman, 1992).

Este tipo de procesos generadores de radicales libres son especialmente destacables en las mitocondrias, donde existe una actividad muy elevada entorno al proceso de respiración celular (Boveris et al., 1999). Sin embargo, existen otros tipos de fenómenos exógenos, por ejemplo, los de toxicidad mediada por generación de radicales libres a partir de la acción de xenobióticos (Pryor et al., 1982), o los que tienen lugar in vitro, a partir de la acción de sistemas generadores de radicales libres tipo xantina-xantina oxidasa (Kellogg y Fridovich, 1975). Efectivamente, se ha demostrado que muchos compuestos químicos ejercen su acción tóxica sobre los sistemas biológicos a partir de su activación metabólica, generando, en el proceso, intermediarios reactivos capaces de actuar de igual forma que un radical libre (Kappus, 1986; Halliwell Gutteridge, 1989; Mason, 1982; Proctor y Reynolds, 1984).

In vitro, también existen mecanismos físicos y bioquímicos capaces de incrementar los niveles de radicales libres y de estrés oxidativo. Es el caso de ciertas radiaciones o procedimientos de laboratorio como la criopreservación, centrifugaciones, cambios de temperatura, componentes de medios de cultivo, etc. (Aitken et al., 1993; Griveau et al., 1995).

### Las mitocondrias como formadoras de radicales libres.

Las mitocondrias son la fuente fundamental de producción de energía celular en los organismos eucariotas aerobios (Boveris et al., 1999). El proceso fundamental por el que se obtiene esta energía tiene lugar a partir del consumo de oxígeno, que actúa de aceptor final en la cadena de transporte de electrones, localizada en la membrana mitocondrial interna. En este sistema, los electrones se transfieren desde los substratos del ciclo de Krebs hasta el oxígeno (Boveris et al., 1999).

La cadena de transporte de electrones es una vía final encaminada a la producción de grandes cantidades de energía (ATP), en la cual las moléculas de oxígeno terminan generando

agua a partir de la adición secuencial de cuatro electrones y cuatro protones, pero generando como subproductos una serie de moléculas parcialmente reducidas con uno, dos y tres electrones, capaces de actuar como radicales libres: el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, respectivamente; denominadas en su conjunto especies reactivas de oxígeno (ERO) (Cascales, 2008) (Figura 1).

Los átomos de hidrógeno son liberados a través de la membrana mitocondrial desde la matriz al espacio intermembrana, pasando los electrones de forma secuencial por unos transportadores anclados en la propia membrana mitocondrial interna, de manera que parte de estos electrones reaccionarán directamente con el  $O_2$  formando diferentes ERO. Por ejemplo, el radical superóxido es liberado a la matriz mitocondrial, donde quedará confinado debido a la impermeabilidad de la membrana interna (Harman, 1972; Weiss et al., 1987; Cascales, 2008) (Figura 1).

Espacio intermembrana

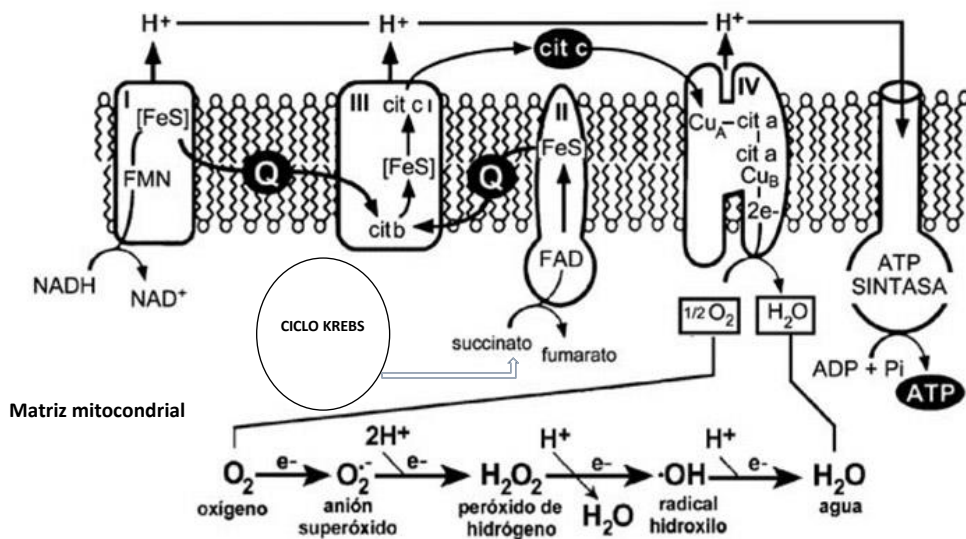


Figura 1. Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cascales, 2008)

La membrana mitocondrial interna también posee actividad enzimática óxido nítrico sintetasa, capaz de generar óxido nítrico (ON) a velocidades similares a las de la producción de anión superóxido. Este ON también se libera a la matriz mitocondrial, donde es capaz de combinarse rápidamente con  $O_2^-$  para generar el radical peroxinitrito mediante la reacción de Beckman-Padmaja (Beckman et al., 1990; Padmaja y Huie, 1993).

Esta producción primaria de ON y  $O_2^-$  en las membranas mitocondriales representa un punto de partida para la generación de más ERO y ERN, a partir de nuevas reacciones

intracelulares en cadena. De hecho, parte del  $O_2^-$  generado en la respiración oxidativa mitocondrial se transforma en peróxido de hidrógeno. Ambos productos, resultado de la reducción parcial del oxígeno, en presencia de hierro y cobre como catalizadores, van a generar a su vez radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton/Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1989), reacciones muy frecuentes en las células durante el cultivo in vitro (Agarwal et al., 1996).

El radical hidroxilo es a su vez un oxidante tremendamente reactivo, capaz de generar nuevas especies reducidas a partir de su acción sobre los átomos de hidrógeno de los carbonos alílicos, presentes en multitud de componentes celulares (Boveris et al., 1999). Además del ion superóxido, en la membrana mitocondrial externa también se forma peróxido de hidrógeno, por acción de la enzima monoamino oxidasa a partir de catecolaminas (Fnan y Cohen, 1992).

Todos estos procesos convierten a las mitocondrias en la mayor fuente de producción de ERO en condiciones fisiológicas (Figura 2), algo especialmente importante en la célula espermática, donde la actividad mitocondrial es muy elevada debido a los requisitos energéticos que precisan los espermatozoides para llevar a cabo sus funciones biológicas (Chapman et al., 1985, Agarwal et al., 2006).

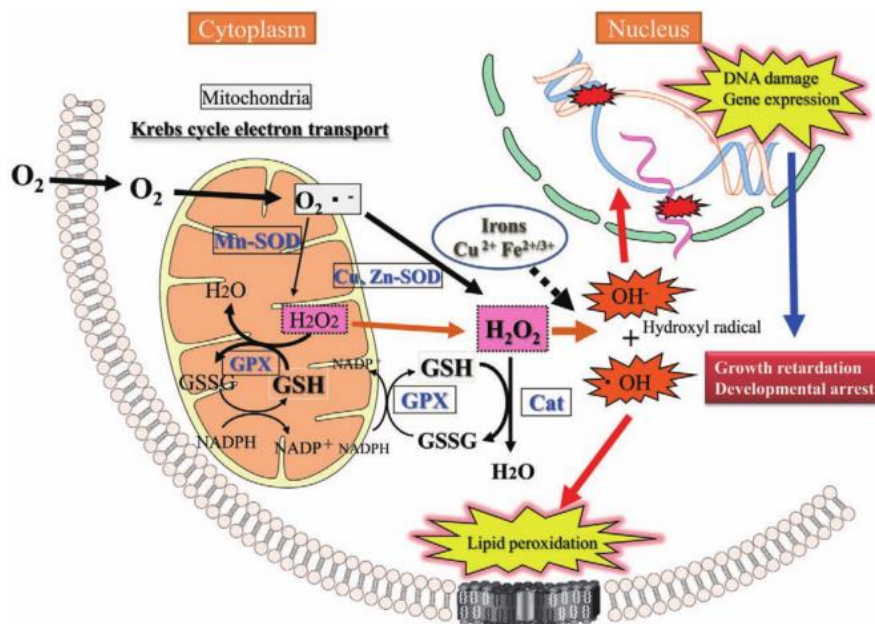
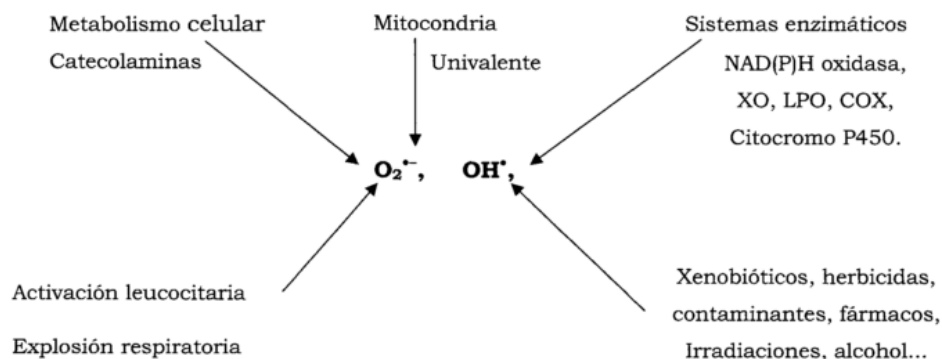


Figura 2 Papel fundamental de las mitocondrias en la producción de radicales libres (Takahashi, 2012).

La producción mitocondrial de radicales libres implica un incremento del estrés oxidativo en la célula y las propias mitocondrias. Este estrés oxidativo también representa la base de la “teoría del envejecimiento mitocondrial por acción de radicales libres”, por la cual estos orgánulos pierden su capacidad para generar ATP conforme células y tejidos envejecen (Harman, 1982). Esta teoría sostiene que, durante el envejecimiento, las mitocondrias evolucionan hacia un estado de estrés oxidativo y disfuncionalidad. Los daños oxidativos parecen ocurrir de forma selectiva en algunos componentes de la cadena de transporte de electrones y la producción de radicales libres incrementada conllevaría una pérdida de actividad, degeneración de la propia organela e incluso muerte celular (Miquel, 1980; Boveris et al., 1999).

### Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO son moléculas altamente reactivas que se forman continuamente en los sistemas biológicos, a partir de reacciones que ocurren como parte del metabolismo celular o la exposición a factores físico-químicos externos (Castillo-Paterna, 2002) (Figura 3).



**Figura 3. Principales fuentes de producción de ERO (Castillo-Paterna, 2002).**

Se emplea el término genérico de “especies reactivas de oxígeno” (ERO) para agrupar también a algunos compuestos, que al igual que el peróxido de hidrógeno, no constituyen verdaderos radicales aunque proceden de procesos en los que el oxígeno se encuentra de alguna forma implicado (Sies, 1985; Pérez Castell y Pérez de Alejo, 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ERO) (Castillo-Paterna, 2002)

<b>Nombre</b>	<b>símbolo</b>	<b>naturaleza</b>
oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	no radical
ozono	$\text{O}_3$	no radical
óxido nítrico	$\text{NO}$	radical
dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2$	radical
peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$	no radical
hidroxilo	$\text{OH}^\bullet$	radical
superóxido	$\text{O}_2^{\bullet-}$	radical
hidroperóxido	$\text{HOO}^\bullet$	radical
alcoxilo	$\text{RO}^\bullet$	radical
peroxilo	$\text{ROO}^\bullet$	radical
aciloxilo	$\text{R-COO}^\bullet$	radical
acilperoxilo	$\text{R-CO-COO}^\bullet$	radical
ariloxilo	$\text{ArO}^\bullet$	radical
arilperoxilo	$\text{ArOO}^\bullet$	radical
ácido hipocloroso	$\text{HClO}$	no radical

Debido a su ubicuidad y capacidad para reducirse finalmente a agua, el oxígeno es considerado el principal responsable de la formación de radicales libres en los sistemas biológicos. Estas formas reducidas iniciales pueden oxidarse nuevamente o combinarse a su vez, dando lugar a nuevos radicales; por ejemplo, óxido nítrico. Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular originaría una molécula de agua (Fridovich, 1983; Pryor, 1986; Cadenas, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1989) (Figura 4).

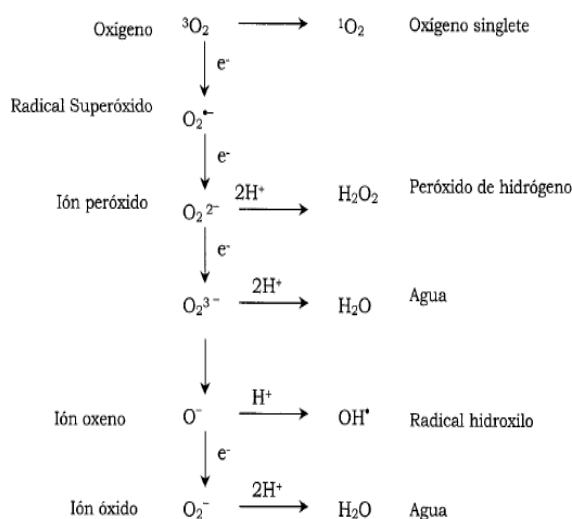


Figura 4. Reducción secuencial univalente del oxígeno en la producción de ERO (Martínez-Cayuela, 1995).

En condiciones aeróbicas, las células emplean dos vías fundamentales para metabolizar el oxígeno. Por una parte y en situaciones normales, la mayor parte del oxígeno (95%) utiliza la “vía tetravalente” que permite reducir el oxígeno a agua sin la formación de intermediarios tóxicos (Naqui et al., 1986); mientras que un pequeño porcentaje (2-5%) lo hace a través de una reducción secuencial denominada “vía univalente”, a partir de la cual se generan la mayor parte de ERO (Halliwell y Gutteridge, 1989). Sin embargo, en situaciones de mayor demanda metabólica, incrementa el oxígeno metabolizado que escapa a la reducción tetravalente y sigue la vía monovalente, aumentando la formación de ERO y el riesgo de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1989; Castillo et al., 2001).

El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) es el radical de oxígeno menos reactivo. Esta forma electrónicamente excitada del oxígeno molecular se forma en la naturaleza y los sistemas biológicos como resultado de la ganancia de un electrón mediante la acción enzimática, la fotólisis del peróxido de hidrógeno o procesos de quimioexcitación. De hecho, se emplea como biomarcador de fenómenos similares a los de peroxidación lipídica (Cadenas, 1989; Cadet et al., 1994). Pese a ser la forma menos reactiva, el oxígeno singlete es capaz de interactuar con otras moléculas provocando combinaciones moleculares o distorsiones debidas a procesos de intercambio energético.

El radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) se forma cuando una molécula de oxígeno se reduce, ganando un único electrón; entonces se convierte en una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas. Se forma en muchos procesos biológicos, sobre todo en las mitocondrias (Ritcher, 1988). Su mecanismo de acción se basa en su facilidad para intercambiar electrones en reacciones redox (McCord y Fridovich, 1969) o reaccionando con otro radical superóxido mediante reacciones de dismutación (Fridovich, 1983; Cadenas, 1989).

El  $\text{O}_2^-$  lleva a la formación de peróxido de hidrógeno tras la reducción parcial del oxígeno. Ambos productos, a su vez, son capaces de formar radiales hidroxilo a partir de su reducción en presencia de hierro (Halliwell y Gutteridge, 1989). La producción primaria de  $\text{O}_2^-$  constituye la base en la formación de otras ERO y se considera un paso clave en la regulación de su producción.

Cuando el oxígeno molecular es reducido por dos electrones, se forma el ion peróxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno. La reducción secuencial a partir de  $\text{O}_2^-$  también va a generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Pryor, 1986). No se trata de un radical como tal, ya que no presenta electrones desapareados, pero debido a su permeabilidad y a la debilidad de sus enlaces, de forma espontánea o por efecto de la luz, es capaz de alterarse y entrar a formar parte de otras reacciones con producción de otros radicales libres; por ejemplo, el radical hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El radical hidroxilo (OH) es el radical libre de oxígeno más reactivo que existe en los sistemas biológicos. Se genera fundamentalmente a partir de otros productos de reducción del oxígeno como el ion superóxido o el peróxido de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 1984). Al OH se le considera uno de los radicales libres más dañinos, puesto que son capaces de originarse con gran facilidad y difundir posteriormente de unos tejidos a otros. Donde actuaría sobre átomos de hidrógeno, de carbonos alílicos, de ácidos grasos insaturados o de bases púricas y pirimídicas, formando las especies reactivas peroxil (ROO.) y alcoxil (RO.) que constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica y el daño al ADN (Martín-Romero y Álvarez, 2008).

### Especies reactivas de nitrógeno (ERN).

El nitrógeno es uno de los elementos más ubicuos en la naturaleza, presente en gran cantidad de sistemas biológicos, especialmente aerobios. Al igual que el oxígeno, el nitrógeno es capaz de captar electrones y generar moléculas reactivas denominadas especies reactivas de nitrógeno (ERN), entre las que destacan el óxido nítrico, anión nitroxilo, catión nitroso y el peroxinitrito (Moncada et al., 1991). (Tabla 2).

**Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Sies et al., 1993).**

<b>Nombre</b>	<b>símbolo</b>	<b>naturaleza</b>
óxido nítrico	NO <sup>*</sup>	radical
dióxido de nitrógeno	NO <sub>2</sub> <sup>*</sup>	radical
ácido nitroso	HNO <sub>2</sub>	no radical
trióxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	no radical
tetraóxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	no radical
peroxinitrito	ONOO <sup>-</sup>	radical
alquil-peroxinitritos	LOONO	no radical

El óxido nítrico es una molécula de pequeño tamaño, sintetizada por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa. Su naturaleza lipofílica le permite difundir con gran facilidad la membrana de células adyacentes, mediando en el mecanismo de señalización celular (Moncada et al., 1991). El óxido nítrico se caracteriza por su citotoxicidad a nivel de la cadena respiratoria, bloqueando la síntesis de ATP mitocondrial (Clementi et al., 1998) o bien



inhibiendo a la enzima glutatión peroxidasa, implicada en procesos de antioxidación (Asahi et al., 1995). Además de ser precursor de otras ERN (Stamleer et al., 1992).

El peroxinitrito se forma a partir de la combinación del óxido nítrico con el anión superóxido, convirtiéndose en una molécula capaz de interaccionar con gran cantidad de moléculas cuando a partir de ella se genera radical hidroxilo. (Beckman et al., 1990)

Dentro del proceso de formación de ERN, cabe destacar el papel de la enzima óxido nítrico sintasa, de la cual se conocen hasta tres isoformas funcionales, incluidas las mitocondriales (iNOS, nNOS, eNOS). Estas isoformas se encuentran presentes en diversidad de tejidos y células, entre ellas las que participan en procesos fisiológicos reproductivos: espermatozoides, ovocitos y embriones (Palmer et al., 1988; Martín-Romero y Álvarez, 2008).

### Reactividad de las ERO.

Los radicales libres son especies químicas muy reactivas e inestables, capaces de formar otros radicales libres a su vez, o bien combinarse con otras moléculas radicales y no radicales para terminar por causar multitud de efectos biológicos (Halliwell y Gutteridge, 1984). Además, puesto que las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos son parte de su diana de acción, sus efectos en los sistemas biológicos van a resultar tremendamente diversos.

Debido a su naturaleza bioquímica, los lípidos van a ser la familia de macromoléculas más afectadas por la acción de ERO. Los radicales libres hidroxilo, hidroperoxilo y oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Halliwell y Gutteridge, 1984). La peroxidación lipídica es el mecanismo principal por el cual las ERO atacan las membranas celulares, especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). También, algunos de los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originan generando nuevos efectos adversos de permeabilidad vascular, inflamación, quimiotaxis, etc. (Blake et al., 1987; Pryor y Church, 1991). El malondialdehído, empleado también como indicador de peroxidación (Miller et al., 1998), puede causar nuevos entrecruzamientos y polimerización en las membranas celulares (Nielsen, 1981; Valenzuela, 1991).

La acción de radicales libres está asociada a la pérdida en la estructura y actividad de proteínas y enzimas (Comporti, 1989). Los enlaces peptídicos son susceptibles de ser atacados por radicales libres a través de la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o

superóxido (Wolff y Dean, 1986) o por modificaciones de enlaces disulfuro en proteínas con un contenido alto de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína; provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación (Freeman y Grapo, 1982; Webster y Nunn, 1988). En muchas ocasiones, la pérdida de actividad enzimática se produce por el ataque a los propios ligandos metálicos o los centros activos del enzima; es el caso de algunas metaloproteínas, como el hierro de la oxihemoglobina o el cobre de la superóxido dismutasa (Hodgson y Fridovich, 1975). Al igual que sucede en los lípidos, el resultado de la acción de ERO puede conllevar una amplificación de su acción a partir de otros subproductos (Freeman y Grapo, 1982).

En los ácidos nucleicos, la acción de radicales libres, especialmente el OH, provoca alteraciones estructurales, resultado del ataque a las bases y los azúcares que conforman las propias moléculas (Demple y Linn, 1982; Harman, 1992). Entre las consecuencias de la acción de radicales libres sobre el ADN o ARN se encuentran las modificaciones en las bases, errores de lectura, oxidación de bases nitrogenadas, fragmentaciones e incluso roturas más o menos mutagénicas (Agarwal et al., 2006). Parte de estas alteraciones pueden ser corregidas siempre y cuando la célula cuente con las herramientas para ello y el daño no sea demasiado grande para poder ser reparado (Hoffman et al., 1984, Cerutti, 1985; Demple, 1990).

Finalmente, los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas (Martínez-Cayuela, 1998). Por ejemplo, la glucosa, el manitol y ciertos desoxiazúcares pueden transformarse en sustancias reactivas a partir de la acción de OH (Sies, 1985). Así mismo, ciertos polisacáridos también pueden verse fragmentados en unidades más sencillas (Greenwald y Moy, 1980).

A pesar de que los radicales libres resultan especies muy reactivas, las células y tejidos poseen sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, basados fundamentalmente en la acción de diferentes mecanismos antioxidantes (Sies et al., 1993).

---

## 1.3

### Antioxidantes

Siguiendo la definición aportada por Halliwell y Gutteridge, un antioxidante podría ser cualquier especie molecular que en presencia de concentraciones superiores de un sustrato oxidable, reduciría o inhibiría la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

En su camino hacia una vida en presencia de oxígeno, células y tejidos se han visto obligados a desarrollar, en el transcurso de la evolución, una serie de moléculas y sistemas, con el fin de conformar una defensa efectiva frente al estrés oxidativo. Estos sistemas pueden tener carácter preventivo, proactivo o reparador, con un papel destacado en todos los casos para los antioxidantes y especialmente eficaz en los organismos multicelulares (Ma y Eaton, 1992).

Entre los mecanismos antioxidantes, las células presentan cierta capacidad de prevención frente a la formación de especies reactivas, basada en los mecanismos de acción que tienen algunas de las enzimas generadoras de radicales libres, por ejemplo, la citocromo oxidasa que precisa de iones hierro o cobre; o la enzima ribonucleótido reductasa, con una conformación determinada de su centro de acción (Reichard y Ehrenberg, 1983). De esta manera, una buena estrategia de prevención podría ser la presencia de agentes quelantes tipo ferritina o transferrina; o el cambio de conformación del sustrato objetivo, como sucede en lipoproteínas de baja densidad mediante la acción del dehidroascorbato (Sies, 1993). Sin embargo, los antioxidantes van a tener un carácter fundamentalmente proactivo, bien interfiriendo, directa o indirectamente, la acción de los agentes prooxidantes, dando lugar a productos finales de acción menor o totalmente inocua que la del producto original, o bien actuando sobre su mecanismo de acción (Halliwell y Gutteridge, 1989).

En este sentido, atendiendo a su naturaleza y mecanismo de acción, podemos hablar de dos grandes grupos de antioxidantes: no enzimáticos y enzimáticos (Figura 5).

Non-enzymic	
$\alpha$ -tocopherol (vitamin E)	radical chain-breaking
$\beta$ -carotene	singlet oxygen quencher
lycopene	singlet oxygen quencher
ubiquinol-10	radical scavenger
ascorbate (vitamin C)	diverse antioxidant functions
glutathione (GSH)	diverse antioxidant functions
urate	radical scavenger
bilirubin	plasma antioxidant
flavonoids	plant antioxidants (rutin, etc.)
plasma proteins	metal binding, e.g. ceruloplasmin
chemical	food additives, drugs (see text)
Enzymic (direct)	
superoxide dismutases	CuZn enzyme, Mn enzyme, Fe enzyme
GSH peroxidases	see enzymes (GPx, PHGPx) selenium as enzyme mimic
catalase	heme protein, peroxisomes
Enzymatic (ancillary enzymes)	
conjugation enzymes	glutathione-S-transferases UDP-glucuronosyl-transferases
NADPH-quinone oxidoreductase	two-electron reduction
GSSG reductase	maintaining GSH levels
NADPH supply	NADPH for GSSG reductase
transport systems	GSSG export thioether (S-conjugate) export
repair systems	DNA repair systems

Figura 5. Antioxidantes más conocidos según su naturaleza (Sies et al., 1993).

### Antioxidantes no enzimáticos.

Debido a su naturaleza inestable, los radicales libres presentan una tendencia a generar reacciones en cadena entre moléculas que van perdiendo y ganando electrones continuamente. De manera que, si un antioxidante es capaz de interferir la generación de productos libres de radicales oxidativos o bien un producto capaz de ser transportado a un ambiente menos sensible, éste podría desactivar la acción prooxidante de una forma eficaz (Sies, 1993). Es el caso de los antioxidantes no enzimáticos, capaces de interceptar (scavengers) radicales libres además de transportar de forma muy eficiente los equivalentes de oxidación de ambientes hidrofóbicos a otros acuosos; por ejemplo, desde la membrana plasmática celular al citosol o desde lipoproteínas del propio plasma sanguíneo a su fase acuosa (Sies y Cadenas, 1985). De esta manera, un buen antioxidante no enzimático sería aquel con una gran capacidad de intercepción y posterior detoxificación, como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), ácido úrico, piruvato, albúmina, carnitina, taurina, hipotaurina, transferrina, ceruloplasmina o glutatión. (Fingerova et al., 2007; Tremellen, 2008).

### Antioxidantes enzimáticos.

Todas las células y tejidos de organismos eucariotas contienen enzimas con poder antioxidante (Chance et al., 1979). Sin embargo, en los sistemas antioxidantes celulares cabe destacar a tres enzimas fundamentales: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Proctor y Reynolds, 1984; Álvarez y Storey, 1989; Sies, 1993).

La superóxido dismutasa es una metaloenzima con diferentes isoformas de gran ubicuidad. Se trata de una enzima fundamentalmente intracelular, aunque también existe una isoforma extracelular, que debe su poder antioxidante a la capacidad de catalizar la transformación de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fisher y Kaufman, 1973; Garrido et al., 2004).

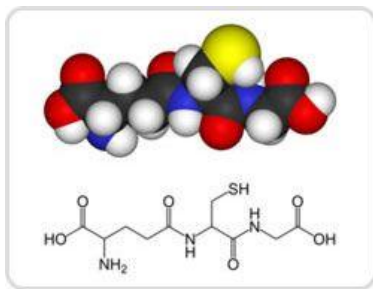
La catalasa es una enzima ampliamente distribuida, con presencia de cuatro subunidades peptídicas y un grupo hemo capaz de activar el peróxido de hidrógeno con formación de agua y oxígeno (Proctor y Reynolds, 1984; Garrido et al., 2004).

La glutatión peroxidasa (GPX) es una enzima mayoritariamente citoplasmática, especialmente localizada en mitocondrias y con la capacidad para reducir el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos libres, empleando al glutatión reducido (GSH) como sustrato. Es una enzima que muestra gran afinidad por el GSH, a través de sus 4 átomos de selenio que le confieren su poder catalítico, gracias al cual es capaz de actuar, por ejemplo, frente a la formación de peróxidos (Proctor y Reynolds, 1984). La presencia conjunta de GPX y la enzima glutatión reductasa (GR), que regenera el glutatión reducido a partir del consumo de NADPH sintetizado de forma externa, conforma un sistema de defensa antioxidante enormemente eficaz, muy empleado por células y tejidos. (Wendel, 1980; Proctor y Reynolds, 1984; Vernet et al., 2004). La eficiencia del sistema depende en gran medida de las enzimas implicadas y de sus sustratos (Álvarez y Storey, 1989; Griveau et al., 1995).

Pese al daño inducido por las especies reactivas, existen también sistemas antioxidantes con capacidad para reparar algunos de los daños generados a membranas, ADN, proteínas y otras moléculas. En el caso del ADN por ejemplo, existen sistemas de reparación constituidos por enzimas del tipo de ADN polimerasas, ligasas o endonucleasas (Sies et al., 1993).

## Glutati3n.

El glutati3n (L-γ-glutamyl-L-cisteinylglycine) es un trip3ptido no proteico constituido a partir de los amino3cidos L-ciste3na, 3cido L-glut3mico y glicina (Merck 3ndice, 2013) (Figura 6). Se caracteriza por presentar un enlace pept3dico algo inusual entre el grupo amino de la ciste3na y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato, lo que le permite contar con un grupo sulfhidrilo (tiol) libre, responsable fundamental de su actividad biol3gica (Irvine, 1996).



**Figura 6. Representaci3n y estructura del glutati3n (Merck Index, 2013).**

El glutati3n se sintetiza a partir de la acci3n de dos enzimas fundamentales, dentro de un proceso dependiente de ATP. En primer lugar, se sintetiza la γ-glutamylciste3na a partir del L-glutamato y ciste3na, por medio de la acci3n de la glutamato ciste3na ligasa, siendo esta la reacci3n limitante del proceso de bios3ntesis. Posteriormente, la enzima glutati3n sintetasa incorporar3 la glicina a la mol3cula (Chen et al., 2007; Musgrave et al., 2013).

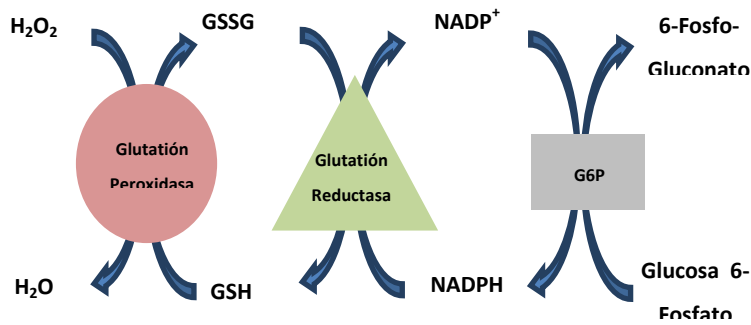
Una vez sintetizado, el glutati3n se convierte en una mol3cula capaz de actuar directamente como donante o aceptor de electrones, por lo que podemos encontrarlo en su forma oxidada (GSSG) y reducida (GSH). Aunque se estima que, gracias a la acci3n de la enzima glutati3n reductasa, el 90% del glutati3n total de c3lulas y tejidos se encuentra en forma reducida (concentraciones estimadas de 0.5-10 mmol), frente a un 10% que lo est3 en estado oxidado, a excepci3n de aquellas situaciones de estr3s oxidativo que van a provocar alteraciones en esta relaci3n (Meister y Anderson, 1983; Irvine, 1996).

El glutati3n se encuentra implicado en diversos procesos biol3gicos de s3ntesis de prote3nas, ADN, transporte de amino3cidos y funcionamiento del sistema inmune; aunque su papel fundamental es el de participar en los mecanismos de defensa celular antioxidante enzim3ticos y no enzim3ticos, interfiriendo la acci3n de agentes oxidantes, electr3filos y radicales libres (Freeman y Grapo, 1982; Meister y Anderson, 1983) (Figura 7).



**Figura 7. Procesos biológicos en los que está implicado el glutatión (Díaz, 2013).**

El glutatión es capaz de actuar de forma directa mediante conjugados no enzimáticos, o mediando con enzimas, por ejemplo, las S-transferasas en la detoxificación de agentes como los xenobióticos (Den Boer et al., 1990). Pero en los sistemas animales, el glutatión se encuentra mayoritariamente implicado en un mecanismo cíclico redox de protección oxidativa, mediado por las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa es capaz de inactivar la acción de algunas especies reactivas de oxígeno catalizando el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos libres a agua, oxidando el glutatión reducido (GSH) a su forma oxidada (GSSG) (Figura 8). Estos productos de oxidación se combinan para estabilizarse mediante la formación de disulfuros de glutatión (GSSG-GSSG). El GSH es recuperado posteriormente por la acción de la glutatión reductasa, enzima que reduce nuevamente el glutatión a partir del consumo de NADPH (Meister y Anderson, 1983) (Figura 10). Esta reacción es dependiente de la concentración de NADPH y una acumulación de GSSG en presencia de una actividad glutatión peroxidasa normal, podría deberse a un descenso en los niveles de NADPH celular (Griveau et al., 1995). Por ello, algunos autores destacan el papel de otras vías externas de regeneración de NADPH, por ejemplo, la de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, enzima capaz de generar NADPH a través de la ruta de las pentosas fosfato mediante la transformación de la glucosa-6-fosfato en fosfo-6-glucono-lactona y la producción de NADPH (Griveau et al., 1995; Irvine, 1996; Williams et al., 2004) (Figura 8).



**Figura 8. Reacciones de oxidación-reducción del glutatión.**

La capacidad de acción del sistema se encuentra fuertemente determinada por la concentración de GSH presente (Irvine, 1996). El glutatión es un componente celular fuertemente regulado y limitado en su producción mediante retroalimentación negativa, a través de la enzima gamma-glutamilcisteína sintetasa (Yang et al., 2002). Los estados de déficit de glutatión se han asociado a gran cantidad de enfermedades degenerativas, inmunológicas, hepáticas o cáncer; así como estados de malnutrición, estrés o envejecimiento (Gerschman, 1954; Balendiran et al., 2004).

Debido a su capacidad antioxidante, el GSH juega un papel defensivo muy importante en sistemas especialmente sensibles al estrés oxidativo, por ejemplo, el sistema nervioso o el reproductivo, destacando tanto en el epitelio espermático, epidídimo y eyaculado (Irvine, 1996). Una alternativa a situaciones carenciales o de estrés oxidativo celular es la suministración exógena de GSH o de precursores de su síntesis, si bien no termina de existir un consenso total acerca de la efectividad de su administración oral (Witschi et al., 1992; Kefer et al., 2009) o de su adición en el cultivo in vitro (Irvine, 1996; Gadea et al., 2005; Ko et al., 2014).



---

## 1.4

### Estrés oxidativo en la reproducción

La fisiología reproductiva en especies mamíferas presenta cada vez más evidencias de la presencia de fenómenos de estrés oxidativo, directa e indirectamente asociados con problemas de fertilidad (de Lamirande, 1997). Aunque son especialmente destacables los efectos en el espermatozoide (Aitken, 2004).

La presencia de situaciones de estrés oxidativo en células, tejidos y fluidos implicados con la función reproductiva tiene un efecto más diverso, afectando a las membranas y ADN de células germinales, gametos y embriones, comprometiendo los procesos de maduración, fertilización o desarrollo embrionario (Gardiner et al., 1995; Takahashi, 2012). En el caso de la especie humana, se calcula que aproximadamente el 15% de las parejas presenta problemas de infertilidad, unos 70 millones de parejas a nivel mundial, de las cuales se estima que un 25% se debería a un factor masculino de etiología aún no muy bien esclarecida, pero que para diversos autores se podría deber a estrés oxidativo (Boivin et al., 2007; Bushnik et al., 2012).

Además de factores fisiológicos propios, conviene señalar la influencia que tienen sobre la calidad seminal y su fertilidad algunos factores exógenos, relacionados a ciertos hábitos de vida, factores sociales, clima y medio ambiente, alimentación, condiciones de estabulación, etc. (Agarwal et al., 2008; Kefer et al. 2009; Aitken et al., 2014; Mortimer et al., 2013).

La producción de espermatozoides en los mamíferos es un proceso fisiológico que tiene lugar de forma continua a lo largo de toda la vida del individuo adulto. El proceso completo que tiene lugar en el testículo es muy variable de una especie a otra, pero suele requerir un mínimo de dos meses, 70 días en el caso de la especie humana (De Krester, 1969). Durante la espermatogénesis, las células germinales espermáticas sufren un proceso de transformación importante que las convierte en unas células cada vez más especializadas, perdiendo la mayor parte de su contenido citoplasmático hasta que finalmente adquieren su forma definitiva de espermatozoide (Hamilton & Waites, 1990; Gómez et al., 1996). No se trata de un proceso muy efectivo, especialmente en el hombre, donde el espermatozoide almacenado se vuelve senescente en pocos días (Clermont, 1966). De esta forma, salvo que el eyaculado sea frecuente, se genera un ambiente de calidad espermática cada vez menos favorable, junto a un incremento en el estrés oxidativo generado por las células en destrucción (Mortimer et al., 2013). Durante estos momentos, las células espermáticas realizan procesos

madurativos importantes para su estructura y funcionalidad, perdiendo contenido antioxidante citoplasmático. Además, todo ello tiene lugar en ausencia de los mecanismos antioxidantes provenientes del plasma seminal (Balercia et al., 2003).

Debido a la importancia de la espermatogénesis en la calidad seminal posterior, es necesario que esta sea normal y cuente con mecanismos antioxidantes efectivos, alternativos al del propio espermatozoide (células de testículo y epidídimo) (Agarwal et al., 2006; Dun et al., 2012). Sin embargo, existe gran cantidad de patologías testiculares, con origen físico-químico muy diversos (criptorquideas, varicocele, contusiones, procesos inflamatorios e infecciosos, productos tóxicos, tabaco, alcohol, fármacos, radiaciones, elevada temperatura, etc.) que terminan por afectar la fertilidad del macho, debido a alteraciones de la funcionalidad testicular, el proceso de espermatogénesis o estrés oxidativo (Kefer et al., 2009; Mieusset et al., 1987; Evers et al., 2003; Acharya et al., 2003; Tremellen et al., 2008).

---

## 1.5

### Estrés oxidativo en el espermatozoide

#### Fisiología espermática.

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada, cuya morfología está íntimamente ligada a su funcionalidad y consecuentemente con aquellas situaciones responsables de su disfunción (Yanagimachi et al., 1972). Por ello, resulta necesario prestar atención a sus características fisiológicas básicas, si se desea entender cómo opera el estrés oxidativo en el mismo.

Aunque la morfología de los espermatozoides puede variar mucho de una especie a otra, en general se puede hablar de una compartimentalización que distingue una cabeza y una cola (Leeuwenhoek, 1677; Pesch y Bergmann, 2006).

La cabeza del espermatozoide suele ser una estructura bilateral aplanada y es la responsable de algunos de los aspectos más determinantes de la fisiología espermática. La cabeza del espermatozoide contiene el ADN espermático, un núcleo haploide de cromatina altamente compactada, gracias a la presencia de unas proteínas básicas, ricas en arginina y cisteína, denominadas protaminas; rodeado de una membrana nuclear. A diferencia de las histonas de células somáticas, las protaminas establecen fuertes complejos de unión con el ADN, gracias a los enlaces disulfuro que establecen sus cisteínas en etapas tardías de

maduración espermática, especialmente durante su paso por el epidídimo (Curry y Watson, 2004). Además, debido a su naturaleza estructural, junto al hecho de que no presenta enzimas para ello, el espermatozoide parece carecer de actividad replicativa, tratándose de un ADN aparentemente inactivo hasta que no tiene lugar su descondensación en el citoplasma ovocitario (Bedford y Hoskins, 1990).

El espermatozoide presenta en su cabeza un orgánulo de secreción propio denominado acrosoma, derivado del aparato de Golgi localizado en la región más apical entre el núcleo y la membrana plasmática, cubriendo las 2/3 partes de la cabeza (Gadella et al., 2008; Mortimer et al., 2013). El acrosoma cuenta con gran cantidad de enzimas y moléculas esenciales en la reproducción (Austin, 1952; Fawcett, 1975; Flechon, 2015). Entre las que se encuentran las proteasas, glicosidasas o proteínas de fusión a ZP (proacrosina, sp32-, hialuronidasa, zonadhesina, etc.) (Ferrer et al., 2012). El acrosoma también presenta una estructura y membranas propias de gran importancia para la fecundación, cuando el espermatozoide debe liberar el contenido enzimático de su acrosoma para facilitar la penetración en el ovocito (Nagae et al., 1986; Buffone et al., 2008).

La cola del espermatozoide representa la parte fundamental del sistema de propulsión del gameto. Su función principal será asegurar la motilidad necesaria para que el espermatozoide se desplace hasta el ovocito y lo fecunde (Zaneveld, 1978). La cola consiste en un flagelo diferenciado en tres partes: pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. En la pieza media se encuentra la maquinaria mitocondrial responsable de conseguir la energía, en forma de ATP, necesaria para desplazarse (Harman 1972; Miquel, 1980). Las mitocondrias localizadas en la pieza media difieren en número y disposición de unas especies a otras, aunque suelen disponerse en forma helicoidal y con gran estabilidad en su membrana externa, algo que podría tratarse de una adaptación al movimiento y a un entorno oxidativo más agresivo (Favard y Andre, 1970; Bedford y Calvin, 1974). La cola espermática tiene un movimiento helicoidal de progresión con diferentes patrones de velocidad, amplitud de batido, oscilación, etc. (Suarez et al., 1992) que permite distinguir subpoblaciones celulares dentro de un mismo eyaculado (Mortimer, 1992), evaluable cuantitativamente mediante el uso de análisis computerizado de imagen (CASA) (Amann y Waberski, 2014).

La membrana plasmática del espermatozoide se corresponde con el modelo de mosaico fluido descrito por Singer y Nicholson (1972). Basado en una estructura conformada por una bicapa lipídica a la que se anclarían otras moléculas, ciertas proteínas y carbohidratos. De manera que su grado de fluidez y permeabilidad estaría determinado por la composición y disposición de todas sus moléculas. En las membranas celulares, los ácidos grasos de los

fosfolípidos se posicionan en paralelo y el colesterol se intercala entre ellos, estabilizándose a partir del empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas. La existencia de largas cadenas de ácidos grasos y la formación de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos, introduce cambios de orientación en las cadenas que aumentan la fluidez (Singer y Nicholson, 1972).

La membrana espermática se caracteriza por su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en especial de ácido docosahexanoico (Lenzi et al., 1996). La presencia de estos ácidos grasos PUFA confiere a la membrana del espermatozoide una gran fluidez y flexibilidad (Fleming et al., 1981), pero la hace muy sensible a la acción de ERO como el peróxido de hidrógeno (Jones et al., 1979; Álvarez y Storey, 1995; Martínez-Soto et al., 2013). Además, presenta diferentes dominios, especialmente a nivel de la cabeza y pieza media, asociados a una especialización de carácter funcional, indispensable en la función espermática (Yanagimachi, 1972).

Finalmente, la superficie del espermatozoide va a quedar envuelta por una cubierta de carbohidratos denominada glicocalix. El glicocalix va a proteger al espermatozoide fundamentalmente durante su tránsito a través del tracto femenino (Schroter et al., 1999).

### Origen de radicales libres en el sistema espermático.

Los resultados reportados por Gray (1928) en sus investigaciones acerca de la pérdida inesperada de motilidad en las muestras espermáticas, concluyeron en la hipótesis de que podrían ser no sólo la presencia de sustancias externas, sino que también los propios espermatozoides, pese a su elevada sensibilidad al daño oxidativo, generasen los metabolitos tóxicos responsables del fenómeno y más concretamente sus mitocondrias (Aitken, 2010). De hecho, el espermatozoide fue el primer tipo de célula en la que se pudo identificar la presencia de ERO, cuando Totic y Walton (1946) informaron de la producción de peróxido de hidrógeno por espermatozoides bovinos, hace más de medio siglo. Desde ese momento, la producción de ERO ha sido reportada para todos los mamíferos euterios examinados incluido el hombre (Aitken y Clarkson, 1987).

**Sistema antioxidante espermático.**

El sistema antioxidante espermático está constituido por moléculas enzimáticas y no enzimáticas, aportadas por el propio espermatozoide, las células del tejido reproductor masculino y el plasma seminal; conformando un sistema integral de defensa especialmente diseñado para responder a la acción de radicales libres sobre el espermatozoide (Sies et al., 1985; Aitken et al., 1994; Zini et al., 2000; Agarwal et al., 2008).

Entre los sistemas antioxidantes, destaca el papel de las enzimas superóxido dismutasa (Álvarez et al., 1987), catalasa (Jeulin et al., 1989) o la dupla glutatión peroxidasa/reductasa (Álvarez y Storey, 1989); además de otras sustancias como el alfa-tocoferol, ácido ascórbico, piruvato, taurina, hipotaurina, albúmina o el propio GSH (Álvarez y Storey, 1983; Halliwell y Gutteridge, 1989; de Lamirande y Gagnon, 1992; Zini et al., 1993).

La acción de la enzima SOD y el sistema GPX/GR, constituyen los dos mecanismos principales de autodefensa del espermatozoide frente a las ERO (Álvarez et al., 1987; Griveau et al., 1995), si bien el papel de la catalasa no parece ser tan relevante (Jeulin et al., 1989). (Figura 9).

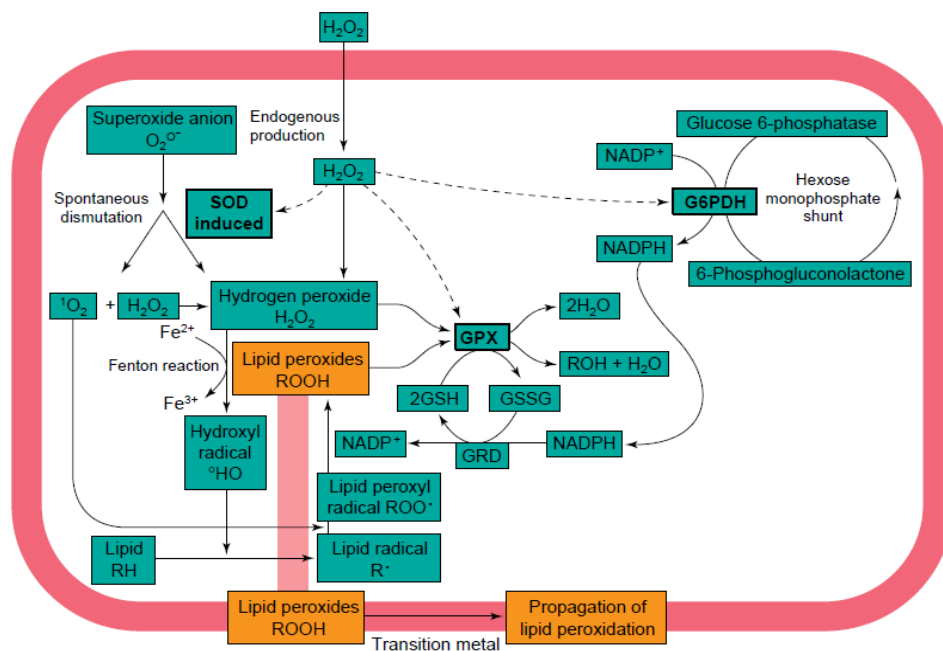


Figura 9. Esquema representativo de las vías principales de formación y neutralización de radicales libres (Irvine, 1996).

Pese a la presencia de estos mecanismos antioxidantes intracelulares, a diferencia de células somáticas, los espermatozoides son unas células muy limitadas en su capacidad de autodefensa frente a situaciones de estrés oxidativo, ya que pierden gran parte de los mecanismos antioxidantes y de reparación durante su maduración (Gómez et al., 1996), presentando un espacio citosólico tremendamente reducido y un ADN altamente compactado (Aitken et al., 2010). Además, la mayor parte de sus antioxidantes se encuentran en la parte citoplasmática de la pieza media, lejos de regiones tan sensibles como la cabeza o la cola (Irvine, 1996). También carecen de la conformación estructural y las herramientas en su citoplasma necesarias para reparar el ADN, aunque algunos autores defienden que el ovocito puede reparar determinadas alteraciones del ADN espermático (Genesca et al., 1992), siempre que la calidad ovocitaria y el daño sufrido por parte del espermatozoide sean adecuados (Ahmadi y Ng, 1999). Por todas estas razones, los espermatozoides son muy dependientes de los mecanismos antioxidantes extracelulares aportados por el sistema reproductor masculino (testículo, epidídimo y glándulas accesorias) y el plasma seminal (Jones y Stewart, 1979; Kobayashi et al., 1991; Zini et al., 1993).

El testículo posee sistemas de defensa frente al estrés oxidativo mediados por la presencia de la enzima catalasa, el sistema glutatión peroxidasa/reductasa, pero sobre todo de la superóxido dismutasa (Peltola et al., 1992), siendo esta enzima la más predominante. La enzima superóxido dismutasa es expresada en células de Sertoli, espermátocitos y espermátidas; mientras que las células peritubulares y de Leydig van a expresar glutatión peroxidasa y glutatión reductasa mayoritariamente (Yoganathan et al., 1989; Peltola et al., 1992). El epidídimo por su parte, es capaz de liberar a la luz de los túbulos una gran cantidad de moléculas de origen no enzimático, capaces de bloquear la acción de radicales libres: vitamina C, ácido úrico, taurina; junto a enzimas muy especializadas que incluye isoformas particulares de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, especialmente la no muy frecuente glutatión peroxidasa 5 (Vernet et al., 1996).

El plasma seminal representa el componente mayoritario del eyaculado. Se trata de una compleja mezcla final de secreciones producidas en testículo, epidídimo y glándulas accesorias, cuya función principal es la de preservar la viabilidad espermática en el eyaculado mediante el aporte de nutrientes y de una acción de defensa celular. Además, los componentes del plasma seminal participan en las últimas fases de maduración espermática necesarias para que los espermatozoides adquieran su capacidad fecundante (Garrido et al., 2004; Töpfer-Petersen, 2005; Muiño- Blanco et al., 2008; Juyena y Stelletta, 2012).

No obstante, pese a su contenido en antioxidantes, existe cierta discrepancia entre los autores acerca de su eficacia real (Zini et al., 2000). Debido fundamentalmente a dos ideas: la primera entiende que, puesto que el espermatozoide no se va a encontrar mucho tiempo en contacto con el plasma seminal, a diferencia del contenido epididimario, su papel en el sistema antioxidante espermático quizás no sea muy relevante (Aitken et al., 2010); segundo, diversos autores han evidenciado, a diferencia de otros (Jeulin et al., 1989; Lewis et al., 1995), que en muestras de pacientes infértiles con elevados niveles de ERO, la capacidad antioxidante en plasma seminal no se ve afectada (Zini et al., 2000). Sin embargo, la mayor parte de las evidencias apuestan por un papel importante de la capacidad de defensa antioxidante, sobre todo in vitro (Twigg et al., 1998). De hecho, diversos autores afirman que el plasma seminal representa el mayor constituyente en la defensa de los espermatozoides frente al estrés oxidativo y que un descenso en su concentración se encuentra asociado a infertilidad (Aitken, 1998; Agarwal et al., 2006; Pasqualotto et al., 2007).

Independientemente de las discrepancias, el plasma seminal es una fuente importante de antioxidantes con actividad enzimática (Juyena y Stelletta, 2012): catalasa (Jeulin et al., 1989), superóxido dismutasa (Nissen y Kreysel, 1983; Álvarez et al., 1987) y glutatión peroxidasa/reductasa (Álvarez y Storey, 1989; Aitken et al., 1993); así como de naturaleza no enzimática: ascorbato, urato, alfa-tocoferol, piruvato, taurina, hipotaurina, albúmina, carnitina, carotenoides, flavonoides y glutatión (Hughes et al., 1998; Donnelly et al., 1999; Finguerova et al., 2007; Tremellen, 2008). Además, el espermatozoide, en el eyaculado, queda rodeado en su superficie por lactoferrina, una proteína capaz de unir el hierro que actúa como metal de transición favoreciendo los procesos de peroxidación (Irvine, 1996).

### El glutatión como antioxidante espermático.

Al igual que en el resto de células de mamíferos, los espermatozoides también presentan el glutatión (0.5-10 mmol) como el tiol no proteico más abundante (Li, 1975; Irvine, 1996) y a pesar de su papel en la síntesis de proteínas, ADN y transporte de aminoácidos, en el espermatozoide el glutatión destaca especialmente por su capacidad antioxidante (Nishimura y Morii, 1993).

La mayor parte del contenido intracelular de glutatión desaparece durante la pérdida de contenido citoplasmático que tiene lugar en la espermatogénesis (Gómez et al., 1996), de manera que será el glutatión presente en el plasma seminal el que represente la mayor parte

del glutatión perteneciente al sistema antioxidante espermático (Luberda, 2005). También se ha descrito gran abundancia de glutatión en el testículo de algunas especies y se sabe que las células de Sertoli son capaces de sintetizarlo activamente, lo que hace pensar en su papel esencial de mecanismo protector, coincidente con una espermatogénesis más activa (Calvin y Turner, 1982; Grosshans y Calvin, 1985). También se ha observado que espermatoцитos y espermátidas de hámster presentan altas concentraciones de glutatión reducido, además de poder sintetizarlo (Den Boer et al., 1990).

Gracias a la presencia de su grupo sulfhidrilo (SH) el glutatión es capaz de actuar directamente o a través del sistema antioxidante conformado por las enzimas GPX/GR. Adicionalmente, existe la posibilidad de que el glutatión actúe detoxificando otros compuestos electrofílicos, como ciertos xenobióticos, mediante su conjugación con los mismos gracias a la acción de las enzimas glutatión S-transferasas (Den Boer et al., 1990) (Figura 10).

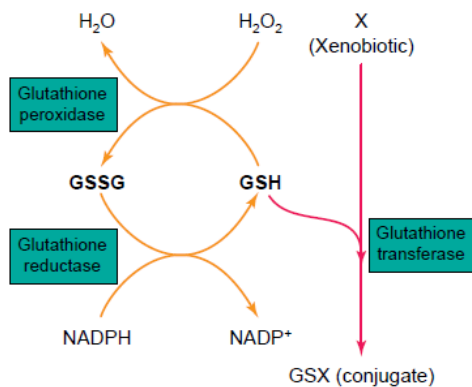


Figura 10. Mecanismo de acción enzimático antioxidante del glutatión (Irvine, 1996).

El grado de desbalance entre la producción de especies reactivas y la capacidad de acción de los sistemas antioxidante determinará el daño experimentado por el espermatozoide. De esta manera, podemos encontrarnos una producción de especies reactivas no suficientemente alta para afectar la movilidad espermática, aunque si otros fenómenos fisiológicos importantes, por ejemplo, la capacitación, reacción acrosómica, hiperactivación espermática o fusión de gametos (Baumber et al., 2003); o un desbalance elevado debido a altas concentraciones de especies reactivas producidas por el propio espermatozoide, en combinación o no con las generadas por la actividad enzimática de otros tipos celulares o actividad enzimática exógena (Jones et al., 1979; Windsor et al., 1993). En



ocasiones, una baja producción de especies reactivas suele estar asociada a efectos reversibles, una vez se restablece el equilibrio oxidativo (de Lamirande y Gagnon, 1992).

En este contexto, el peróxido de oxígeno se erige como el principal protagonista en la producción de estrés oxidativo espermático y la peroxidación lipídica su mecanismo de acción, destacando por el contrario a la enzima catalasa como su principal arma de oposición (Álvarez y Storey, 1989; de Lamirande y Gagnon, 1992; Aitken et al., 1993; Baumber et al., 2001).

### **Efecto de estrés oxidativo en la fisiología espermática.**

El estrés oxidativo es uno de los fenómenos más reconocidos de alteración de la funcionalidad espermática (Aitken, 2014). En el espermatozoide, se genera normalmente a partir de un incremento en la producción de radicales libres por parte de los propios espermatozoides, pero también debido a la presencia en el eyaculado de otras especies celulares como leucocitos, particularmente linfocitos y macrófagos (Ko et al., 2014). En ocasiones puede existir una producción exógena debida a factores físicos o bioquímicos relacionados a ciertos hábitos de vida y factores sociales en el caso de la especie humana; y alimenticios, climáticos o de condiciones de cría en animales domésticos (Agarwal et al., 2008; Aitken et al., 2014; Mortimer et al., 2013). In vitro, las muestras espermáticas también sufren fenómenos de estrés oxidativo, mediados por diferentes mecanismos físico-químicos que se detallarán más adelante.

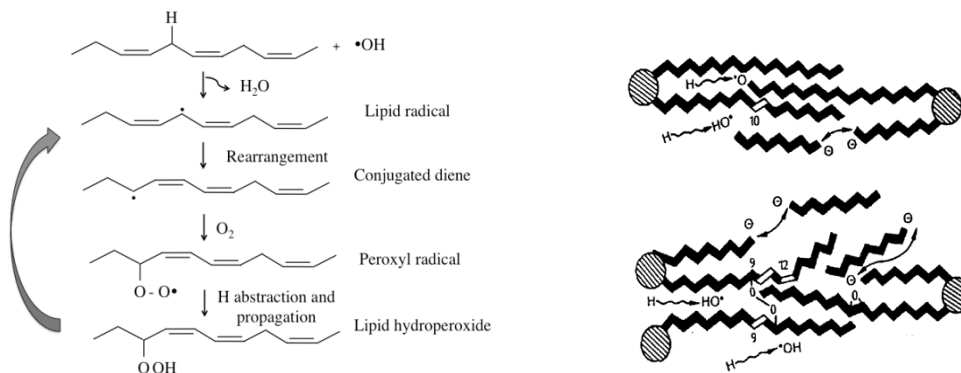
Estas situaciones de estrés oxidativo son favorecidas por estados inmaduros del espermatozoide, junto a la ineficacia de los sistemas antioxidantes y la presencia de metales de transición, hierro o cobre principalmente (Agarwal et al., 2014; Ko et al., 2014).

### **Peroxidación lipídica en el espermatozoide.**

Descrita por Mcleod hace más de 50 años, la peroxidación lipídica se considera uno de los mecanismos de acción fundamentales del daño ocasionado al espermatozoide por la acción de los radicales libres. Se trata de un fenómeno irreversible, que implica la acumulación de peróxidos orgánicos, procedentes de la oxidación de ácidos grasos insaturados y grupos tioles de proteínas, resultado de modificar la estructura y conformación del ácido graso original. Proceso que es favorecido por la presencia de determinados metales de transición como hierro o cobre (Lenzi et al., 2000).

La peroxidación lipídica ocasiona cambios en la composición química y deterioro en la organización ultraestructural de la propia membrana espermática, provocando la disminución de su fluidez, cambios en la permeabilidad e inactivación de receptores y enzimas unidas a la misma (Jones et al., 1979; de Lamirande y Gagnon, 1995). En el espermatozoide, su membrana rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), le hace especialmente sensible a la acción de radicales libres, sobre todo el peróxido de hidrógeno (Álvarez y Storey, 1982; Aitken y Clarkson, 1987; Storey, 2008).

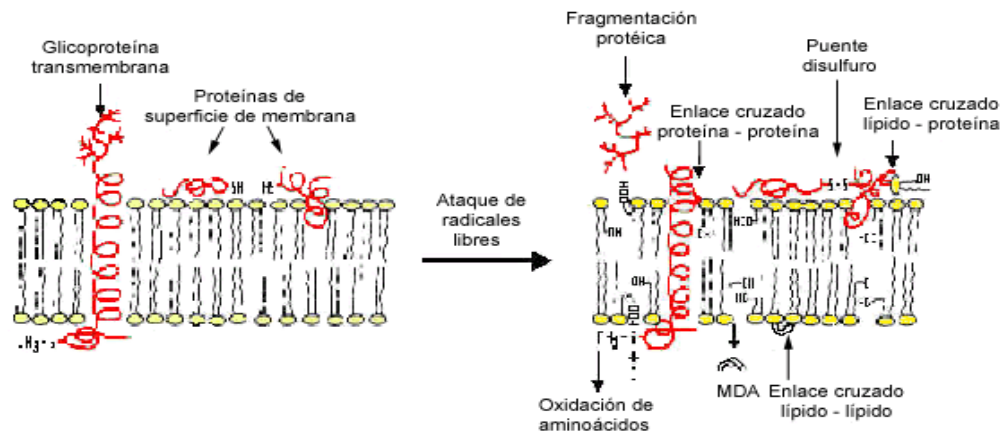
La peroxidación lipídica comienza cuando los radicales libres atacan los carbonos alílicos (=CH-) de los ácidos grasos, sobre todo en carbonos contiguos de ácidos grasos polinsaturados, dando lugar a un radical libre lipídico que forma un dieno conjugado capaz de combinarse nuevamente con moléculas de oxígeno y formar radicales hidroperoxilo. Los radicales hidroperoxilo, pese a ser compuestos más estables, pueden formar radicales libres en presencia de iones metálicos de transición o bien atacar a otros ácidos grasos adyacentes, generando nuevos radicales lipídicos. Este fenómeno establece una reacción de peroxidación en cadena, que termina por alterar la estructura y funcionalidad de las membranas (Jones et al., 1979; Calvin et al., 1982; Rice-evans y Burton, 1993; Halliwell, 1994) (Figura 11).



**Figura 11. Peroxidación lipídica en ácidos grasos (Jairam et al., 2012; López-Alonso y Col. 1997).**

El estrés oxidativo afecta principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados, pero también se ha demostrado que puede causar daños en la estructura de proteínas y enzimas, a partir de la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) de los centros activos de las mismas, por modificación de la estructura de los aminoácidos, o mediante la formación de bases de Schiff. Estas alteraciones generan a su vez nuevas reacciones en cadena, encaminadas a la formación

de elementos de estabilización que, en verdad, desestabilizan aún más la estructura y funcionalidad de las moléculas y estructuras implicadas (Figura 12) (Hodgson y Fridovich, 1975; Freeman y Grapo, 1982; Teppa- Garrán, 1999).



**Figura 12. Esquema de daños causados por radicales libres en la membrana plasmática (Teppa-Garrán, 1999).**

### **El estrés oxidativo en el ADN espermático.**

Una vez que se demostró que la formación de peróxidos también tenía efectos mutagénicos en las células (Dickey et al., 1949; Ross, 1950; Loveless, 1951), muchos estudios evidenciaron una relación entre el ADN espermático y la acción de radicales libres (Irvine et al., 2000; Baumber et al., 2003; Peris et al., 2007).

A pesar de no existir un consenso general respecto al mecanismo de acción, los estudios han demostrado que la acción de los radicales libres afecta directamente la integridad del ADN, induciendo diferentes modificaciones estructurales; como cambio de bases, deleciones y fragmentaciones asociadas a errores de lectura, oxidación de bases nitrogenadas e incluso roturas más o menos mutagénicas y letales para la célula, además de afectar a su capacidad fecundante y al propio desarrollo embrionario (Evenson et al., 1991; Kodama et al., 1997; Aitken et al., 2006; De Iuliis et al., 2009). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la alteración del ADN está directamente producido por el estrés oxidativo que genera el compuesto 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OHdG), que ha sido utilizado en consecuencia como marcador de estrés oxidativo (Kodama et al., 1997).

Aitken y col. consideran que el daño al ADN espermático podría ser el principal responsable de la infertilidad humana asociada al factor masculino, la presencia de abortos y los defectos genéticos en la descendencia (Aitken et al., 2006). Probablemente, como resultado de la acción individual o conjunta de tres mecanismos de acción no excluyentes: estrés oxidativo, remodelamiento cromatínico alterado durante la espermiogénesis y procesos de alteración por apoptosis (Jones et al., 1978; Sakkas et al., 1999). Este hecho es especialmente importante en el proceso de congelación-descongelación espermática, donde predomina la alteración mediada por el estrés oxidativo al daño que generan los procesos apoptóticos (Thomson et al., 2009).

Existen algunos modelos que tratan de explicar cómo actuarían las especies reactivas sobre el ADN. Las evidencias sugieren que la presencia de radicales libres genera inestabilidad en los puentes disulfuro de las nucleoproteínas de la molécula, creando a su vez puentes estructurales entre las propias bases y las proteínas, con el fin de dar estabilidad a la molécula pero entorpeciendo la maquinaria metabólica que interviene en sus procesos celulares posteriores, especialmente durante el desarrollo embrionario (Olinski et al., 1992; Yeste et al., 2012). Por ejemplo, la acción del radical hidroxilo sobre los carbonos alílicos de bases púricas y pirimídicas daría lugar a radicales alquilo, que dimerizarían de forma similar a lo que tiene lugar en la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, llegando a desestabilizar la propia estructura molecular de la cadena de ADN o ARN.

Estos modelos se complementan con la idea expresada por otros autores que defienden que para que exista un daño significativo en el ADN espermático, además de los fenómenos de estrés oxidativo, es posible que se den también procesos defectuosos de remodelamiento cromatínico durante la maduración espermática, e incluso de apoptosis celular (Bianchi et al., 1993; Weng et al., 2002; De Iuliis et al., 2009), además de otros fenómenos, por ejemplo, la presencia de nucleasas espermáticas endógenas, todavía por determinar (Boaz et al., 2008).

---

## 1.6

### Medida de estrés oxidativo y capacidad antioxidante

Los estudios demuestran que existe una relación entre el estrés oxidativo y la presencia de parámetros seminales alterados (Sikka et al., 2001; Aitken et al., 2004; Agarwal et al., 2006). De hecho, en los análisis básicos del semen, existen algunas evidencias relacionadas a la presencia de estrés oxidativo; por ejemplo: el descenso en los parámetros seminales, astenozoospermia, presencia de células redondas o formas espermáticas inmaduras, debris o hiperviscosidad (Aydemir et al., 2008).

Sin embargo, los análisis relacionados a la presencia de estrés oxidativo apenas se incluyen en los diagnósticos y el espermiograma sigue siendo la herramienta más empleada de forma rutinaria en la evaluación de la muestra seminal, pese a que al igual que sucede en la infertilidad humana, el 30-80% de los casos de infertilidad masculina desconocida podrían estar relacionados con estrés oxidativo (Tremellen et al., 2008; Makker et al., 2009). Entre las razones esgrimidas se encuentran la logística necesaria, su coste-eficiencia y el hecho de que no haya un método analítico universalmente aceptado (Deepinder et al., 2008). De hecho, se pueden encontrar más de 30 análisis diferentes empleados en la medida de ERO y estrés oxidativo (Agarwal et al., 2014).

Existe gran cantidad de pruebas que permiten detectar y valorar, de forma directa e indirecta, la presencia de especies reactivas y la capacidad antioxidante de las muestras espermáticas.

Las medidas directas de estrés oxidativo se basan en la detección y valoración de los niveles de radicales libres o de sus productos de reacción, presentes tanto a escala celular como extracelular. Por ejemplo, la espectroscopia por resonancia de electrón espín es una de las técnicas más reales de medida directa de radicales libres intracelulares que existe (Sikka et al., 1996). Esta técnica se basa en las propiedades magnéticas de los electrones no apareados y su ambiente molecular, permitiendo detectar iones superóxido y radical hidroxilo en sistemas biológicos a bajas concentraciones. Sin embargo, su elevado coste la hace inviable.

Las pruebas de detección de luminol y lucigenina mediante quimioluminiscencia son las más empleadas, ya que permiten la medición de radicales libres tanto en el medio como en el espermatozoide, a partir de la luz detectada mediante el luminómetro como resultado de la combinación con los radicales libres presentes (Kobayashi et al., 2001; Agarwal et al., 2004). El

luminol detecta especialmente el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, mientras que la lucigenina puede detectar radicales  $O_2\cdot$  y el  $OH\cdot$  (Mahfouz et al., 2009). Sin embargo, estos ensayos presentan varias limitaciones, puesto que requieren de concentraciones y volúmenes de muestra elevados (Aitken, 2006), además de no poder discriminar los espermatozoides viables de los apoptóticos (Mahfouz et al., 2009).

Otra valoración directa de estrés oxidativo muy empleada clásicamente para valorar el daño por peroxidación lipídica, es la basada en el uso del ácido tiobarbitúrico para la detección del malondialdehído (MDA) (Lykkesfeldt, 2007). El MDA es uno de los productos finales del proceso en cadena de peroxidación lipídica y su presencia en la membrana plasmática espermática está asociada a un descenso en su motilidad y capacidad de fusión de membrana (Agarwal et al., 2005; Kefer et al., 2009). El test de detección de MDA se basa en la detección mediante espectrofotometría del producto resultante de la reacción que tiene lugar entre el malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico (Miller et al., 1998; Takacs-Novak y Tam, 2000). Esta técnica se ha empleado satisfactoriamente en espermatozoides de caballo (Stradaioli y Magistrini, 2002; Kankofer et al., 2004), cerdo (Kumaresan et al., 2008; Breininger et al., 2005), toro (Sariözkan et al., 2009), ratón (Rao et al., 2008) y humano (Aitken et al., 1999; Potts et al., 1999, 2000; Nakamura et al., 2002; Fatma et al., 2009).

Una alternativa para valorar fenómenos de peroxidación lipídica es el uso de fluorescencia y sondas como la BODIPY 581/59. Se trata de análogos de ácidos grasos con propiedades de fluorescencia, cambiando de color rojo a verde por la oxidación inducida por ERO. Esta característica permite el uso de fluorescencia, microscopía confocal láser de escaneo (Neild et al., 2005), fluorometría (Drummen et al., 2002) o citometría de flujo (Silva et al., 2007). Se han descrito trabajos en toro (Brouwers et al., 2005, Silva et al., 2007), cerdo (Brouwers et al., 2005; Guthrie y Welch, 2007), humano (Aitken et al., 2007; Koppers et al., 2008), etc.

Al igual que sucede con la peroxidación lipídica, en el estrés oxidativo espermático también tiene gran importancia la acción de los radicales libres sobre el ADN (Loft et al., 2003; Thomson et al., 2009; Aitken y de Luliis, 2010). Entre las pruebas de valoración directa, empleadas para analizar este efecto, se encuentra la prueba de determinación del 8OHdG (Kodama et al., 1997; Kao et al., 2008; de Luliis et al., 2009).

Aunque existen diferentes protocolos, una de las formas más prácticas de determinación del 8OHdG consiste en utilizar anticuerpos específicos marcados con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) que permite la valoración mediante citometría de flujo (de Luliis et al., 2009).

Actualmente, existen otras aproximaciones a la valoración directa del estrés oxidativo realizadas mediante citometría de flujo o resonancia electrónica, a partir de la detección de productos de oxidación como el 2,7- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Gadea et al., 2008; Ameziane-El-Hassani et al., 2010). Esta sonda permite medir la producción de ROS en espermatozoides mediante su oxidación al compuesto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) por numerosos radicales libres (Guthrie y Welch, 2006).

Las medidas indirectas de estrés oxidativo se basan en la valoración mediante pruebas de microscopía, citometría de flujo, etc. (Gadea et al., 2005; Ko et al., 2014) de las alteraciones que sufren los espermatozoides por acción de radicales libres, fundamentalmente en sus membranas y ADN. A pesar de no aportar medida real de los niveles de radicales libres o capacidad antioxidante, sí lo hace de sus efectos negativos sobre componentes del espermatozoide, su funcionalidad fisiológica y potencial fértil (Ko et al., 2014). En muchos casos, este tipo de pruebas incluye, en su protocolo, la generación de estrés oxidativo en la muestra seminal, por ejemplo, mediante la adición del enzima xantina oxidasa (Aitken et al., 1993).

Existe otro grupo de pruebas encaminadas a valorar el potencial antioxidante total de una muestra espermática o bien de alguno de sus antioxidantes de forma individual. (Ko et al., 2014).

Las valoraciones individuales resultan más costosas, requieren más tiempo de análisis y no aportan una eficiencia real del antioxidante estudiado, ya que este se encuentra en realidad actuando en un sistema que parece funcionar en interacción continua entre todos los antioxidantes participantes. No obstante, hay diferentes test para evaluar la actividad individual catalasa, glutatión peroxidasa/reductasa o superóxido dismutasa (Wheeler et al., 1990)

A diferencia de las medidas individuales, la determinación de la “capacidad antioxidante total de una muestra” es una medida más económica y descriptiva del equilibrio establecido entre los radicales libres y los antioxidantes presentes. Algunos estudios revelan que las muestras normozoospermicas presentan una capacidad antioxidante total más elevada que la de muestras con parámetros seminales alterados (Hosseinzadeh et al., 2013) y que un detrimento de la misma conlleva también un descenso de la calidad seminal (Pahune et al., 2013).

---

## 1.7

### Estrés oxidativo en procesos de crioconservación

El conocimiento de la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a temperaturas cercanas a la congelación se conoce desde su descripción por Spallanzani en 1776, resultado de congelar semen en nieve y reactivarlo posteriormente tras treinta minutos en medio temperado. Sin embargo, pese a su capacidad para permanecer almacenados a temperaturas cercanas a los  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los espermatozoides van a sufrir una serie de daños estructurales y fisiológicos generados en el propio proceso de criopreservación (Polge & Jakobsen, 1959; Watson, 2000).

La congelación-descongelación de muestras seminales comprende una serie de daños que afectan directamente a la supervivencia celular: descenso temperatura y estrés osmótico, junto a otros relacionados con la funcionalidad de las células supervivientes: estabilidad de membrana, estrés oxidativo e integridad de receptores de membrana y ADN (Pursel y Johson, 1975; Watson, 2000). Además, se trata de un proceso en el que a la vez que eliminamos potencial antioxidante en la muestra, se crea un entorno nocivo para la célula espermática en sí, resultado de eliminar la mayor parte del plasma seminal y adicionar el medio crioprotector en su lugar (Gadea et al., 2005).

La estructura y composición de la membrana plasmática es muy importante en los procesos de criopreservación y su comportamiento en la congelación y la descongelación determinarán la supervivencia, funcionalidad y potencial fértil de las muestras espermáticas crioconservadas (Polge & Jakobsen, 1959; Pursel y Johson, 1975; Waterhouse et al., 2006; Macías García et al., 2011; Martínez-Soto et al., 2013).

La producción de radicales libres durante los procesos de congelación y descongelación ha sido estudiada en profundidad por diferentes autores (Ball et al., 2001; Chatterjee et al, 2001; Gadea et al., 2004), encontrando que los espermatozoides y leucocitos presentes en las muestras seminales incrementan la producción de radicales libres como respuesta al descenso de temperatura que tiene lugar durante su crioconservación, especialmente en temperaturas cercanas a los  $4^{\circ}\text{C}$  (Wang et al., 1997). En este sentido, la producción de ERO tendría lugar tanto en la congelación como la descongelación (Chatterjee y Gagnon, 2001), mientras que la formación de ERN sería fundamentalmente durante la descongelación (Chatterjee y Gagnon, 2001).

Los autores también coinciden en sus resultados cuando afirman que previamente a la congelación ya tiene lugar un incremento en la producción de radicales libres, resultado de la



propia manipulación in vitro (Mazzilli et al., 1995; Ko et al., 2014). De hecho, durante la dilución, centrifugación y refrigeración de muestras se ha encontrado un incremento en la producción de ERO en el propio pellet (Aitken y Clarkson, 1988) y durante cada ciclo de lavado de muestra realizado (Iwasaki et al., 1992).

Bilodeau et al. (2000) determinaron que los procesos de congelación implican una pérdida importante del potencial antioxidante del espermatozoide, que dificulta su capacidad para defenderse del ataque de ERO, fundamentalmente del peróxido de hidrógeno. Estos autores demostraron que un 78% del GSH (también en Gadea et al., 2011 y Meseguer et al., 2004) y el 50% del SOD se pierden durante la crioconservación, mientras que la capacidad catalasa y glutatión peroxidasa apenas resulta relevante. Martí et al., (2008) corroboraron estos datos, demostraron que la actividad catalasa y glutatión peroxidasa apenas se modifica durante la criopreservación de las muestras seminales. Pero sí observaron que junto a la pérdida de poder antioxidante, también existe una redistribución muy evidente durante la congelación de las enzimas SOD, GPX y GR localizadas en la membrana, modifican significativamente su patrón de distribución. Por su parte, la descongelación tiene por objetivo devolver a los espermatozoides su entorno fisiológico mediante el incremento de la temperatura y cambios osmóticos inversos a los ocurridos durante el proceso descongelación (Holt, 2000). El problema existe cuando tienen lugar fenómenos de recristalización como consecuencia del incremento progresivo de temperatura (Mazur, 1984). Esta situación hace que los espermatozoides sean más resistentes a la deshidratación que a la rehidratación y que durante el proceso de descongelación disminuya la viabilidad espermática (Gao et al., 1995) y aumente la producción de radicales libres (Gadea et al., 2005). Este hecho, sumado a la escasez de plasma seminal, produce un incremento del estrés oxidativo (Martínez-Soto et al., 2013).

Por tanto, pese a las discrepancias encontradas en la bibliografía, los procesos de criopreservación seminal implican un incremento en la producción de radicales libres por parte de espermatozoides presentes en las muestras, junto a una pérdida de poder antioxidante del espermatozoide y del plasma seminal. Esta situación genera un incremento del estrés oxidativo que repercute directamente en la calidad de la muestra y su potencial fértil. Frente a esta situación, muchos autores proponen como alternativa real la adición exógena de antioxidantes in vivo (suministración oral) o in vitro (adición al medio) (Agarwal et al., 2014).

---

## 1.8

### Uso de antioxidantes in vitro

Independientemente del grado de calidad que tenga una muestra, el estrés oxidativo aumenta en los procesos de manipulación in vitro (Hammadeth et al., 1999). Debido en gran parte a una eliminación de plasma seminal y la adición de medios de cultivo ricos en metales de transición (hierro o cobre) junto al cultivo en condiciones no fisiológicas de presión parcial de oxígeno y luz elevadas (Agarwal et al., 2006). Esto favorece la producción de radicales libres endógenos y exógenos (Bilodeau et al., 2000) y la merma en los mecanismos antioxidantes (Sies et al., 1993), provocando pérdida de viabilidad y potencial fértil de las muestras (Aitken y Clarkson, 1988; Donnelly et al., 1999; Agarwal et al., 2006; Agarwal et al., 2014).

Entre los procedimientos in vitro relacionados al incremento del estrés oxidativo se incluyen: centrifugaciones, diluciones, contaminación leucocitaria, toxicidad del material fungible, composición de los medios de cultivo, cambio en las condiciones fisiológicas, congelación-descongelación de muestras y procesos bioquímicos mediados por sistemas enzimáticos xantina-xantina oxidasa o xenobióticos (Aitken y Clarkson, 1988; Krausz et al., 1992; Agarwal et al., 2006; Mortimer et al., 2013).

Actualmente, la criopreservación es el mecanismo más eficaz para preservar durante largo tiempo las muestras seminales de la mayor parte de mamíferos (Holt, 2000). Sin embargo, debido a la baja eficiencia del procedimiento, su uso no está tan generalizado (humano, Aitken y Clarkson, 1987; porcino, Casas et al., 2012; equino, Ball et al., 2001). Efectivamente, la congelación-descongelación seminal resta calidad y potencial fértil a las muestras (Watson, 2000

La optimización de protocolos y estrategias como la adición de antioxidantes y plasma seminal son un recurso muy interesante para mejorar los resultados (Grizard et al., 1999; Martínez-Soto et al., 2010; Agarwal et al., 2014). El uso de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos: catalasa, SOD, GPX, Vitamina E, Trolox, Vitamina C, urato, Glutación, taurina, hipotaurina, isoflavonas, junto a la adición de determinados aminoácidos y quelatos ha demostrado eficacia contra fenómenos de peroxidación lipídica y alteraciones del ADN (Álvarez et al., 1983; Sies, 1993; Donnelly et al., 2000; Sikka, 2004; Gadea et al., 2011), mejorando en muchos casos la calidad de la muestra seminal tras el consumo oral de complejos vitamínicos ricos en capacidad antioxidante, o bien tras su adición directa al medio de cultivo (Aitken et al., 1998; Agarwal et al., 2014).

La adición a los medio de congelación y descongelación de las enzimas catalasa, SOD o GPX; consigue mejorar los parámetros seminales en porcino (Roca et al., 2005), cévidos (Fernández-Santos et al., 2007), bovino (Bilodeau et al., 2002), equino (Baumber et al. 2000) y humano (Garrido et al., 2004). El uso de forma conjunta e individual de SOD y GSH ofrece protección frente a la pérdida de movilidad durante la centrifugación de muestras (Griveau y Le Lannou, 1994), capacidad para proteger las muestras durante 24 horas frente a la pérdida de motilidad y evitar fenómenos de reacción acrosómica espontánea (Baker et al., 1996).

La suplementación de vitaminas de forma conjunta e individualizada también es muy común. Por ejemplo, vitamina E y Trolox (análogo soluble de la vitamina E) añadidos a los medios de congelación y descongelación, minimizan los efectos negativos de la criopreservación en semen humano (Askari et al., 1994), porcino (Peña et al., 2003), bovino (Bilodeau et al., 2001) o cévido (Martínez-Pastor et al., 2008). Aunque también se han reportado efectos adversos en determinadas dosis (Donnelly et al., 1999). La vitamina C en semen humano muestra un efecto protector en cuanto a movilidad (Jenkins et al., 2011), alteraciones ADN (Branco et al., 2010) o peroxidación lipídica (Fanaei et al., 2014).

Ya se comentó que el glutatión es uno de los antioxidantes más importantes en los sistemas biológicos (Sies, 1993), incluido el sistema reproductor de mamíferos. Sin embargo, se trata de un antioxidante cuyo contenido en el citoplasma del espermatozoide es muy escaso en comparación con el del plasma seminal (Luberda, 2005). Por esta razón, todos aquellos procesos que impliquen la pérdida de plasma seminal repercutirán directamente en su capacidad de acción y harán que su adición sea especialmente eficiente (Donnelly et al., 2000; Baumber et al., 2003; Gadea et al., 2005; Giaretta et al., 2015).

Diferentes concentraciones de glutatión han demostrado mejora en los parámetros seminales (Irvine, 1996; Gadea et al., 2005), los daños en el ADN (Yeste et al., 2013), la acción de xenobióticos (Den Boer et al., 1990) y la producción de ERO por sistemas xantina-xantina oxidasa (Griveau et al., 1995). Su uso ha sido muy estudiado en la criopreservación de gran diversidad de especies animales, evaluando su adición a distintas concentraciones, tanto en el medio de congelación como durante la descongelación.

En el caso del porcino, la adición de concentraciones 0.5 a 5 mM de GSH al medio de congelación ejerce un efecto positivo en la mayor parte de trabajos estudiados. Por una parte, Nishimura y Morii (1993) demostraron que la adición de 5 mM de GSH al medio de congelación de semen de verraco incrementaba la actividad de la SOD, para reducir los procesos de peroxidación lipídica, además de mejorar la movilidad, las tasas de gestación y el peso de los

lechones nacidos. Posteriormente, Yeste et al. (2014) describieron un incremento en la supervivencia y potencial fértil de sus muestras cuando adicionan GSH al medio de congelación, observando un aumento en la movilidad, viabilidad, estabilidad acrosomal y del ADN espermático. Sin embargo este efecto varía dependiendo de la calidad de la muestra seminal, de manera que muestras más pobres precisan de concentraciones mayores de GSH (Yeste et al., 2014). Por otra parte Giarreta et al., (2014) también demuestran un efecto positivo de la adición de GSH (5 mM) en cuanto a la criotolerancia de sus muestras, la producción de ERO y la estabilidad de las nucleoproteínas del núcleo espermático. Si bien, estos autores destacan que el efecto resulta más positivo cuando el GSH se adiciona junto a otros antioxidantes (vitamina C) en el medio de congelación y de descongelación (Giarreta et al., 2015).

Por su parte, Estrada et al. (2014) demuestran que la adición de 2 mM de GSH al medio de congelación porcino está directamente relacionado con un incremento en el potencial fértil de sus muestras, incrementando la tasa de gestación y el número de lechones nacidos vivos (Estrada et al., 2014). En la misma línea, Gadea et al., (2004) destacan el rol del GSH especialmente durante el proceso de descongelación. Observando un efecto menos destacado en la movilidad, pero mayor en cuanto a viabilidad, funcionalidad espermática y potencial fértil.

En el caso de la especie bovina, existen trabajos muy interesantes que destacan el uso de glutatión adicionado al medio de congelación y descongelación. La mayor parte de autores evalúan la adición de concentraciones de 0.5 a 7.5 mM de GSH en el medio de congelación. Ansari et al., (2012) evidenciaron un efecto positivo dosis-dependiente en la movilidad, viabilidad, integridad de membrana y de ADN. Otros autores destacan resultados similares con respecto a estos parámetros, además del efecto positivo en la integridad del acrosoma (Perumal et al., 2011), actividad mitocondrial (Perumal et al., 2011), procesos de peroxidación lipídica (Mata-Campuzano et al., 2014) y potencial fértil (Tuncer et al., 2010; Perumal et al., 2011).

Algunos estudios incluyen el glutatión en su forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG), principalmente en el medio de congelación (Chatterjee et al., 2001; Sariözkan et al., 2009), aunque también de descongelación (Bilodeau et al., 2001); mostrando un efecto positivo en la movilidad, viabilidad, estabilidad de membrana y acrosoma.

Entre los trabajos que adicionan GSH al medio de descongelación bovino cabe destacar el trabajo de Gadea et al., 2008 en el que demostraron un efecto positivo dependiente de la

concentración en la viabilidad, estado del acrosoma, estabilidad de membrana, producción de ROS, la condensación de la cromatina, estabilidad del ADN, capacidad fecundante y desarrollo embrionario hasta blastocisto.

En otras especies como caprino y ovino también existen autores que apuestan por la adición del GSH en el proceso de criopreservación. Los trabajos en ovino aportados por Mata-Campuzano et al., (2014), adicionando 1 mM de GSH al medio de congelación, no arrojan resultados tan alentadores como en otras especies (humano, bovino o porcino), ya que las variables estudiadas mediante CASA y citometría de flujo revelaron un efecto inocuo e incluso negativo sobre el ADN. Estos autores entienden que la adición de antioxidantes en los medios de criopreservación no es algo sencillo y precisa de un conocimiento detallado de todos los componentes y sus interacciones. Hay trabajos que obtienen resultados similares para la adición de GSH y otros antioxidantes (Jones y Mann, 1977; Camara et al., 2011; Silva et al., 2011), con resultados no del todo convincentes con respecto a los mostrados en las diferentes especies.

En el caso del caprino, la adición de GSH no se encuentra tan estudiada, a diferencia de otras especies mamíferas. Sin embargo, Gadea et al., (2013) cuentan con un trabajo muy completo que destaca la adición de GSH (1, 5 mM) y GSSG (2.5 mM) al medio de congelación en la movilidad, viabilidad, estabilidad de membrana, estado acrosomal, producción de ERO y condensación cromatínica.

El GSH también se ha estudiado de forma minoritaria en cérvidos (Anel-López et al., 2012, 2015), cánidos (Ogata et al., 2015), bisón (Hussain et al., 2013) y especie cunícula (Marco-Jiménez et al., 2006); presentando efectos positivos en la movilidad, viabilidad, funcionalidad y potencial fértil de las muestras.

En el humano, a diferencia de lo que sucede con otras especies mamíferas, las muestras seminales no proceden necesariamente de sementales, por lo que su calidad y potencial fértil es muy variable. A esto se suma una eficiencia muy baja del proceso de congelación y descongelación (Martínez-Soto et al., 2013). Por estas razones, la adición de antioxidantes de forma oral (Kodama et al., 1997) e in vitro (Kefer et al., 2009; Zini y Al-Hatal, 2011; Agarwal et al., 2014) ha sido muy estudiada. Aunque no existen muchos trabajos que incluyan la adición de glutatión, en comparación a otros antioxidantes (Agarwal et al., 2013).

Lopes et al., (1998) demostraron que la generación in vitro de radicales libres (sistema xantina-xantina oxidasa) afecta la estabilidad del ADN (TUNEL assay) y que la adición de GSH

(10 mM) minimiza este efecto. Más aún, Gadea et al., (2011) evidenciaron una pérdida del 64% de GSH durante la criopreservación de muestras seminales humanas, correlacionada directamente con el descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles (68%). La adición de 1 mM de GSH al medio de congelación mejoró la movilidad, viabilidad y producción de ERO. Mientras que la adición de diferentes concentraciones de GSH al medio de descongelación (1 y 5 mM) mejoró la movilidad pero no la viabilidad de los espermatozoides. En ningún caso se observó un efecto significativo en la estabilidad de las membranas y el grado de condensación cromatínico.

Pese a la multitud de trabajos reportados que demuestran el efecto positivo de la suplementación oral e in vitro de antioxidantes, especialmente durante procesos de criopreservación seminal, existen autores que evidencian efectos inocuos (Kessopoulou et al., 1995; Mata-Campuzano et al., 2014) o negativos (Donnelly et al., 1999; Silva et al., 2011). Por lo que siguen siendo necesarios nuevos trabajos con antioxidantes que profundicen en los mecanismos de acción, las interacciones y concentraciones óptimas de los mismos (Zini y Al-Hatal, 2011; Agarwal et al., 2013).

---

## 1.9

### Importancia de la criopreservación espermática en la producción animal

Se estima que la producción animal constituye un 30-40% del valor total de la alimentación y la agricultura mundial, siendo la contribución directa al valor de la producción de alimentos del 19% aproximadamente, aunque la actividad pecuaria también participa en otros aspectos de la economía mundial: producción de abonos, producción de fármacos, ayuda en el cultivo tradicional, etc. (FAO, 1994). Sin embargo, en respuesta a la presión demográfica creciente en países desarrollados, se estima que para atender a la demanda mundial será necesaria una duplicación de la producción animal en los próximos 20 años (FAO, 1994; Hammond y Leitch, 1996) y que la producción de alimentos de origen animal deberá aumentar más rápida que de origen vegetal (Hammond y Leitch, 1996). Pese a ello, existe una serie de obstáculos al desarrollo ganadero, entre los que se incluyen: la degradación de las tierras para cultivo y cría animal, la contaminación ambiental, el calentamiento global, la erosión de los recursos zoogenéticos, la escasez de agua y las nuevas enfermedades que atentan contra el crecimiento del sector pecuario mundial (FAO, 1994). Una de las soluciones para solventar parte de estos problemas es la aplicación de biotecnologías de reproducción ganadera, junto a las tecnologías convencionales.

Los primeros experimentos científicos relacionados con la aplicación de técnicas de reproducción asistida con fines reproductivos datan de 1780, cuando Spallanzani consiguió gestaciones en cánidos a partir del uso de inseminación artificial (YA). Su desarrollo posterior permitió que a finales de los años 30 ya se reprodujesen en USA miles de cabezas de ganado vacuno y ovino, usando técnicas reproductivas como la inseminación artificial y la criopreservación seminal de forma intensiva en sus explotaciones ganaderas (Polge et al., 1949; Betteridge, 2003; Ombet y van Robays, 2010).

La YA, a partir de semen fresco o crioconservado, ha tenido una gran importancia en el la producción y el mejoramiento genético de las especies animales mamíferas, especialmente en el ganado bovino y porcino, consiguiendo grandes producciones y mejoras de producto en un corto período de tiempo y así poder ser competitivo en un mercado tan exigente (Betteridge, 2003). La aplicación de técnicas de reproducción asistida en el ámbito ganadero aporta una serie de ventajas (Bailey, 2008):

- Mejor aprovechamiento de la muestra seminal, consiguiendo mediante la dilución de un único eyaculado diferentes dosis para inseminación o criopreservación.

- Diseñar programas de mejora genética, a partir de la búsqueda de semen procedente de nuevos machos reproductores; ayudando a mejorar la calidad de la descendencia, normalmente con el fin de mejorar la calidad de la carne o la calidad/producción de leche.
- Contar con un suministro permanente de muestras seminales congeladas de fertilidad probada, incrementa la fertilidad del rebaño y resulta mucho más económico que el mantenimiento del propio macho.
- Ayudar en la prevención y control de enfermedades ya que, en muchos casos, el semental no se encuentra en la granja.
- Uso de muestras de machos con problemas clínicos no reproductivos e incluso sementales ya fallecidos.
- Disponer de muestras congeladas procedentes de sementales de cualquier raza y lugar del mundo.

No obstante, dado el coste que supone para una explotación ganadera la implementación de tecnologías de reproducción asistida, hay que tener en cuenta que el semen es una de las inversiones más grandes que tiene un programa reproductivo ganadero. Por ello, es importante contar con procedimientos de trabajo contrastados y abiertos a cambios que ayuden a su optimización, con el objetivo de maximizar los resultados y rentabilizar el uso de los recursos (Bailey, 2008), cumpliendo con todos los protocolos y directrices establecidos, sobre todo cuando se emplean muestras de semen crioconservado, donde conviene prestar especial atención tanto al proceso de congelación como descongelación, si se quiere contar con óptimos resultados.



---

## 1.10

### Importancia de la criopreservación espermática en la preservación de especies

La conservación de especies consiste en la administración que el uso humano tiene de los recursos de la biosfera, de tal suerte que ella produzca el mayor provecho sustentable para las generaciones actuales, siempre manteniendo el potencial para satisfacer las necesidades y las aspiraciones de las generaciones futuras (FAO-UNESCO, 1980). La conservación toma así un sentido positivo, englobando la preservación, el mantenimiento, el uso sostenible, la restauración y el mejoramiento del ambiente natural (IUCN-UNEP-WWF y FAO-UNESCO, 1980).

Una gestión eficaz de la conservación en el ámbito mundial precisa de una serie de acciones entre las que se encuentran: la identificación y la enumeración de las razas, su descripción y caracterización, su seguimiento demográfico y riesgo de desaparición, aplicar estrategias de conservación in situ (mediante la protección de individuos vivos en su medio) o ex situ (a partir de la protección de los individuos vivos fuera de su medio natural o bien su patrimonio genético bajo la forma de semen, ovocitos, embriones, células madre, etc.), crear programas de educación y de formación sobre la conservación animal, fomentar leyes y políticas tanto de ámbito nacional e internacional, etc. (FAO, 1992, 2001a).

Las especies animales domésticas son importantes económicamente por su contribución a la producción alimentaria y agrícola (Tisdell, 2003). Gracias al proceso de domesticación, razas separadas y genéticamente únicas han sido desarrolladas para adaptarse al clima local y las demandas sociales (FAO, 1998a). Sin embargo, por razones como el cambio climático y la acción del ser humano, se generan cambios en el medioambiente críticos para su supervivencia. Aproximadamente el 30% de razas domésticas está en alto riesgo de desaparición, en tanto en cuanto pierden interés por parte de los productores (Maijala, 1984). Es el caso de regiones similares a Europa, donde la urbanización y la industrialización repercuten directamente en la producción agrícola y la importancia de este sector en su economía (Simon y Buchenaue, 1993). Por esta razón, la FAO promueve desde hace años el desarrollo de estrategias de conservación in situ y ex situ especialmente.

En este sentido, resulta de vital importancia garantizar la eficiencia de técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial y la congelación espermática (Leibo et al.,

2011), ya que una de las aplicaciones de mayor interés es la creación de germoplasmas para la preservación de especies animales.

En el caso de la especie humana, la preservación de la fertilidad masculina y femenina, también resulta especialmente importante en procesos oncológicos, quirúrgicos, edad y pérdida de potencial fértil.

II.

---

*M*ATERIAL *y*

*M*ÉTODOS

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia, desarrollados por personal cualificado y bajo supervisión, siguiendo los códigos de buenas prácticas veterinarias de acuerdo con la normativa española y europea (Code of Good Veterinary Practice, Federation of Veterinarians of Europe, www.fve.org. 2002).

---

## **2.1**

### **Diseño experimental**

Esta tesis incluye tres experiencias diferentes, cuyo objetivo común fue evaluar el efecto de la adición de GSH al medio de descongelación. Cada uno de los trabajos correspondió a una especie de mamífero diferente: porcino (Experiencia 1), bovino (Experiencia 2) y caprino (Experiencia 3). La metodología aplicada y las variables analizadas fueron similares en las tres experiencias, si bien en algunos casos se recurrió al uso de pruebas más específicas.

En la experiencia 1, se adicionó GSH a un pool de muestras seminales de varios verracos. En las experiencias 2 y 3, se adicionó GSH a cada muestra seminal por separado y se analizaron de forma independiente.

En todos los experimentos se trabajó con concentraciones finales de GSH 1 mM y GSH 5 mM, y se realizaron las medidas de los parámetros espermáticos tras los tiempos de incubación 0 y 30 minutos.

En el caso de la Experiencia 3, se incluyó un periodo de incubación con GSH más largo, 60 minutos y se estudió el efecto de la suplementación del medio de descongelación con la forma oxidada del glutatión (GSSG 2.5 mM) en concentraciones equivalentes a la forma reducida (GSH).

#### **Reactivos empleados.**

Salvo que se indique lo contrario, los medios y reactivos empleados se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid).

---

## 2.2

### Descripción del material biológico

#### Semen porcino.

Las muestras seminales empleadas en la experiencia 1 fueron suministradas desinteresadamente por la empresa ganadera Lo Navarro, SL (Murcia). Estas muestras procedieron de ocho verracos y se obtuvieron mediante la técnica de mano enguatada (King et al., 1973).

Durante la recolección del semen se descartó la primera fracción del eyaculado debido a su baja concentración de espermatozoides, de manera que tan solo se recogió la segunda fracción, con ayuda de un termo previamente atemperado a 37°C y cubierto con una gasa estéril para filtrar las secreciones gelatinosas y partículas contaminantes procedentes de las glándulas de Cowper. Posteriormente, las muestras fueron diluidas para su preservación en medio Betlsville thawing solution (BTS; Pursel y Johnson, 1975) a 37° C.

Una vez en el laboratorio, las muestras seminales se congelaron en pajuelas de 0.5 ml de volumen (IMV, Francia), siguiendo el método de Westendorf (1975), con algunas pequeñas modificaciones (Sellés et al., 2003). Para ello, el semen se centrifugó a 800 g durante 10 minutos y una vez descartado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en medio de congelación, elaborado a partir de lactosa y yema de huevo (80 ml a base del 11% de lactosa y 20 ml de yema de huevo). La muestra quedó con una concentración inicial de  $1.5 \times 10^9$  espermatozoides/ml y se mantuvo a 5°C durante 120 minutos. Después, se adicionó nuevamente medio de congelación (2:1) con un 9% de glicerol y un 1.5% de Equex-Paste (Minitub, Tiefenbach, Germany. La concentración final fue de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml y 3% de glicerol. A continuación, el semen se incluyó en las pajuelas y tras su sellado, se introdujeron en un biocongelador programable (Iccube 1800; Minitub, Germany). Concluido el ciclo de congelación, las muestras fueron guardadas en contenedores de nitrógeno líquido para su crioconservación a temperatura de -196°C.

En el proceso de descongelación, se seleccionaron 6 pajuelas procedentes de 3 verracos que fueron sumergidas en un baño térmico a 52°C durante 12 segundos (Selles et al., 2003). Con ayuda de unas tijeras, se vació el contenido de las pajuelas en un mismo tubo, se homogeneizó la mezcla y se repartió el volumen total en tres tubos con medio de

cultivo BTS: uno suplementado con GSH 1 mM, otro con GSH 5 mM y el último sin GSH (control). Antes de su análisis, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

### Semen bovino.

En la Experiencia 2, se utilizaron muestras congeladas procedentes de 6 toros de la raza Asturiana de Valles, amablemente suministradas por la asociación de ganaderos de esta raza, ASEAVA, (Gijón, Asturias).

Las pajuelas se descongelaron sumergiéndolas en un baño térmico a 37°C durante 30 segundos. A continuación, el contenido de cada pajuela se distribuyó en tres tubos con medio Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (sperm-TALP, Parrish et al., 1988): uno suplementado con GSH 1 mM, otro con GSH 5 mM y el último sin GSH (control). Antes de su análisis, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

### Semen caprino.

En la última Experiencia se usaron muestras congeladas procedentes de 7 machos cabríos de la raza Murciano-Granadina, generosamente cedidas por Ovigen (Toro, Zamora).

El proceso de descongelación se realizó introduciéndolas en un baño térmico a 37°C durante 30 segundos. Posteriormente, el contenido de cada pajuela se distribuyó en tres tubos con medio Tyrodes (sperm-TALP, Parrish et al., 1988): uno suplementado con GSH 1 mM, otro con GSH 5 mM y el último sin GSH (control). Antes de su análisis, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

En los ensayos de valoración de GSSG se adicionó otro tubo con una concentración final de GSSG 2.5 mM.

---

## **2.3**

### **Análisis microscópico de los parámetros seminales**

En la experiencia 1, se realizó un análisis directo y subjetivo del porcentaje de espermatozoides móviles y del tipo de movilidad. Se colocaron 2 gotas de cada muestra en un portaobjetos a 37°C y se evaluaron en el microscopio de campo claro. Para su valoración se estableció un porcentaje de espermatozoides móviles de 0 a 100. Mientras que para el

tipo de movimiento, se eligió un valor entre 0 y 5, siendo 0 el valor del espermatozoide inmóvil y 5 el del espermatozoide móvil progresivo (Gadea et al, 1998).

### **Análisis de la movilidad mediante análisis computerizado de imagen (CASA).**

El análisis de las muestras seminales mediante CASA se realizó con el sistema Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, Barcelona) en los experimentos 1 y 2, y con el sistema ISAS® (Proiser, Valencia) en el experimento 3.

En todos los casos, los parámetros de movilidad espermática estudiados fueron: el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, la velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), la velocidad rectilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), la velocidad media de la trayectoria (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), la linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN, ratio VSL/VCL, %), la progresividad (STR, ratio VSL/VAP, %), la amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m/s}$ ), el grado de desplazamiento curvilíneo (WOB, ratio VAP/VCL) y la frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz).

Para realizar la valoración, se colocaron 7  $\mu\text{l}$  de muestra sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C, se depositó un cubreobjetos de 24 x 24 mm y una vez estabilizada la gota, se situó en la placa calefactada del microscopio de contraste de fases. Las condiciones de medición se adaptaron para cada especie siguiendo las instrucciones del fabricante.

---

## **2.4**

### **Análisis mediante citometría de flujo**

Para los análisis de citometría de flujo se utilizó un equipo Coulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA), que usa como fuente de excitación un láser de argón de 15 mW capaz de excitar los fluorocromos a una longitud de onda de 488 nm. De forma habitual se trabajó con 4 mediciones por cada muestra. De esta manera, pasaron por el sistema un total de 10.000 células por muestra seminal evaluada. Los datos reportados por el citómetro fueron analizados mediante el software Expo 32ADC (Beckman Coulter Inc).

### Estudio de la capacitación espermática.

La capacitación espermática es un proceso complejo que implica, entre otros aspectos, cambios en la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide, caracterizados por una remodelación lipídica que puede ser detectada mediante el uso de marcadores como el fluorocromo Merocianina 540 (M540), junto con la evaluación de la viabilidad con el empleo del fluorocromo Yo-Pro 1 (Harrison et al., 1996)

En los ensayos se emplearon soluciones stock de M540 1 mM para valorar el desorden lipídico y Yo-Pro 1 de 25  $\mu$ M (Molecular Probes, Eugene, Ore.) para la detección de los espermatozoides viables, ambos fluorocromos diluidos en DMSO.

Según el protocolo, a cada muestra seminal de 1 ml y concentración de  $5-10 \times 10^6$  espermatozoides/ml, se le añaden 2.7  $\mu$ l de la solución stock M540 (concentración final 2.7  $\mu$ M) y 1  $\mu$ l de la solución stock Yo-Pro 1 (concentración final 25 nM). Antes de ser evaluadas, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

En el citómetro, la detección de la fluorescencia verde que emite el Yo-Pro 1 se fijó para el sensor FL1, que tiene un filtro de banda de 525 nm, mientras que la fluorescencia roja correspondiente al colorante Merocianina 540 fue recogida por el detector FL2 con un filtro de banda de 575 nm. De esta manera, el registro conjunto de la fluorescencia permitiría distinguir cuatro subpoblaciones diferentes de espermatozoides. Sin embargo, en nuestro caso se optó por establecer tres subpoblaciones espermáticas. La primera, caracterizada por baja intensidad de ambas fluorescencias, roja (FL2) y verde (FL1), que corresponde con bajo nivel de desorden lipídico y células vivas, por tanto, células viables no capacitadas. La segunda población viene dada por una alta intensidad de fluorescencia roja (FL2) y baja intensidad de verde (FL1), que corresponde con alto nivel de desorden lipídico y células vivas, es decir, células viables capacitadas. La tercera población se corresponde con una alta intensidad de fluorescencia verde (FL1), independientemente de la señal roja obtenida, se trata de células muertas.

### Estudio de la viabilidad espermática y del estado del acrosoma.

Para poder valorar simultáneamente la viabilidad espermática y el estado del acrosoma, se usaron lectinas unidas a tio-isocianato de fluoresceína (FITC) debido a su



afinidad por los azúcares de ciertas glicoproteínas de la membrana acrosomal. El fluorocromo ioduro de propidio (IP, 500 mg/ml) se empleó para diferenciar la población de espermatozoides viables, ya que se trata de una molécula con afinidad por el ADN, pero impermeable a las membranas espermáticas (Cross et al., 1989).

En las Experiencias 2 y 3, semen bovino y caprino, se empleó la lectina del *Pisum Sativum* *Arachis hypogea* ligada a FITC (FITC- PSA, 100 mg/ml). (Cross Y Meizel 1989). En todos los casos, siguiendo el protocolo, a cada muestra seminal de 1 ml y concentración de  $5-10 \times 10^6$  espermatozoides/ml se añadieron 5  $\mu$ l de IP y 2  $\mu$ l de la lectina correspondiente unida a FITC. Antes de ser evaluadas, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

En el citómetro de flujo, la señal de detección para la fluorescencia emitida por el FITC se fijó en el sensor FL1 a 525 nm. Mientras que para la detección de IP, se emplearon el sensor FL-2 a 575 nm (experiencia 2) o el sensor FL-3 a 650 nm (experiencia 3).

Las cuatro regiones generadas por las señales de fluorescencia se agruparon en tres poblaciones espermáticas. La primera, caracterizada por una baja señal de ambos fluorocromos, se corresponde con aquellos espermatozoides vivos de acrosoma intacto. La segunda población, caracterizada por una baja señal de IP y elevada señal de Yo-Pro, se corresponde con los espermatozoides vivos y acrosoma dañado. La tercera población, de espermatozoides marcados intensamente con IP, es la correspondiente a los espermatozoides no viables, independientemente del estado del acrosoma.

### **Estudio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).**

Con el fin de evaluar la acción de ERO, en todos los trabajos se recurrió al uso de un marcaje simple con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ). Se trata de una molécula permeable a la membrana plasmática y capaz de emitir señal fluorescente tras su esterificación intracelular por acción de radicales libres (Gadea et al., 2005).

En el protocolo experimental, a 1 ml de muestra seminal con una concentración de  $5 \times 10^6$  espermatozoide/ml se añadió  $H_2DCFDA$  (0.5  $\mu$ M). Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 minutos en la Experiencia 2 y durante 30, 60 y 90 minutos en las Experiencias 1 y 3.

En el citómetro de flujo, la fluorescencia emitida se analizó fijando el sensor FL1 para un filtro de paso de 525 nm. De manera que, el incremento medio de fluorescencia obtenido, calculado a partir de la intensidad de señal emitida por cada espermatozoide, fue empleado como índice de generación de ERO. Valores por encima de este índice estarían asociados a un aumento de la actividad oxidativa.

### Medida de los grupos sulfhidrilo de proteínas localizadas en la membrana plasmática.

La acción de radicales libres sobre la membrana plasmática del espermatozoide puede afectar a las proteínas localizadas en la misma, algunas de estas alteraciones se detectan mediante el uso de fluorocromos específicos. En la Experiencia 1 (porcino), se utilizó el fluorocromo 5-iodoacetamidofluoresceína (5-IAF), capaz de unirse de forma específica a los grupos tioles libres de las proteínas de la membrana para generar conjugados fluorescente (Gadea et al., 2005).

El protocolo empleó dos fluorocromos, el 5-IAF para valorar las alteraciones en la membrana y el IP para determinar los espermatozoides viables. Se añadieron 5 µl de 5-IAF (500 µM) y 5 µl de IP (500 mg/ml) a 1 ml de muestra con una concentración de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. A continuación, se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

En el análisis por citometría de flujo, la fluorescencia emitida por el 5-IAF se registró en FL-1, usando un filtro para una longitud de onda de 525 nm y la fluorescencia correspondiente al IP se registró en FL-3, con un filtro de paso de 650 nm.

Los resultados de fluorescencia permitieron definir tres subpoblaciones: una población de espermatozoides vivos con alta emisión de fluorescencia para el 5-IAF, son espermatozoides con membrana alterada; otra población de espermatozoides vivos con baja emisión de fluorescencia para el 5-IAF, se trata de espermatozoides con membrana no alterada y por último, la población de los espermatozoides no viables, caracterizada por presentar una alta señal para el IP.

### Determinación de la condensación de cromatina.

En las tres experiencias, se determinó la condensación de la cromatina espermática mediante el uso de IP y citometría de flujo (Molina et al., 2001). Debido a la impermeabilidad de las membranas al IP, el protocolo precisa un paso previo de permeabilización. Para ello, las muestras espermáticas, previamente centrifugadas, se incluyeron en una mezcla de etanol y medio salino PBS (phosphate buffered saline) 70/30 v/v durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en una solución de IP (10 mg/ml en PBS) durante una hora. La concentración final de la muestra fue de  $5-10 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Para el análisis por citometría de flujo, la detección de la señal para el IP se fijó en FL3 con filtro de 650 nm. La intensidad media registrada, calculada a partir de la intensidad de señal detectada para cada espermatozoide, se consideró como el índice de condensación de cromatina. Valores por encima de este índice estarían asociados a una cromatina menos condensada.

### Evaluación de la fragmentación del ADN espermático mediante TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

En la experiencia 2 (bovino) se evaluó el grado de fragmentación del ADN espermático mediante la técnica TUNEL. (Li et al., 1995).

En el protocolo empleado, las muestras espermáticas ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml) se resuspendieron en una mezcla de etanol y PBS (70/30 v/v), durante toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$  para su permeabilización. Posteriormente, se centrifugaron dos veces en PBS y los pellets se incubaron durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene: 10  $\mu\text{l}$  de solución tamponada (Invitrogen, Barcelona), 1  $\mu\text{l}$  de la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT, Invitrogen), 0.25 nmoles del nucleótido dUTP ligado a fluoresceína (BODIPY<sup>®</sup>-FL-X-14-dUTP, Molecular Probes) y 39  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Como control negativo se tomaron muestras igualmente procesadas pero incubadas en ausencia de la enzima.

El análisis se realizó mediante citometría de flujo, de manera que la señal de fluoresceína registrada en FL1, con filtro de 525 nm, permitió definir dos subpoblaciones espermáticas: la población de espermatozoides que presentaron alta señal de

fluorescencia, correspondiente a una elevada fragmentación en el ADN; y la de aquellos espermatozoides que mostraron una baja señal de fluorescencia, relacionada con poca fragmentación en su ADN. Como parámetro de medida se tomó el valor medio de la fluorescencia verde registrada (FL1), calculado a partir de la intensidad de señal detectada para cada espermatozoide. Este valor se define como índice de fragmentación del ADN espermático y un incremento del mismo se relaciona con un aumento de la fragmentación del ADN.

### Evaluación de la fragmentación del ADN espermático mediante SCSA (sperm chromatin structure assay).

El test SCSA es una técnica de análisis de la fragmentación del ADN, basada en la detección de la fluorescencia emitida por el fluorocromo naranja de acridina (NA) en espermatozoides sometidos a un tratamiento ácido (Evenson et al., 1994). Este fluorocromo tiene la particularidad de emitir señales de fluorescencia de color verde si se une ADN de cadena doble y fluorescencia en el espectro rojo si se une a cadenas sencillas de ADN. Esta característica permite definir una relación entre la medida de fluorescencia roja y el total de fluorescencia emitida (roja más verde) en cada una de las células estudiadas (Evenson, 1989).

En nuestro caso, el test SCSA se desarrolló únicamente en la Experiencia 2 (Bovino), siguiendo el protocolo descrito por Evenson et al. (1994). Para ello, las muestras descongeladas se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en la solución denominada TNE, compuesta por 0.15 M de NaCl, 1 mM EDTA y 10 mM de Tris (pH 7.2), quedando una concentración final de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. A continuación, con el fin de permeabilizar la membrana y aplicar el tratamiento ácido al ADN, la muestra se diluyó en una solución (1:2) compuesta por 0.1% Tritón X-100, 0.15 M NaCl y 0.08 M HCl (pH 1.4). Una vez transcurridos 30 segundos, se añadió 1.2 ml de una solución de: NA 6 mg/ml, 0.15 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 0.2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.1 M de ácido cítrico (pH 6.0), para teñir los espermatozoides.

En el citómetro de flujo, la señal para NA unido a cadena doble (espectro verde) se registró en FL1 y la señal para NA unido a cadena sencilla (espectro rojo) en FL3. El grado de fragmentación del ADN vendría dado por la señal para la fluorescencia roja en FL3 (cadena sencilla) respecto del total (FL1+FL3), para cada uno de los espermatozoides de la muestra.

Este ratio se expresa como  $\alpha t$  y su valor medio para el total de espermatozoides analizados se expresa como  $X-\alpha t$ . Es el denominado “índice de fragmentación de x-DNA” o X-DFI (Evenson et al., 2002).

Por tanto, el X-DFI se puede entender como el porcentaje de fragmentación medio de una muestra, calculado a partir de la fragmentación encontrada ( $\alpha t$ ) en cada uno de los espermatozoides analizados.

Mediante el SCSA, también es posible definir otros dos parámetros a partir de  $\alpha t$ : el SD-DFI y el DFI (Evenson, 1999). El SD-DFI corresponde a la desviación estándar calculada para el valor de  $\alpha t$  (antes denominado  $SD\alpha t$ ). El DFI hace referencia al porcentaje de espermatozoides con fluorescencia anormalmente elevada (antes denominado  $COMP\alpha t$ ) y correspondería a la subpoblación espermática de la muestra con elevados niveles de fragmentación (Evenson et al., 2002).

---

## 2.5

### Test de fecundación in Vitro

En las experiencias 1 y 2 del presente trabajo, se analizó la capacidad de fecundación in vitro de las muestras de semen porcino y bovino descongeladas en presencia o ausencia de GSH.

#### Penetración in Vitro en porcino (Experiencia 1).

Se utilizaron ovarios procedentes de hembras prepúberes de razas comerciales, de 90 a 95 kg de peso vivo, sacrificadas en el matadero (Gadea et al., 1998).

Con el fin de asegurar el buen estado de los ovarios desde el matadero al laboratorio, el transporte se realizó en aproximadamente 30 minutos, manteniendo los medios a 37°C. Tanto para el transporte de ovarios, como para la obtención y lavado de los ovocitos inmaduros se empleó solución salina fosfatada de Dulbecco (PBS), suplementada con 0'4% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA), 0'34 mM de piruvato sódico, 5'5 mM de glucosa y 70 mg/ml de kanamicina (DPBSm; Mattioli et al., 1988).

Una vez en el laboratorio, los ovocitos se obtuvieron directamente, mediante laceración con bisturí, de los folículos ováricos no atrésicos de 3-6 mm de diámetro, recogiendo el líquido folicular en placas de petri con medio PBS. Tras su observación en el

estereomicroscopio, se seleccionaron los ovocitos con mejor morfología y se lavaron con medio de fecundación, previamente equilibrado durante 3 horas a 38,5°C y atmósfera controlada del 5 % en CO<sub>2</sub>.

Paralelamente, las muestras seminales se descongelaron e incubaron en ausencia (grupo control) y presencia de GSH (30 minutos a 37°C), se centrifugaron (1200 g, 3 minutos) y el pellet se resuspendió en medio de fecundación TALP modificado (Rath et al., 1999).

La fecundación in vitro se realizó coincubando grupos de 15 ovocitos inmaduros con 2 ml de medio FIV y una concentración de 10<sup>7</sup> espermatozoides/ml, durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, los ovocitos, se desnudaron mediante pipeteo y se fijaron en portaobjetos con una solución de etanol: acético (3:1, v/v).

La valoración de la fecundación se realizó al microscopio óptico de contraste de fases, utilizando para ello una solución de lacmoid al 1%. Esta tinción permite la observación de las cabezas espermáticas y sus colas dentro del citoplasma, de manera que tan sólo se consideró que un ovocito maduro había sido penetrado, cuando en su interior fue posible observar las cabezas espermáticas (descondensadas o no), con sus correspondientes flagelos; también con la presencia de los pronúcleos masculino y femenino, junto a los dos corpúsculos polares (Chang, 1952; Gadea et al., 1998).

Los parámetros analizados fueron: el porcentaje de ovocitos penetrados, el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado y el porcentaje de espermatozoides descondensados.

### **Fecundación in vitro y Cultivo embrionario en bovino (Experiencia 2).**

En el caso del semen bovino, además del ensayo para evaluar el efecto de la adición de GSH en el medio de descongelación sobre la capacidad fecundante, se estudió el desarrollo embrionario in vitro hasta el estadio de blastocisto.

Los ovocitos bovinos obtenidos a partir de ovarios de matadero, se maduraron in vitro (MIV) siguiendo el protocolo descrito por Coy et al. (2005). Para ello, aquellos ovocitos inmaduros, procedentes de folículos antrales de 3-8 mm de diámetro, se incubaron en grupos de 30-40, en 500 ml de medio de MIV (M199, 10% v/v suero fetal bovino, 2 mmol/l L-glutamina, 0.2 mmol/l L-piruvato sódico, 50 mg/ml gentamicina, 0.3 mg/ml LH y 50 mg/ml FSH) durante 24 horas, a una temperatura 38,5°C y atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

Paralelamente, las muestras seminales de toro se descongelaron e incubaron en ausencia (grupo control) y presencia de GSH (30 minutos a 37°C), se centrifugaron (1200 g, 3 minutos) y el pellet se resuspendió en medio de fecundación (IVF-TALP, Parrish et al., 1988).

Para la FIV, una vez madurados, los ovocitos se coincubaron en medio de FIV (IVF-TALP, Parrish et al., 1988) con una concentración de  $10^6$  espermatozoides/ml, durante 18 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de la FIV, parte de los ovocitos inseminados se desnudaron mecánicamente mediante pipeteo y se fijaron con etanol: acético (3:1, v/v). A continuación, se tiñeron con el fluorocromo Hoechst 33342 (10 mg/ml; 20 minutos) para poder valorar su fecundación.

Otra parte de los ovocitos inseminados, se desnudaron y cultivaron en 500 µl de medio de cultivo KSOM (94.7 mM NaCl, 2.50 mM KCl, 1.71 mM CaCl, 0.20 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.35 mM KHPO<sub>4</sub>, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 21.09 lactato sódico, 0.6 mM piruvato sódico, 73.1 mM L-glutamina, 3 mg/ml EDTA, 0.2 mM D-glucosa, 1% BME, 1% MEM y 50 µg/ml gentamicina sulfato) suplementado con 3 mg/ml de BSA, durante 7 días, hasta el estadio de blastocisto, a 39°C en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>). La valoración del desarrollo embrionario tras la primera división (cleavage) se realizó cada 48 horas hasta el día 7, en el que los blastocistos se fijaron sobre portaobjetos con etanol: acético (3:1, v/v) para su posterior valoración con Hoechst 33342 (10 mg/ml; 20 minutos).

Entre los parámetros valorados en la fecundación in vitro se incluyó: el porcentaje de ovocitos penetrados, el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado y el porcentaje de espermatozoides descondensados. En el cultivo embrionario se valoró el porcentaje de embriones que evolucionaron hasta el estadio de: 2-4 células, 8-16 células, mórula y blastocisto.

---

## 2.6

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y fueron estudiados mediante análisis de la varianza (ANOVA), considerando como variables principales: el tratamiento, el individuo o mezcla de individuos (experiencia 1) y el tiempo.

La normalidad en la distribución de los datos se evaluó mediante el test Shapiro-Wilk, de manera que para las muestras que no presentaron una distribución normal de datos, se realizó una transformación arcoseno para cumplir los requisitos de normalidad y poder ser analizadas mediante ANOVA.

Las diferencias encontradas con los análisis de datos por ANOVA se consideraron estadísticamente significativas con una probabilidad de 0.05, las diferencias entre grupos experimentales fueron analizadas mediante test post hoc (test de Fisher, experiencia 1; test de Tukey, experiencia 2 y 3), para  $p < 0.05$ .

Todos los análisis se realizaron con la ayuda del software para análisis de datos SPSS 15.0 (SPSS inc., USA).



III.

---

# *R*ESULTADOS

---

### 3.1

#### Efecto de la adición de glutatión sobre la movilidad espermática

En cuanto a la movilidad y características del movimiento, medidas tanto con observación microscópica directa como con CASA, la adición de GSH 1 mM y GSH 5 mM afectó de forma diferente en las especies estudiadas.

En el caso del porcino (Experiencia 1), no se evidenció efecto alguno tras la suplementación con GSH en el medio de descongelación (Anexo I: Tabla 1 y 2,  $p > 0.05$ ). Para la especie bovina (Experiencia 2), se detectó una disminución de los parámetros STR y BCF en el grupo de GSH 1 mM frente a los grupos control y GSH 5 mM (Anexo II: Tabla 1,  $p < 0.05$ ). En espermatozoides de macho cabrío (Experiencia 3), se observó un aumento de la movilidad total, de la movilidad progresiva y del valor de ALH, en los grupos GSH 1 mM y GSH 5 mM, en comparación con el grupo control (Anexo III: Tabla 1,  $p < 0.01$ ).

En la Experiencia 3, también se evaluó la adición de glutatión en su forma oxidada (GSSG 2,5 mM) y a diferentes tiempos de coincubación (0, 30 y 60 minutos). Los resultados mostraron que tan sólo las muestras espermáticas coincubadas con glutatión en su forma reducida (GSH) mejoraron significativamente sus porcentajes de espermatozoides móviles totales y progresivos (Anexo III: Tablas 6 y 7,  $p < 0.01$ ).

En los tres estudios, se detecta una variabilidad de los resultados, asociada al pool de muestras en porcino y al macho utilizado en bovino y caprino. Este efecto del macho es significativo para la mayor parte de los parámetros estudiados mediante el análisis de varianza.

---

### 3.2

#### Efecto de la adición de glutatión en la viabilidad y el desorden lipídico de la membrana espermática

La adición de GSH tuvo efecto sobre los parámetros de viabilidad y desorden lipídico de las membranas en las tres especies estudiadas.

En el caso de bovino y caprino, la adición de GSH indujo un incremento en el porcentaje de espermatozoides viables con bajo desorden lipídico, una reducción del

porcentaje de células no viables y no se vio afectado el porcentaje de células viables con alto grado de desorden lipídico. En bovino, el efecto de la adición resultó significativo cuando la concentración de GSH fue de 5 mM (Anexo II: Tabla 2,  $p < 0.01$ ), mientras que, en caprino, las concentraciones de 1 mM y 5 mM tuvieron un efecto similar (Anexo III: Tabla 2,  $p < 0.05$ ).

Sin embargo, en las muestras porcinas, la acción de la GSH sólo se hizo evidente en el porcentaje de espermatozoides viables con alto desorden lipídico, que se vio reducido con la adición de GSH, siendo éste un efecto dependiente de su concentración (Anexo I: Tabla 3,  $p < 0.01$ ).

---

### 3.3

#### Efecto de la adición de glutatión sobre la viabilidad y el estado del acrosoma

En el estudio con espermatozoides de toro, la adición de GSH al medio de descongelación no evidenció efecto alguno para cualquier concentración de GSH (Anexo II. Tabla 4,  $p > 0.05$ ).

En el estudio caprino, la incubación en presencia de GSH 5 mM supuso un incremento de la proporción de células viables con acrosoma intacto y un descenso en el porcentaje de células inviables (Anexo III. Tabla 3,  $p < 0.01$ ). Sin embargo, este efecto no se observó cuando el glutatión fue adicionado en forma oxidada (GSSG) (Anexo III: Tabla 8 y 9,  $p > 0.05$ ).

---

### 3.4

#### Efecto de la adición de glutatión en la generación de ERO

La presencia de GSH, redujo significativamente los niveles medios de producción de ERO, con respecto a los grupos control, en todas las especies y en todos los tiempos de incubación. Esta respuesta fue dependiente de la concentración de GSH adicionada, en los estudios de porcino y bovino (Anexo I: Tabla 5;  $p < 0.0001$ . Anexo II: Tabla 3;  $p < 0.01$ ). En los espermatozoides de caprino, no hubo diferencia entre GSH 1 mM y 5 mM y para ambas concentraciones la generación de ERO fue menor que el control (Anexo III: Tabla 4,  $p < 0.01$ ). La adición de 2.5 mM de GSSG a muestras caprinas, a diferencia del GSH, no repercutió en los

niveles de producción de ERO, independientemente del tiempo de incubación (Anexo III: Tabla 10).

---

### **3.5**

#### **Efecto de la adición glutatión en la presencia de grupos sulfhidrilo en las proteínas de la membrana espermática**

En la especie porcina, la adición de GSH produjo una reducción del porcentaje de células viables con alteraciones en los grupos sulfhidrilo de las proteínas de su membrana (Anexo I: Tabla 4,  $p=0.004$ ). Las diferencias alcanzaron significación estadística, respecto al control, para la concentración de GSH 5 mM.

---

### **3.6**

#### **Efecto de la adición de GSH en la integridad del ADN espermático y en la condensación de la cromatina**

La condensación de la cromatina, se redujo de forma similar, en las muestras de porcino y bovino estudiadas, detectándose un incremento significativo de la señal fluorescente (inversamente proporcional al grado de condensación) del 14% al incubar en presencia de GSH 1 mM. Éste incremento de señal alcanzo el 18% y 24% al incubar las muestras en presencia de GSH 5 mM (Anexo II, Tabla 5,  $p<0.01$ ).

Los resultados obtenidos para la especie caprina resultaron igual que los de las otras especies, de manera que, la incubación con GSH supuso un incremento significativo en el grado de condensación de la cromatina (Anexo III, Tabla 5,  $p<0.01$ ).

En las muestras bovinas, la adición de GSH mostró un aumento en la estabilidad de la cromatina evaluada mediante SCSA, así como una reducción de la fragmentación del ADN analizada por TUNEL. En ambos parámetros, la diferencia resultó estadísticamente significativa con respecto al control, independiente de la concentración de GSH (Anexo II: Tabla 5,  $p<0.01$ ).

---

### 3.7

#### **Efecto de la adición GSH en la capacidad de penetración y fecundación in vitro**

En el caso del porcino y el bovino, se aprovechó el sistema de cultivo in vitro implementado en el laboratorio, para realizar diversos ensayos funcionales adicionando GSH al medio de descongelación y midiendo el potencial fértil de las muestras seminales.

##### Ensayo de capacidad de penetración in vitro en porcino.

En el verraco, la presencia de GSH evidenció un incremento dosis-dependiente en la capacidad de los espermatozoides para penetrar ovocitos inmaduros y descondensar su ADN (Anexo I: Tabla 6,  $p < 0.01$ ).

##### Ensayo de capacidad de fecundación in vitro y desarrollo embrionario en bovino.

Las muestras de toro también incrementaron el porcentaje de penetración, independientemente de la concentración utilizada (Anexo II: Tabla 6,  $p < 0.01$ ). En esta especie, la concentración de GSH 5 mM, hizo aumentar de forma significativa, con respecto al control, el porcentaje de embriones evolutivos en todas las fases de división estudiadas (embriones de 2-4 células, embriones de 8-16 células, mórulas y blastocistos) (Anexo II: Tabla 7,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se detectaron diferencias en cuanto al número total de células contabilizadas por blastocisto.

IV.

---

# *D*ISCUSIÓN

## Efectos de la congelación y descongelación en las muestras seminales.

Numerosos estudios han demostrado que la criopreservación de espermatozoides afecta directamente a la supervivencia celular, debido al descenso de la temperatura, los cambios osmóticos y el estrés oxidativo (Polge y Jakobsen, 1959). Pero también comprometen la funcionalidad de las células supervivientes, alterando la estabilidad e integridad de las membranas y del ADN (Pursel y Johnson, 1975; Watson, 2000). Entre los mecanismos responsables de estas alteraciones destacan la apoptosis celular y la acción de radicales libres (Thomson et al., 2009).

En este trabajo, desarrollado durante años con muestras seminales criopreservadas de diversas especies, se constata este hecho ya que para todos los casos, se encontró un descenso significativo de los parámetros seminales, de la viabilidad y del potencial fértil de las muestras criopreservadas con respecto al semen en fresco. Lo que nos hace pensar en la existencia de procesos de apoptosis y de estrés oxidativo debido al incremento de ERO y la pérdida de poder antioxidante (Bilodeau et al., 2000; Peris et al., 2007).

El origen de este estrés oxidativo ha sido estudiado en profundidad por diferentes autores (Ball et al., 2001; Chatterjee et al., 2001; Gadea et al., 2004; Thomson et al., 2009), encontrando que los espermatozoides incrementan la producción de radicales libres como respuesta al descenso de temperatura que tiene lugar durante la manipulación de las muestras y su criopreservación, especialmente en temperaturas cercanas a los 4°C (Wang et al., 1997). Por su parte, Shina et al. (1996) postulan que, durante la descongelación, los espermatozoides experimentan un aumento súbito en la presencia y consumo de oxígeno con respecto a su estado metabólico previo, que puede ser responsable del incremento descrito en la formación de radicales libres. Este dato coincide con nuestros resultados, puesto que los ensayos de medida realizados para la detección de la oxidación de H<sub>2</sub>DCFDA por citometría de flujo, mostraron un incremento de fluorescencia durante la descongelación, coincidente con un aumento de la actividad oxidativa de ERO (Ameziane-El-Hassani, et al., 2010).

Gran parte del estrés oxidativo, detectado durante la congelación y descongelación de muestras seminales, se debe también a la pérdida de plasma seminal (Grizard et al., 1999). El propio protocolo de congelación incluye diluciones y centrifugaciones que generan estrés oxidativo y eliminan buena parte del mismo (Iwasaki et al., 1992; Agarwal et al., 2006; Martínez-Soto et al., 2011; Ko et al., 2014). Este hecho es relevante, sobre todo en eyaculados

donde la calidad y el potencial fértil se encuentran algo mermados, ya que parte de sus espermatozoides han iniciado procesos apoptóticos, o cuentan con unas membranas y un ADN más sensibles a la acción de radicales libres (Aitken et al., 1998; Martínez-Soto et al., 2013; Yeste et al., 2014).

Puesto que el plasma seminal es una fuente importante de antioxidantes con actividad enzimática y no enzimática (Álvarez y Storey, 1989; Aitken et al., 1994; Fingurova et al., 2007; Tremellen, 2008; Juyena y Stelleta, 2012), una alternativa efectiva para combatir la pérdida de antioxidantes durante la criopreservación es adicionarlos de forma exógena (Agarwal et al., 2013; Estrada et al., 2014).

En este sentido, el glutatión es uno de los antioxidantes más importantes para el espermatozoide, pese a que su contenido intracelular es escaso (Gómez et al., 1996). La mayor parte del glutatión que forma parte del sistema antioxidante espermático se encuentra en el plasma seminal, de manera que, al retirarlo de la muestra, eliminamos gran parte del mismo (Luberda et al., 2005).

Se ha descrito que el proceso de congelación y descongelación implica una reducción de la concentración seminal de glutatión en bovino (Bilodeau et al., 2000), porcino (Gadea et al., 2004) y humano (Gadea et al. 2011). Por tanto, no es de extrañar que su adición sea una de las alternativas más razonables en la criopreservación (Álvarez y Storey, 1989; Nishimura y Morii, 1993; Irvine, 1996).

### **Resultado de la adición de glutatión como antioxidante al medio de descongelación.**

La adición de glutatión ha demostrado ser eficaz en la criopreservación de muestras seminales en porcino (Gadea et al., 2004, 2005; Estrada et al., 2014; Giarreta et al., 2014; Yeste et al., 2014), bovino (Gadea et al., 2008; Perumal et al., 2011; Ansari et al., 2012), caprino (Shina et al., 1996; Gadea et al., 2013), ovino (Bucak et al., 2008; Camara et al., 2011) y humano (Lopes et al., 1998; Kefer et al., 2009; Gadea et al., 2011). Aunque existen trabajos que destacan efectos inocuos o contraproducentes en parámetros concretos; para ciertas especies y concentraciones de GSH (Donnelly et al., 1999; Gadea et al., 2004; Camara et al., 2011; Silva et al., 2011; Soares et al., 2011; Mata-Campuzano, 2014)

Gadea et al., (2005) demostraron un efecto dosis dependiente con la adición de GSH 1 mM y GSH 5 mM al medio de congelación, mejorando la movilidad y viabilidad de las



muestras, consiguiendo un menor desorden lipídico en espermatozoides viables y un descenso de los cambios en los grupos sulfhidrilo de membrana. La acción protectora del GSH no se observó durante la fase de refrigeración en el proceso de congelación a 15°C (Gadea y Matás, 2000).

Los estudios posteriores de adición de glutatión, únicamente durante la descongelación de las muestras, constituyen la presente tesis. En estos trabajos se recurrió al uso de técnicas empleadas anteriormente, como la citometría de flujo o el CASA, que permiten una evaluación más objetiva, precisa, reproducible y completa que la de técnicas más clásicas de microscopía (Silva et al., 2006).

La adición de GSH al semen porcino (experiencia 1) demostró un descenso de los espermatozoides viables capacitados, un menor número de espermatozoides con cambios en los grupos sulfhidrilo de sus proteínas de membranas, una menor condensación de la cromatina, una reducción en la producción de ERO y un incremento de la fertilidad espermática (un mayor número de ovocitos penetrados y con cabezas espermáticas descondensadas). Por el contrario, no se hallaron modificaciones significativas en la movilidad, ni sus parámetros evaluados por CASA.

En el caso de semen bovino (experiencia 2), el GSH evidenció un efecto positivo en el número de espermatozoides viables sin desorden lipídico de su membrana, una reducción en la producción de ERO, un descenso de la condensación de la cromatina, una menor fragmentación del ADN, una mayor capacidad para fecundar y mejor desarrollo embrionario in vitro. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes en los parámetros de movilidad, o los fenómenos de reacción acrosómica espontánea.

En los ensayos de caprino (Experiencia 3), la adición de GSH incrementó la movilidad y viabilidad espermática, disminuyó el desorden lipídico en los espermatozoides viables, protegió la integridad del acrosoma, disminuyó la condensación de la cromatina y la producción de ERO. Por otro lado, la adición de GSSG no reportó cambios significativos a diferencia del GSH.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la adición de GSH, para las concentraciones y tiempos de incubación empleados, resultó positiva en las tres especies estudiadas y en la mayor parte de los parámetros analizados. El efecto fue algo más pronunciado para la concentración de 5 mM y el factor macho también resultó importante.

## Análisis de la movilidad mediante CASA.

El proceso de criopreservación implica una pérdida en la movilidad de las muestras, debida principalmente a la apoptosis (Paasch et al., 2004; Martin et al., 2004; Wundrich et al., 2006) y la acción de radicales libres sobre las membranas, el ADN y las mitocondrias (Aitken et al., 2004). Algunas de estas alteraciones pueden inactivar parte de las enzimas implicadas en la glicólisis, originando una pérdida energética en el flagelo (Armstrong et al., 1999; Baumber et al., 2000).

Esta pérdida de movilidad es un hecho bien descrito en el espermatozoide de las especies estudiadas en este trabajo: porcino (Pursel y Johson, 1975; Nishimura y Morii, 1993; Bailey et al., 2000; Gadea et al., 2004; Roca et al., 2005; Estrada et al., 2014), Bovino (Bilodeau et al., 2000; Chatterjee et al., 2001) y caprino (Shina et al., 1996; Gadea et al., 2013; Mata-Campuzano et al., 2014). Muchos de estos autores también han publicado efectos positivos en la movilidad espermática, gracias a la adición de diferentes antioxidantes, incluido el glutatión (Agarwal et al., 2013). Sin embargo, en nuestro caso tan sólo hubo efecto positivo, independientemente de la concentración de GSH, en las muestras seminales de caprino (Experiencia 3).

En las experiencias 1 y 2, la adición de GSH no mostró efecto alguno en la concentración y tiempo de incubación, al igual que reportan algunos trabajos (Gadea et al., 2004; Marco-Jiménez et al., 2006; Cámara et al., 2011; Hussain et al., 2013), pero este hecho no se corresponde con el incremento detectado de radicales libres en las muestras y los resultados reportados por otros autores (Álvarez y Storey, 1989; Irvine, 1996; Lindemann et al., 1988; Bilodeau et al., 2001; Foote et al., 2002; Gadea et al., 2004). Esta circunstancia podría deberse a periodos de incubación demasiado cortos para detectar un efecto protector del glutatión o para que el espermatozoide porcino y bovino reconstituya un estado fisiológico similar al que tenía previo a la congelación. En estos trabajos el tiempo de incubación fue de 30 minutos, mientras que otros autores emplearon tiempos de 6 horas (Bilodeau et al., 2001) ó 12 horas (Lindemann et al., 1988).

En el caso de la experiencia 1, trabajar con un pool de muestras pudo enmascarar el efecto individualizado de la alteración en la movilidad espermática en determinados machos, a la vez que, en el resto de experiencias, los resultados también mostraron correlación con el semental empleado (Meseguer et al., 2004). Aunque el efecto macho se analizará más adelante, algunos trabajos ya destacan que la sensibilidad del espermatozoide a la acción de

radicales libres varía entre especies e individuos (Ramos y Wetzels, 2001; Bilodeau et al., 2002), incluso en subpoblaciones espermáticas del mismo eyaculado (Thurston et al., 2002).

### Evaluación de la función espermática.

Entre los ensayos más interesantes destacan los realizados con citometría de flujo. En ellos se evaluó el efecto de la adición de glutatión en las modificaciones que sufren los espermatozoides con respecto a la estructura y funcionalidad de su membrana plasmática durante el proceso de descongelación.

Tanto la capacitación como la reacción acrosómica son dos fenómenos fisiológicos exclusivos de la célula espermática, relacionados con la funcionalidad de la membrana plasmática y necesarios para el proceso de fecundación (Yanagimachi, 2012). No son mecanismos del todo conocidos, pero se sabe que implican cambios en la membrana, haciendo al espermatozoide susceptible a la acción de radicales libres (de Lamirande et al., 1997; Aitken et al., 1989). La congelación y descongelación seminal también generan cambios en la composición y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide (Jones et al., 1979; de Lamirande y Gagnon, 1995), fundamentalmente como resultado de la acción de radicales libres a través de fenómenos de peroxidación lipídica (Álvarez y Storey, 1989).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo induce procesos de capacitación y reacción acrosómica espontánea (Aitken et al., 1989; Grievau y Le Lannou, 1997). En ocasiones es posible que sólo tengan lugar modificaciones en la membrana sin llegar a existir reacción acrosómica, de manera que sólo se ven afectados los primeros pasos del proceso (de Lamirande et al., 1997; O'Flaherty et al., 2005). De hecho, Watson (1995) sugiere que el proceso de congelación seminal modifica los lípidos de membrana, de forma que los espermatozoides adquieren un estado de pre-capacitación durante el proceso de congelación (Bailey et al., 2000).

A pesar de los efectos perjudiciales descritos, algunos autores defienden que los espermatozoides precisan pequeños niveles de radicales libres en el medio para poder llevar a cabo los mecanismos fisiológicos que implican la activación de estos procesos in vivo (de Lamirande y Gagnon, 1993).

En nuestro trabajo, el análisis de los parámetros de movilidad mediante CASA no reveló cambios en los patrones de movimiento que se correspondiesen con espermatozoides

capacitados (de Lamirande 1997; Luna et al., 2015). Por el contrario, la adición de GSH al medio de descongelación sí mostró un incremento en el número de espermatozoides con bajo desorden lipídico en sus membranas, característico del proceso de capacitación (Harrison et al., 1996). Mientras que en los ensayos de valoración de reacción acrosómica (Experiencia 2 y 3), la presencia de GSH tan sólo fue positiva para los espermatozoides de caprino.

El efecto del GSH, en estos resultados, coincide con el descenso en la producción de ERO que experimentaron las muestras en los ensayos de detección de H<sub>2</sub>DCFDA. Esto demuestra que gran parte de la capacidad del GSH para proteger la estabilidad y funcionalidad de las membranas, puede deberse a su potencial antioxidante, que interfiere o bloquea la acción de los radicales libres en procesos que generan estrés oxidativo, por ejemplo, la criopreservación.

A diferencia de lo que sucede en los mecanismos que rigen la movilidad espermática, la sensibilidad a los radicales libres parece ser mayor en el caso de procesos como la capacitación y la reacción acrosómica. Este hecho puede ser debido a que, en dichos procesos, participan componentes celulares más sensibles y susceptibles de perder su configuración molecular. Puesto que no se tiene constancia de que el glutatión participe en la capacitación o la reacción acrosómica, es más lógico pensar que el efecto positivo encontrado se debe a su acción sobre los radicales libres.

Este razonamiento coincide con los resultados encontrados en la valoración de la oxidación de proteínas de membrana a través de sus grupos sulfhidrilo (Experiencia 1), de manera que la presencia de GSH en el medio resultó positiva a partir de concentraciones de 1 mM, reduciendo de forma significativa los niveles de oxidación con respecto al grupo control. En este caso, el GSH adicionado también estaría actuando directamente como scavenger frente a los radicales libres, protegiendo a los componentes de membrana de su acción oxidativa. Estos resultados también han sido reportados en otros trabajos (Chatterjee et al., 2001; Gadea et al., 2005; Marco-Jiménez et al., 2006)

La variabilidad existente entre los espermatozoides de las tres especies, entre individuos, incluso entre subpoblaciones espermáticas de un mismo eyaculado, puede enmascarar parte de los resultados obtenidos para la adición de GSH que no resultaron significativos o coincidentes en las distintas experiencias. Este efecto macho ha sido reportado por otros autores, defendiendo que las diferencias en la composición de ácidos grasos en la membrana, el grado de madurez espermático, la capacidad para generar ERO y el potencial antioxidante del plasma seminal, son particulares de cada especie e individuo (Kim et al., 1999;

Meseguer et al., 2004; Whaterhouse et al., 2006; Loomis y Graham, 2008). Más aún, la resistencia a procesos de criopreservación dependería también de aspectos como el tamaño espermático o de la estructura y fluidez de membrana durante procesos osmóticos (Varisli et al., 2009).

No obstante, sería conveniente recurrir a nuevos ensayos para profundizar y clarificar algo más estos aspectos.

### Estudio del ADN espermático.

El ADN espermático presenta una estructura que le confiere gran protección frente al estrés oxidativo. Sin embargo, se ha observado que, en circunstancias como la criopreservación, el espermatozoide también sufre daños en el ADN de su núcleo y mitocondrias (Evenson et al., 1991; Aitken, 2010).

Las alteraciones sobre el ADN durante la congelación y descongelación de muestras seminales y las alternativas de adición de antioxidantes, de forma oral e in vitro, han sido motivo de multitud de estudios (Aitken et al., 2010; Agarwal et al., 2013; Ko et al., 2014).

Gran parte de los ensayos realizados en este trabajo tratan de evaluar el efecto de la adición de glutatión en el grado de condensación y estabilidad del ADN durante la criopreservación espermática.

La condensación que experimenta la cromatina es uno de los efectos más constatados que tiene lugar en el ADN espermático durante la congelación y la descongelación (Hamamah et al., 1990; Córdova et al., 2002), un aspecto que puede resultar crítico durante la fecundación y el desarrollo embrionario (Madrid-Buy el al., 2005; Gosalvez et al., 2011). En nuestro trabajo, la adición de GSH al medio de descongelación redujo el grado de compactación del ADN en las tres experiencias; este hecho puede deberse al efecto del GSH sobre la acción de radicales libre, evitando la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las nucleoproteínas del ADN. Se ha demostrado que estas oxidaciones generan desestabilizaciones que producen puentes disulfuro en la propia molécula, aumentando el grado de compactación de la cromatina (Pirie, 1931).

Este resultado, se puede correlacionar con los datos obtenidos en la Experiencia 1, donde se observó un efecto protector del GSH en la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las

proteínas de membrana, y con los resultados descritos por otros autores que obtuvieron un efecto similar en la adición de GSH (Delgado et al., 2001).

Algunos autores han observado la capacidad que tiene el GSH para participar en la descondensación del genoma masculino tras la fecundación ovocitaria (Calvin et al., 1986; Perrault et al., 1988), lo que podría sugerir una capacidad del GSH para actuar directamente sobre el grado de condensación de la cromatina.

Trabajos previos también destacan la acción que el estrés oxidativo tiene en la estabilidad del ADN (Evenson et al., 1991; Morales et al., 2007; Aitken, 2010), especialmente durante la congelación y descongelación seminal (Donnelly et al., 2001; Baumber et al., 2003), así como el efecto de la adición de antioxidantes para su prevención (Menezó et al., 2007).

Los resultados obtenidos, en nuestros ensayos de TUNEL y SCSA (Experiencia 2) revelaron un efecto protector del GSH a partir de concentraciones de 1 mM, al igual que otros autores en diferentes especies (Anel-López et al., 1996; Ansari et al., 2012; Yeste et al., 2013). Esto podría deberse a la acción del GSH sobre los radicales libres, tal y como sugieren trabajos en los que se puso de manifiesto que la presencia de ERO genera alteraciones en la estabilidad del ADN (Muratori et al., 2003; Baumber et al., 2003).

Todas estas evidencias destacan la importancia del estrés oxidativo en el grado de compactación y estabilidad de la cromatina espermática, así como la eficacia del uso de antioxidantes (Muratori et al., 2003; Arabi, 2005).

No obstante, sigue resultando conveniente realizar nuevos trabajos que profundicen en esta idea y en el uso de antioxidantes.

### Ensayos de FIV.

Es un hecho constatado que la crioconservación espermática repercute en la capacidad fecundante del espermatozoide y el desarrollo embrionario (Aitken et al., 1989; Gardiner et al., 1994; Hashimoto et al., 2000; Agarwal et al., 2006; Selles et al., 2003). De igual forma, la adición de antioxidantes a los medios de congelación y descongelación se ha mostrado eficaz en multitud de trabajos en porcino (Nishimura y Morii, 1992; Gadea et al., 2005; Estrada et al., 2014), bovino (Gadea et al., 2008; Perumal et al., 2011), caprino (Soares et al., 2011) y especialmente en humano, donde los tratamientos de infertilidad mediante reproducción asistida están muy extendidos (Agarwal et al., 2014; Ko et al., 2014).

Como se ha discutido previamente, la presencia de radicales libres genera alteraciones en la membrana y el ADN de los espermatozoides. Estas modificaciones estarían directamente implicadas en la pérdida de potencial fértil del espermatozoide, puesto que durante los procesos de fecundación y desarrollo embrionario tienen lugar una serie de eventos en los que participan estas estructuras. Por ejemplo, la fecundación ovocitaria es un proceso complejo y muy sensible, mediado en el espermatozoide por procesos de capacitación, reacción acrosómica, fusión de membranas, o descondensación de cromatina. Igualmente, las modificaciones del ADN están relacionadas a un desarrollo embrionario deficiente y alteraciones genéticas en la descendencia (Ahmadi et al., 1999; Aitken et al., 2006).

En el caso del ovocito, aspectos claves como su capacidad para unir espermatozoides, bloquear la polispermia, activarse tras su fecundación o realizar una descondensación de núcleos eficiente, también repercutiría en los resultados (Takahashi, 2012).

Kim et al., (1999) demostraron un efecto dosis-dependiente del GSH en la capacidad del espermatozoide bovino para fecundar el ovocito y en el desarrollo de embriones in vitro. Por su parte, Luvoni et al., (1996) demostraron un efecto positivo del GSH en el desarrollo embrionario, pero no en la maduración in vitro o en la fecundación. Estos estudios demuestran que el embrión también es sensible al estrés oxidativo, al igual que sostienen otros autores (Gardiner et al., 1993; Dumollard et al., 2007; Takahashi, 2012).

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad del espermatozoide de toro y verraco para fecundar y descondensar su cromatina (Experiencia 1 y 2), así como el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto, en el caso de los embriones bovinos (Experiencia 2). Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de GSH, durante la descongelación seminal, incrementa la fertilidad de las muestras espermáticas de verraco y toro. En el caso del bovino, también se observó una mayor capacidad de desarrollo embrionario in vitro.

Estos datos refuerzan la hipótesis del papel antioxidante que desempeña el GSH en situaciones de estrés oxidativo, no sólo sobre las membranas sino también sobre el ADN espermático. Posiblemente debido a su capacidad antioxidante, interfiriendo la acción de radicales libres. No obstante, no conviene descartar una acción directa del GSH en todos estos procesos. Por ejemplo, el incremento encontrado en el número de cabezas espermáticas en presencia de GSH, puede estar relacionado también a la capacidad demostrada por esta molécula para descondensar el genoma paterno tras la fecundación y activación ovocitaria (Calvin et al., 1986; Perrault et al., 1988). Además, Gardiner et al., (1993) sugieren un papel destacado del GSH durante el desarrollo embrionario.

Pese a las evidencias encontradas, estos procesos son complejos y muy sensibles a las condiciones del medio, siendo necesarios estudios más detallados de estos procesos y los mecanismos de acción de los antioxidantes.

### Análisis de la adición de GSSG.

Los ensayos realizados en caprino (experiencia 3) no mostraron efecto alguno con la adición de GSSG durante la descongelación, en parámetros de movilidad (CASA), estado del acrosoma (citometría de flujo) y la estabilidad del ADN (SCSA); para las concentraciones y tiempos de incubación empleados. Estos resultados son similares a los descritos en otros trabajos (Bilodeau et al., 2001; Marco-Jiménez et al., 2006). Sin embargo, algunos autores sí han conseguido efectos positivos con la adición de GSSG (Chatterjee et al., 2001; Shariözkan et al., 2009). Esta discrepancia se ha encontrado incluso en trabajos presentados por el mismo grupo (Uysal y Bucak, 2007; Bucak et al., 2008). Estas diferencias podrían deberse a aspectos como el medio, la concentración o los tiempos de incubación empleados en cada caso.

El GSSG requiere ser reducido a GSH, mediante la acción de la enzima glutatión reductasa, para poder adquirir capacidad antioxidante (Meister et al., 1983). Es posible que se trate de una reacción muy sensible a las concentraciones de las moléculas implicadas y que las condiciones durante los procesos de criopreservación no sean las más adecuadas, ya que las muestras experimentan cambios importantes en las células y el medio (Pursel y Johson, 1975). Por ejemplo, Martí et al., (2008) demostraron que el proceso de criopreservación implica un cambio importante en los niveles y la inmunolocalización de GR, GPX y SOD; y que el uso de antioxidantes afecta al proceso.

La disparidad en los hallazgos sugiere nuevos trabajos que confirmen los resultados, ayuden a esclarecer el mecanismo concreto de acción, así como las dosis y tiempos de incubación correctos.

---

En resumen, los resultados obtenidos en las diferentes experiencias demuestran que la presencia de GSH, no así de GSSG, repercute positivamente en el potencial fértil de las muestras, teniendo en cuenta su concentración y tiempos de coincubación para cada especie animal y variable estudiada.



Los ensayos de medida de ERO revelaron que existe un incremento en los niveles de radicales libres espermáticos durante la descongelación y que la presencia de GSH minimiza el estrés oxidativo, a través de dos mecanismos de acción no necesariamente excluyentes: el primero implicaría una acción directa del propio GSH; mientras que el segundo sugeriría que el glutatión actúa indirectamente interfiriendo la acción de los radicales libres. También es posible que existan vías alternativas que interactúen en mayor o menor medida con las ya descritas, tal y como sugieren otros autores que destacan la acción de enzimas como la glutatión S-transferasa (Mukhtar et al., 1978; Gopalakrishnann et al., 1998; Hemachand et al., 2002) o la g-glutamil transpeptidasa (Funahashi et al., 1996; Abe et al., 1998; Chen et al., 2007).

Las coincidencias encontradas en los resultados de las tres experiencias sugieren la existencia de mecanismos comunes en los procesos de criopreservación seminal de especies mamíferas. No obstante, el grado de alteración y el estrés oxidativo generados, podría variar entre especies, individuos e incluso subpoblaciones espermáticas del mismo eyaculado; como consecuencia de modificaciones en su medio, la composición de lípidos de sus membranas, la morfología, el grado de maduración y compactación de la cromatina, la presencia de leucocitos u otras células, etc. (Lenzi et al., 1996; Thurston et al., 2002; De Iuliis et al., 2009).

Gran parte de los resultados encontrados en este trabajo, se encuentran en consonancia con muchos de los estudios previos que refuerzan la hipótesis y objetivos planteados al inicio, apostando por la adición de antioxidantes a los medios de criopreservación seminal con el fin de mejorar la calidad y fertilidad de las muestras.

V.

---

# C ONCLUSIONES

1. La concentración de ERO aumenta en el espermatozoide como resultado de la manipulación y la congelación-descongelación de las muestras seminales in vitro.
2. La adición de GSH, no así de GSSG, al medio de descongelación seminal es una solución para paliar alguno de los efectos negativos en membranas y el ADN.
3. La eficiencia de la adición de GSH al medio de descongelación presenta un efecto dependiente de su concentración y tiempo de incubación.
4. Las muestras de distintos machos no responden igual a la presencia de GSH en el medio de descongelación.
5. La adición de GSH al medio de descongelación favorece la viabilidad espermática en muestras de caprino pero no de porcino o bovino.
6. La adición de GSH al medio de descongelación protege la estabilidad de la membrana espermática.
7. La adición de GSH al medio de descongelación espermático favorece la eficiencia de procedimientos de fecundación in vitro en la especie porcina y bovina.
8. El comportamiento similar en el proceso de congelación-descongelación y la adición de GSH denota la existencia de mecanismos biológicos similares para las especies de ungulados estudiadas.
9. Son necesarios nuevos estudios que profundicen en los mecanismos de acción y el uso correcto de la adición de antioxidantes, en dosis y tiempos de incubación.

VI.

---

# *B*IBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS (2014) Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12, 112
- Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 59, 2–11
- Agarwal A, Said TM, Bedaiwy M, Banerjee J, Alvarez JG (2006) Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility*. 86(3), 503–512
- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 86(4):878–85
- Ahmadi A & Ng SC (1999) Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 16(3), 128–32
- Aitken RJ & Baker MA (2004) Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction. Fertility and Development*. 16, 581–588
- Aitken RJ & Baker MA (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 250(1-2), 66–69
- Aitken RJ & Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81, 459–469
- Aitken RJ & Clarkson JS (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*. 9(6), 367–76
- Aitken RJ & De Iuliis GN. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 16(1), 3–13.
- Aitken RJ (1999) The Amoroso Lecture The human spermatozoon-a cell in crisis?. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115:1-7
- Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 97(2), 441–50.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*. 41(1), 183–97.

- Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*. 25(10), 2415–2426.
- 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. *Biology of Reproduction*. 59(5), 1037–46.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*. Jan 16(1):31–8
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology* 16(1), 31–8.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA (2007) Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Molecular Human Reproduction*. 13:203-211
- Alvarez JG & Storey BT. (1982). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biology of Reproduction*. 27(5), 1102–8.
- Alvarez JG & Storey BT. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*. 29(3), 548–55.
- Alvarez JG & Storey BT. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*. 23:77-90.
- Alvarez JG & Storey BT. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 42(3), 334–46.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco, L, Storey BT. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*. 8(5), 338–48.
- Amann RP & Waberski D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81(1), 5–17e1–3.
- Ameziane-El-Hassani R, Boufraquech M, Lagente-Chevallier O, Weyemi U, Talbot M, Métivier D, Dupuy C. (2010). Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer Research*. 70(10), 4123–4132

- Anel L, Álvarez-Rodríguez M, García-Álvarez O, Álvarez M, Maroto-Morales A, de Paz, P, Martínez-Pastor, F. (2012.) Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 135(1-4), 37–46.
- Anel L, García-Álvarez, O, Maroto-Morales, A, Iniesta-Cuerda, M, Ramón, M, Soler, AJ, Yüce A. (2015). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Animal Reproduction Science*. 75(2-3), 128–134.
- Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Ullah N, Iqbal R, Holt WV, Akhter S. (2012). Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproductive Biology*. 12(3), 271–6.
- Arabi M. (2005). Bull spermatozoa under mercury stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 40(5), 454–9.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*. 26(7-8), 869–80.
- Armstrong RS, Sohal RG, Cutler RG, Slater TF. (1984). *Free Radicals Molecular En Biology, Aging and Disease* Armstrong RS, Sohal RG, Cutler RG, Slater TF (eds) Raven, New York .
- Asahi, M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, et al. (1995). Inactivation of glutathioneperoxidase by nitric oxide. *J Biol Chem*. 270:21035-21039.
- Ashworth PJ, Harrison RA, Miller NG, Plummer JM, Watson PF. (1995). Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Molecular Reproduction and Development*. 40(2), 164–76.
- Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. (1994). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Archives of Andrology*. 33(1), 11–5.
- Austin CR. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. 170(4321), 326.
- Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *Journal of Andrology*. 29(1), 41–6.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21(1), 1–7.
- Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 70(8), 1251–9.

- Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. (1996). Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertility and Sterility*. 65(2), 411–9.
- Baker MA & Aitken RJ. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 216(1-2), 47–54.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function*. 22(6), 343–52.
- Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. (2003) Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clin Chem Lab Med*. Jan 41(1):13–9.
- Ball BA & Vo A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*. 22(6), 1061–9.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology*. 56(4), 577–89.
- Barker S, Weinfeld M, Murray D. (2005). DNA-protein crosslinks: Their induction, repair, and biological consequences *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. 589, 111–135.
- Baumber J, Ball A, Linfor, JJ, Meyers SA. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24(4), 621–628.
- 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. *Journal of Andrology*. 21(6), 895–902..
- Baumber J, Ball BA, Linfor, JJ, Meyers SA. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24(4), 621–628.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball, BA. (2003). Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 60(7), 1239–1247.



- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, et al. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 87:1620-1624.
- Beckman KB, Ames BN. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78:547-581.
- Bedford JM & Calvin HI. (1974). Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *The Journal of Experimental Zoology.* 187(2), 181–204.
- Bedford JM & Hoskins DD. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology In *Marshall's physiology of reproduction II Reproduction in the male* (ed G E Lamming), pp 379-568 UK: Longman.
- Betteridge KJ. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci.* 79:203-244.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Sakkas D, Bianchi U. (1993). A cytochemical study of mature mouse spermatozoa after C-banding treatment *European Journal of Histochemistry.* 37(2), 155–9.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard, MA. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology.* 57(3), 1105–22.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. (2001). Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 56(2): 275-286.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development.* 55(3), 282–8.
- Blake DR, Rallen RE, Lunec J. (1987). Free radicals in biological systems, a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull,* 45:371-385.
- Boaz SM, Dominguez K, Shaman JA, Ward WS. (2008). Mouse spermatozoa contain a nuclease that is activated by pretreatment with EGTA and subsequent calcium incubation. *Journal of Cellular Biochemistry.* 103(5), 1636–45.
- Boivin J, Bunting L, Collins J, ANygren KG. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction.* 22(6): 1506-1512.

- Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. (1999). Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods in Enzymology*, 301, 188–98.
- Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*. 60:235–237.
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 63:2126-2135.
- Brouwers JF, Silva PF, Gadella BM. (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63:458-469.
- Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*. 75(2-3), 128–134.
- Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. (2008). The role of the acrosomal matrix in fertilization International. *Journal of Developmental Biology*. 52(5-6), 511–522.
- Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, Tough S, Collins J. (2012) Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction*. 27(3): 738-746.
- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*. 51: 79- 110.
- Cadet J, Ravanat JL, Buchko GW, Yeo HC, Ames BN. (1994). Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods enzymol*. 234:79-88.
- Calvin HI & Turner SI. (1982). High levels of glutathione attained during postnatal development of rat testis. *The Journal of Experimental Zoology*. 219(3), 389–93.
- Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ. (1986). Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova:Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Research*. 14(3), 265–275.
- Camara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MM. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76(2): 342-350.
- Casas I, Torner E, Yeste M, Bonet S. (2012). Boar sperm thawing practices: the number of straws does matter. *Theriogenology*. 77(7), 1487–94.
- Cascales M. (2008). ¿Por qué envejecemos? Publicaciones UNED.

- Castell PP, Pérez de Alejo J. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 29 (3): 192-198.
- Castillo C, Benedito JL, López-Alonso M, Miranda M, Hernández, J. (2001). Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Archivos de medicina veterinaria.* 33(1), 5-20.
- Castillo-Paterna MM. (2002). Modelos de envejecimiento in vitro e in vivo, estrés oxidativo y protección antioxidante. Tesis Doctoral Universidad de Alicante.
- Cerutti PA. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* 227:375-381.
- Chance, B, Sies, H, Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59:527-605.
- Chang, MC. (1952). Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. *J Exp Zool.* 121:351-381.
- Chapman DA, Killian GJ, Gelerinter E JM. (1985). Reduction of the spin-label TEMPONE by ubiquinol in the electron transport chain of intact rabbit spermatozoa. *Biol Reprod.* May 32(4):884-93.
- Chatterjee S & Gagnon C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development.* 59(4), 451-8.
- Chatterjee S, de Lamirande, E, Gagnon C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development.* 60(4), 498-506.
- Chen Y, Yang Y, Miller ML, Shen D, Shertzer HG, Stringer KF, Wang B, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. (2007). Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology.* May 45(5):1118-28.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci,* 95: 7631-7636.
- Clermont Y. (1966). Spermatogenesis in man A study of the spermatogonial population *Fertility and Sterility.* 17(6), 705-21.
- Comporti, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions.* 72(1-2), 1-56.
- Córdova A, Pérez-Gutiérrez JF, Lleó B, García-Artiga C, Alvarez A, Drobchak V, Martín-Rillo S. (2002). In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology.* 57(8), 2119-28.

- Coy, P, Romar, R, Payton, RR, McCann, L, Saxton, AM, Edwards JL. (2005). Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: Effects on maturation, fertilization and subsequent embryo. *Development in vitro Reproduction* 129(1), 19–26.
- Cross NL & Meizel S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod.* 41:635-641.
- Curry MR, Watson PF. (2004). Sperm structure and Function In: Grudzinskas JG, Yovich JL Gametes- The Spermatozoon. Cambridge University Press, 2004:45-69.
- Daghigh-Kia H, Olfati-Karaji R, Hoseinkhani A, Ashrafi I. (2014). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. *Spanish Journal of Agricultural Research.* Vol 12, No 1.
- De Iuliis, GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Aitken, RJ. (2009). DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biology of Reproduction.* 81(3), 517–524.
- De Kretser DM. (1969). Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948),* 98(4), 477–505.
- de Lamirande E & Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa II Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology.* 13(5), 379–86.
- de Lamirande E & Gagnon C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction.* Oct 10 Suppl 1:15–21.
- de Lamirande E & Gagnon C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction (Oxford, England).* 10 Suppl 1, 15–21.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction.* 2(1), 48–54.
- Deepinder F, Cocuzza M & Agarwal A. (2008). Should seminal oxidative stress measurement be offered routinely to men presenting for infertility evaluation?. *Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists.* 14(4), 484–91.

- Delgado NM, Flores-Alonso JC, Rodríguez-Hernández H M, Merchant-Larios H, Reyes R. Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Archives of Andrology*. 47(1), 47–58.
- Demple B, Linn S. (1982). 5,6-saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res*. 10:3781-3789.
- Demple B. (1990). Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Mutat Environ. A*:155-167.
- Den Boer, PJ, van Loon, AA, Mackenbach P, van der Schans GP, Grootegoed JA. (1990). Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of xenobiotics and induction of single-strand DNA breaks by ionizing radiation in isolated hamster round spermatids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 259–269.
- Dickey, F H, Cleland, G H, & Lotz, C (1949) The role of organic peroxides in the induction of mutations *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35(10), 581–6
- Donnelly ET , O'Connell M, McClure N, Lewis SE. (2000). Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15(7), 1552–61.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertility and Sterility*. 72(3), 484–95.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 15(1), 61–8.
- Drummen GP, van Liebergen LC, Op den Kamp JA, Post JA. (2002). C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med*. 33:473-490.
- Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchon MR. (2007). Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*. 134(3), 455–65.
- Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*. 18(4), 420–35.
- Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG, Balasch S, Bonet S, Yeste M. (2014). Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*. 2(1): 88-99.

- Evenson D & Jost L. (2001). Sperm chromatin structure assay for fertility assessment Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J Paul Robinson, Managing Editor [et Al], Chapter 7, Unit 713.
- Evenson D, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*. 5(2), 115–25.
- Evenson D, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. 14(4):1039–49.
- Evenson D, Larson KL, Jost LK. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. 23(1), 25–43.
- Evenson D, Thompson L, Jost L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 41(3), 637–651.
- Evenson DP. (1989). *Flow cytometry Advanced Research and clinical applications*. De A Yen Florida, CRC Press.
- Evers JH, Collins J, Clarke J. (1996). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. The Cochrane database of systematic reviews. UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, Azizi Y, Kasaeian A, Mardaneh J, Parvizi MR, Akrami M. (2014). Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples Iranian. *Journal of Reproduction Medicine*. 12:103–110.
- FAO. (1992). *The management of global animal genetic resources Proceedings of an Expert Consultation, Rome, Italy, April 1992 Animal Production and Health Paper 104 (A)* (ed Hodges, J) Publ by FAO, Rome, 309 pp.
- FAO. (1994). *Implications of the convention on biological diversity - management of animal genetic resources and the conservation of domestic animal diversity Report of an Informal Working Group, 28-29 March 1994* (ed Strauss, MS) Publ by FAO, Rome, 22 pp.
- FAO. (1994). *The state of food and agriculture FAO Agriculture Series, No 27* Rome.
- FAO. (1998a). *Primary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans* Rome, Italy.

- FAO. (2001a). Preparation of the First Report on the State of the World's Animal Genetic Resources Guidelines for the Development of Country Reports, <http://dadfaorg/en/refer/library/stakeholders/guidelinespdf>.
- FAO–UNESCO. (1971–1981). Soil map of the world 1:5 000 000 10 Volumes Paris, UNESCO.
- Fatma BA, Nozha CF, Ines D, Hamadi A, Basma H, Leila AK. (2009). Sperm quality improvement after date seed oil in vitro supplementation in spontaneous and induced oxidative stress. *Asian Journal of Andrology*. 11:393-398.
- Favard P & Andre J. (1970). The mitochondria of spermatozoa In: Baccetti B, ed *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press. 415–29.
- Fawcett DW. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*. 44(2), 394–436.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Garde JJ. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 67(4), 738–753.
- Ferrer M, Xu W, Oko R. (2012). The composition, protein genesis and significance of the inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Re. Sep* 349(3); 733–748.
- Fingerova H, Novotnyb J, Barborikc J, Brezinovaa J, Svobodovaa M, Krskovad M, Obornaa I. (2007). Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS randox® *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc. Czech Repub.* 151:37-40.
- Fisher DB & Kaufman S. (1973). Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalysed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem*. 248:4300- 4304.
- Fléchon JE. (2015). The acrosome of eutherian mammals. *Cell Tissue Res*. Aug (15).
- Fleming AD, Yanagimachi R, Yanagimachi H. (1981). Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63(2), 509–14.
- Fnan S & Cohen G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*. 32: 804-881.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 71(1-2), 13–23.
- Freeman BA & Grapo JD. (1982). Biology of disease Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 47:412-426.

- Fridovich L. (1983). Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 23:239-257.
- Funahashi H & Sano T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology.* 63(6), 1605–16.
- Funahashi H, Machaty Z, Prather RS, Day BN. (1996). gamma-Glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. *Molecular Reproduction and Development.* 45(4), 485–90.
- Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. (2005). Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology.* 26(3), 396–404.
- Gadea J, Gumbao D, Canovas S, Garcia-Vazquez FA, Grullón LA, Gardón JC. (2008). Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International journal of Andrology.* 31(1): 40-49.
- Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez, Gardón JC. (2013). Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive Biology.* 13(1): 24-33.
- Gadea J, Gumbao D, Matás C, Romar R. (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology.* 26(6): 749-756.
- Gadea J, Matás C, Lucas X. (1998). Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Animal Reproduction Science.* 54:95.
- Gadea J, Mollá M, Sellés E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardón JC. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology.* 62(1), 40–6.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 62(3-4), 690–701.
- Gadella BM, Tsai P, Boerke A, Brewis IA. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology.* 52(5-6), 473–480.



- Gao D Y, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Critser JK. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*. 10(5), 1109–22.
- Gardiner CS & Reed DJ. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*. 51, 1307–1314.
- Gardiner CS & Reed DJ. (1995). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 318(1), 30–6.
- Garrido N, Meseguer M, Simón C, Pellicer A, Remohí J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 6:59-65.
- Genescà A, Caballín MR, Miró R, Benet J, Germà JR, Egozcue J. (1992). Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetics*. 89(2), 181–6.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. May 7 119(3097): 623–6.
- Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M. (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*. 83(3), 399–407.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. (1995). Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 53(5), 985–95.
- Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*. 17(3), 276–287.
- Gopalakrishnan B, Aravinda S, Pawshe CH, Totey SM, Nagpal S, Salunke DM, Shaha C. (1998). Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *The Biochemical Journal*. 329 (Pt 2, 231–41).
- Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holm P. (2011). Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*. 78(12), 951–61.
- Gray J. (1928). The senescence of spermatozoa. *Br J exp Biol*. 5, 345-361.
- Gray LH, Scott OCA. (1964). Oxygen tension and the radiosensitivity of tumors En: *Oxygen in the Animal Organism* Dickens F y Neil E (Eds), Pergamon Press, New York, pgs 537-541.

- Greenwald RW & Moy WW. (1980). Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23 :455-463.
- Griveau JF & Le Lannou D. (1994). Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *International Journal of Andrology.* 17(5), 225–31.
- Griveau JF & Le Lannou D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology.* 20(2), 61–9.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility.* 103(May):17–26.
- Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D, Boucher D. (1999). Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *International Journal of Andrology.* 22(3), 190–6.
- Grosshans K & Calvin HI. (1985). Estimation of glutathione in purified populations of mouse testis germ cells. *Biology of Reproduction.* 33(5), 1197–1205.
- Guthrie HD & Welch GR. (2007). Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freezethawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *Journal of Animal Science.* 85:1402-1411.
- Gutteridge JM & Halliwell B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000 A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 899, 136–47.
- Halliwell B & Gutteridge JM. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* Jun 23 1(8391):1396–7.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction In: *Free radicals in biology and medicine* Halliwell, B and Gutteridge, JMC (eds), Oxford Clarendon Press, pgs 188-276.
- Hamamah S, Royère D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. (1990). Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction, Nutrition, Development.* 30(1), 59–64.
- Hamilton DW & Waites GMH. (1990). Cellular and Molecular events in spermiogenesis *Scientific basis of Fertility Regulation.* World Health Organization. Cambridge University Press 334.
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K. (1999). Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy

extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. *Human Reproduction*. 14(2), 363–7.

- Hammond K & Leitch H. (1996). The FAO global programme for the management of farm animal genetic resources In: *Beltsville Symposia in Agricultural Research XX Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals* (Eds Miller, R, Pursel, V and Norman, H). American Society of Animal Science, Illinois, 24 – 42.
- Harman D. (1972). The biological clock: The mitochondria. *J Am Geriatr Soc*. 20:145-147.
- Harman D. (1982). *Free Radicals in Biology*. (Ed Pryor WA) Academic Press, Orlando 1982 255-275.
- Harman D. (1992). Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 673:126-141.
- Harman D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5(5), 557–61.
- Harrison RA, Ashworth PJC, Miller NGA. (1996). Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*. 45(3), 378–391.
- Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM, Shaha C. (2002). Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 10), 2053–65.
- Hodgson EK & Fridovich I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry*. 14(24), 5299–303.
- Hoffman ME, Mello Filho AC, Meneghini R. (1984). Correlation between cytotoxic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the yield of DNA strand break in cells of different species. *Biochim Biophys Acta*. 781:234-238.
- Holt W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3), 3–22 .
- Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SGA. (2013). Correlation of Sperm Parameters With Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoasheno- Teratospermic Men Iranian Red Crescent. *Medical Journal*. 15(9), 780–5.
- Hothorn M, Wachter A, Gromes R, Stuwe T, Rausch T, Scheffzek K. (2006). Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *J Biol Chem*. Sep 15 281(37):27557-65.

- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. (1998). The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Human Reproduction*. 13(5), 1240–7.
- Hunter RH. (1969). Capacitation in the golden hamster, with special reference to the influence of the uterine environment. *Journal of Reproduction and Fertility*. 20(2), 223–37.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*. 21(1), 33–44.
- Irvine DS. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction*. 1, 6–12.
- Iwasaki A & Gagnon C. (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*. 57(2), 409–16.
- Jairam V, Uchida K, Narayanaswami V. (2012). Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. *Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. Role in Health and Diseases*, Prof. Gerhard Kostner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0773-6.
- Jenkins TG, Aston KI, Carrell DT. (2011). Supplementation of cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility. *Fertility and Sterility* 95:2001–4.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*. 24(2), 185–96.
- Jones R & Mann T. (1977). Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 50, 261–268.
- Jones R & Stewart DL. (1979). The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56(1), 233–8.
- Jones R, Mann T, Sherins R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*. May 31(5):531-7.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ. (1978). Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 201(1145), 413–7.
- Juyena NS & Stelletta C. (2012). Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33(4), 536–55.

- Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. (2005). Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*. 63:1354-1365.
- Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TIS, Liao TL, Wei YH. (2008). Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*. 89:1183-1190.
- Kappus H & Sies H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*. 37:1233-1237.
- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*. 16, 449–457.
- Kellogg EW III & Fridovich I. (1975). Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *Journal of Biological Chemistry*. 250 8812-8817.
- Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL. (1995). A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility*, 64(4), 825–31.
- Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi AL, Hendriksen PJ, Bevers MM. (1999). Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 52(3), 537–47.
- King GJ, Macpherson JW. (1973). A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*. 36:563-565.
- Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A. (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and Sterility*. 102(6):1518–27.
- Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh, Nelson DR, Thomas AJ, Jr, Agarwal A. (2001). Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *Journal of Andrology*. 22:568-574.
- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction*. 6(7), 987–91.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*. 68(3), 519–24.

- Koppers A, De Iuliis G, Finnie J, McLaughlin E, Aitken R. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:3199-3207.
- Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. (1992). Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertility and Sterility.* 57(6), 1317–25.
- Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar S, Naskar S. (2009). Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction of Science.* 110:162-171.
- Leewenhoek A. (1677). Observation, communicated to the publisher by Mr Antony van Leewenhoek, in a Dutch letter of the 9 Octob 1676 here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea and snow water as also in water wherein pepper had lain infused. *Phil Trans.* 12, 821–831.
- Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. (2000). Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies *Frontiers in Bioscience. A Journal and Virtual Library,* 5, E1–E15.
- Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update.* 2(3), 246–56.
- Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility.* 64(4), 868–70.
- Li TK. (1975). The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction.* 12:641-646.
- Li X, Traganos F, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. (1995). Single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides: Detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry.* 20(2), 172–180.
- Lindemann CB, O'Brien JA, Giblin FJ. (1988). An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *Biology of Reproduction.* 38(1), 114–20.
- Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Bonde JP. (2003). Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Human Reproduction.* 18(6), 1265–1272.

- Loomis PR & Graham JK. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105(1-2), 119–28.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 13(4), 896–900.
- López Alonso M, Miranda M, Hernandez J, Castillo C, Benedito JL. (1997). Glutathione peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en ruminantes. *Arch Med Vet*. 29:171-180.
- Loveless A. (1951). Qualitative aspects of the chemistry and biology of radiomimetic (mutagenic) substances. *Nature*. 167(4244), 338–42.
- Lubberda Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*. 5(1), 5–17.
- Luna C, Yeste M, Rivera Del Álamo MM, Domingo J, Casao A, Rodríguez-Gil JE, Muiño-Blanco T (2015). Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reproduction, Fertility, and Development*. Aug 24. In press. doi: 10.1071/RD15231.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. (1996). Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction and Development*. 43(4), 437–443.
- Lykkesfeldt J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking *Clinica Chimica Acta International Journal of Clinical Chemistry*. 380 (1-2), 50–8.
- Ma M & Eaton JW. (1992). Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(17), 7924–8.
- Mahfouz RZ, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A. (2009). Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 92:819-827.
- Maijala K, Cherekaev AV, Devillard JM, Reklewski Z, Rogoni G, Simon DL, Steane DE. (1984). Conservation of animal genetic resources in Europe Final report of an EAAP working party. *Livestock Production Science*. 11, 3-22.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *The Indian Journal of Medical Research*. 129(4), 357–67.

- Marco-Jimenez F, Lavara R, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. (2006). Cryopreservation of rabbit spermatozoa with freezing media supplemented with reduced and oxidised glutathione. *Cryo letters*. 27(4): 261-268.
- Martí E, Martí JI, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez, JA. (2008). Effect of the Cryopreservation Process on the Activity and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in Ram Spermatozoa *Journal of Andrology* 29(4), 459–467.
- Martínez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77(3):147-61.
- Martínez-Cayuela M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39:5-18.
- Martínez-Pastor F, Aisen E, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Garde JJ. (2009). Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction*. Feb;137(2):225-35.
- Martínez-Soto J C, García-Vazquez F, Gumbao D, Landeras J, Gadea J. (2011). Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology*. 63(3), 131–6.
- Martínez-Soto J C, Landeras J, Gadea J. (2013). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. 1(3), 365–75.
- Martínez-Soto JC, de DiosHourcade J, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, Gadea J. (2010). Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*. 12(3), 431–41.
- Martín-romero FJ & Alvarez IS. (2008). Role of reactive oxygen and nitrogen species in reproductive biology. In *Free Radical Biology and Medicine*. Edt Fort, P O, Leeuwenburgh, C, 661(2), 43–66.
- Mason RP (1982). Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*, (5) Academic Press, New York, pgs 161-173.
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F. (2015). Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*. 83(4).
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz P, Anel L, Álvarez M. (2014). Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and



GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*. 151(3-4), 137–47.

- Mattioli M, Galeati G, Seren E. (1988). Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Research*. 20(2), 177–83.
- Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. 247(3 Pt 1), C125–42.
- Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga PP. (1995). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Europaea Fertilitatis*. 26(4), 145–8.
- McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *The Journal of Biological Chemistry*. 244(22), 6049–55.
- Meister A & Anderson ME. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 52:711-60.
- Ménéz Y, Dale B, Cohen M. (2010). DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*. 18(4), 357–65.
- Menezó YJR, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M. (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive Biomedicine Online*. 14(4), 418–21.
- Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J. (2004). Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 25(5), 773–80.
- Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Muriel L, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. (2007). The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metabolism Letters*. 1(2), 121–6.
- Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. (1987). Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertility and Sterility*. 48(6), 1006–11.
- Miller ER, Appel LJ, Risby TH. (1998). Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation*. 98(22), 2390–5.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 15 : 579-591.
- Miquel J. (1991). An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 12(2-3), 99–117.

- Miquel J. (1998). An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Experimental Gerontology*. 33(1-2), 113–26.
- Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martínez L. (2001). Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Human Reproduction*. 16:534-539.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 43: 109-142 .
- Morales R, Lledó B, Ortiz JA, Rodríguez- Arnedo D, Fabregat A, Bernabeu R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 24:305-313.
- Mortimer D & Mortimer ST. (1992). Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 21(4), 517–24.
- Mortimer D, Barratt CLR, Björndahl L, De Jager C, Jequier AM, Muller CH. (2013). What should it take to describe a substance or product as “sperm-safe”. *Human Reproduction Update*. Apr; 19 Suppl 1:i1-45.
- Muino-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 43 Suppl 4, 18–31.
- Mukhtar H, Lee IP, Bend JR. (1978). Glutathione S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 83(3), 1093–8.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *Journal of Andrology*. 24(2), 253–62.
- Musgrave WB, Yi H, Kline D, Cameron JC, Wignes J, Dey S, Pakrasi HB, Jez JM. (2013). Probing the origins of glutathione biosynthesis through biochemical analysis of glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase from a model photosynthetic prokaryote. *Biochem J*. Feb 15 450(1):63-72.
- Nagae T, Yamaguchi R, Srivastava PN, Yanagimachi H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 45(5), 701–7.
- Nakamura H, Kimura T, Nakajima A, Shimoya K, Takemura M, Hashimoto K, Isaka S, Azuma C, Koyama M, Murata Y. (2002). Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Nov 15; 105(2):155-60.

- Naqui A, Chance B, Cadenas E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem.* 55:137-166.
- Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Aguero A. (2005). Gadella BM Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development.* 72:230-238.
- Nielsen H. (1981). Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein III Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids.* 16:215- 222.
- Nishimura K & Morii H. (1993). Effects of Glutathione on the Motility of Frozen-thawed Boar Spermatozoa. *Anim Sci Technol (Jpn).* 64(5), 433–439.
- O’Flaherty C, de Lamirand E, Gagnon C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology & Medicine.* 41(4), 528–40.
- Ogata K, Sasaki A, Kato Y, Takeda A, Wakabayashi M, Sarentonglaga B, Nagao Y. (2015). frozen-thawed canine spermatozoa for transcervical insemination. 61(2): 166-22.
- Olinski R, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. (1992). DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cultured human cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 297(1), 139–43.
- Ombelet W , van Robays J. (2010). history of human artificial insemination *Artificial insemination. f, v & v in obgyn, monograph: 1-5.*
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. (2004). Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility.* 81 Suppl 1, 802–9.
- Padmaja S & Huie RE. (1993). The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 15 195(2):539–44.
- Pahun P P, Choudhari AR, Muley PA. (2013). The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR,* 7(6), 991–5.
- Palmer RM J, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.*153: 1251-1256.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction.* 38(5), 1171–1180.
- Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *Journal of Andrology.* 13(5), 450–5.

- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez Martínez H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 78(1-2), 85–98.
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL (2007) Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 74(7), 878–92
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 74(7), 878–92.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology*. 125(1), 181–6.
- Perumal PS, Selvaraju S, Selvakumar AK, Barik DN, Mohanty S, Das RK, Mishra PC. (2011). Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reprod Domest Anim*. 46(4): 636-641.
- Pesch S & Bergmann M (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability. *Fertility and Cryopreservation Micron*. 37(7), 597–612.
- Pirie NW. (1931). The oxidation of sulphhydryl compounds by hydrogen peroxide: Catalysis of oxidation of cysteine and glutathione by iron and copper. *The Biochemical Journal*. 25(5), 1565–79.
- Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and Sterility*. 62(2), 387–93.
- Polge C & Jakobsen KF. (1959). Techniques for freezing boar semen. *Vet Rec*. 71, 928.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164-6.
- Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. (1999). Antioxidant capacity of the epididymis. *Human Reproduction* 14:2513-2516.
- Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res*. 447:249-256.

- Proctor PH & Reynolds ES. (1984). Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys*. 16:175-195.
- Pryor W. (1982). Free radical biology, xenobiotics, cancer and aging. *Ann NY Acad Sci*. 393:1-16.
- Pryor W. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu Rev Physiol*. 48:657-667.
- Pryor WA, Church DP. (1991). Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad Biol Chem*. 11:41-46.
- Pursel VG & Johnson LA. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40(1), 99–102.
- Ramos L & Wetzels AM. (2001). Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Human Reproduction*. 16(8), 1703–7.
- Rao MV & Gangadharan B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro*. 22:935-942.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson L. (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science*. 77(12), 3346–3352.
- Reichard P & Ehrenberg A. (1983). Ribonucleotide reductase--a radical enzyme. *Science*. 221(4610), 514–9.
- Rice-Evans C & Miller N. (1997). Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 57(4-5), 499–505.
- Richter C. (1988). Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?. *FEBS Lett*. 241:1-5.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, García EM, Cuello C, Martínez EA. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology*. 26(1), 15–24.
- Ross WCJ. (1950). Biological action of x-rays, nitrogen mustards, diepoxides and peroxides. *Nature*. 165(4203), 808–9.
- Sanocka D & Kurpisz M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2(Table 2), 12.

- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*. 58(2), 134–8.
- Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update*. 5(4), 302–13.
- Selles E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 38(1), 66–72.
- Sies H & Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311:617–31.
- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213–9.
- Sikka SC. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 1, e78–86.
- Sikka SC. (2001). Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Review. Current Medicinal Chemistry*. Jun; 8(7):851-62.
- Sikka SC. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*. 25(1), 5–18.
- Silva PFN, Gadella BM. (2007). Colenbrander B, Roelen BA Exposure of bovine sperm to prooxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology*. 67:609-619.
- Silva SV, Soares A, Batista A, Almeida F, Nunes J, Peixoto C, Guerra M. (2011). In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(5), 874–881.
- Simon DL & Buchenauer D. (1993). Genetic Diversity of European Livestock Breeds. EAAP Publication No 66, Pudoc, Wageningen Press 581 pp.
- Singer SJ & Nicolson GL. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175(4023), 720–31.
- Spallanzani L. (1776). *Opuscoli di Fisica Animale, e Vegetabile*, 2 vols, Opuscolo II: Osservazioni, e Sperienze intorno ai Vermicelli Spermatici dell’Uomo e degli Animali Modena, Presso la Societa’ Tipographica.
- Stamler JS, Singl D, Loscalzo J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 258:1898-1902.

- Storey BT. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*. 52(June), 427–437.
- Stradaioli G, Magistrini MA (2002). Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 58:347-350.
- Suarez SS, Dai XB, DeMott RP, Redfern K, Miranda MA. (1992). Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of Andrology*. 13(1), 75–80.
- Takacs-Novak K & Tam KY. (2000). Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants part V: Microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs. *J Pharm Biomed Anal*. 21:1171-1182
- Takahashi M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *The Journal of Reproduction and Development*. 58(1):1–9.
- Teppa-Garrán AD. (1999). Actividad ATPásica y transporte activo de calcio en fantasmas y vesículas invertidas de glóbulos rojos de pacientes embarazadas normales y preeclámpticas Trabajo de Grado, MSc Centro de Estudios Avanzados, IVIC, Caracas.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Luliis GN, Zieschang A, Clark AM. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*. 24(9): 2061-2070.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. (2002). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryo Letters*. 23(4), 255–62.
- Tisdell C. (2003). Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: analysis and assessment. *Ecological Economics*. 45(3), 365-377.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*. 89(1-4), 159–170.
- Tomic J, & Walton A. (1946). Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect of respiration. *Nature*. 158, 485.
- Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction*. 14:243-258.
- Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, Gündoğan M. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 61(3), 303–307.
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity

of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants . *Human Reproduction*. 13(6): 1429-1436.

- Uysal O, Bucak MN. (2007) Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet Brno*. 76: 383-390.
- Uysal, O, Bucak, MN, Yavas I, Varish Ö, Gurcan IS. (2005). Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. *The Indian Veterinary Journal*. 82, 1059–1061.
- Uysal, O, Bucak, MN, Yavas I, Varish Ö. (2007). Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6(12); 1362-66.
- Valenzuela A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Science*. 48:301-309.
- Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. (2009). Effect of chilling on the motility and acrosomal integrity of rat sperm in the presence of various extenders. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. 48(5), 499–505 .
- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 216:31-39.
- Vernet P, Rigaudière N, Ghyselinck N, Dufaure JP, Drevet JR. (1996). In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 74(1), 125–31.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49(6), 921–5.
- Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. (2006). Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 131(5), 887–94.
- Watson PF. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 871–91.
- Watson PF. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61, 481–92.
- Webster NR, Nunn JP. (1988). Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth*. 60:98-108.
- Wendel A. (1980). *Glutathione peroxidase En: Enzymatic basis of detoxication*. Jacoby, WB, Bend, JR, Caldwell, J (eds), Academic Press, New York.



- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction*. 8(11), 984–91.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. (1975). Deep freezing of boar sperma Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillete method. *DTW Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 82(7), 261–7.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*. 184(2), 193–9.
- Williams A & CFord WC. (2004). Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biology Reproduction*. 71(4): 1309-1316.
- Windsor DP, White IG, Selley ML, Swan MA. (1993). Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. *Journal Reproduction and Fertility*. 99(2), 359–66.
- Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. (1992). The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol*. 43(6):667-9.
- Wolff SP & Dean RT. (1988). Aldehydes and dicarbonyls in non-enzymic glycosylation of proteins. *The Biochemical Journal*. 249(2), 618–9.
- Wündrich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. (2006). Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation--an immunoblot study. *Cell and Tissue Banking*, 7(2), 81–90.
- Yanagimachi R. (1972). Mammalian fertilization In: Knobil E, Neill JD et al, eds *The Physiology of Reproduction* New York: Raven Press, 135-84.
- Yanagimachi R. (2012). Fertilization Studies and Assisted Fertilization in Mammals: Their Development and Future. *The Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 25–32.
- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. (2002). Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem* Dec 20277(51):49446-52.
- Yeste M, Castillo-Martín M, Bonet S, Briz MD. (2012). Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. *Animal Reproduction Science*. 131(3-4), 181–193.

- Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miro J, Rodríguez-Gil JE. (2014). The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*. 68(2): 251-261.
- Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. (2013). Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reproduction Fertility and Development*. 25(7): 1036-1050.
- Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. (1989). Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 7(4), 355–9.
- Zaneveld, L J (1978) The biology of human spermatozoa *Obstetrics and Gynecology Annual*, 7, 15–40
- Zini A, & Al-Hathal N. (2011). Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction?. *Asian Journal of Andrology*. 13(3), 374–381
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa *International Journal of Andrology*. 16(3), 183–8.
- Zini A, Garrels K, Phang D. (2000). Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*. 55(00), 922–926.

VII.

---

**A**NEXOS

---

## 7.1

### ABREVIATURAS.

**8OhdG:** 8-hydroxydeoxyguanosine (8 hidroxil desoxiguanosina).

**CASA:** sistema de análisis computerizado de imagen.

**DMSO:** Dimetilsulfoxido.

**ERN:** especies reactivas de nitrógeno.

**ERO:** especies reactivas de oxígeno.

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**FIV:** fecundación in Vitro.

**GPX:** glutatión peroxidasa.

**GR:** glutatión reductasa.

**GSH:** glutatión oxidado.

**GSSG:** glutatión reducido.

**H2DCFDA:** Diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína

**IA:** inseminación artificial.

**ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

**IP:** Ioduro de propidio.

**MIV:** maduración in Vitro.

**NA:** naranja de acridina.

**NOS:** óxido nítrico sintetasa.

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados.

**REDOX:** equilibrio óxido-reducción.

**SCSA:** Sperm Chromatin Structure Assay.

**SOD:** superóxido dismutasa.

**TRA:** técnicas de reproducción asistida.

**VAP:** Average path velocity (Media de velocidad)

**VCL:** Curvilinear velocity (Velocidad curvilínea).

**VSL:** Straight-line velocity (Velocidad en línea recta).

**WOB:** Wobble of the curvilinear trajectory (oscilamiento de la trayectoria curvilínea).

**ZP:** zona pellúcida.

---

7.2

ANEXOS.

# Supplementation of the Thawing Media With Reduced Glutathione Improves Function and the In Vitro Fertilizing Ability of Boar Spermatozoa After Cryopreservation

JOAQUÍN GADEA, DAVID GUMBAO, CARMEN MATÁS, AND RAQUEL ROMAR

*From the Department of Physiology, School of Veterinary, University of Murcia, Spain.*

**ABSTRACT:** In this study, we evaluated the effects of glutathione (L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) supplementation of the thawing extender on semen parameters to compensate for the decrease in GSH content observed during sperm freezing. To fully address these questions, we used a set of functional sperm tests. These included tests of motility and motion parameters, changes in sulfhydryl group content in membrane proteins, capacitation status, measures of intracellular reactive oxygen species generation, sperm chromatin condensation, and in vitro penetration of immature oocytes. The main findings emerging from this study were that addition of GSH to the thawing media resulted in a lower number of capacitated viable spermatozoa,

a decrease in the number of spermatozoa with changes in the sulfhydryl groups in membrane proteins, a reduction of the reactive oxygen species generation, a lower chromatin condensation, and a higher penetration ability of oocytes in vitro and a higher proportion of decondensated sperm heads. GSH appears to play an important role in sperm antioxidant defense strategy. Addition of GSH to the thawing extender could be of significant benefit in improving the function and fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa.

Key words: Pig spermatozoa, oxidative stress, IVF, capacitation status.

**J Androl 2005;26:749–756**

The processes of cooling, freezing, and thawing produce physical and chemical stress on the sperm membrane that reduce sperm viability and their fertilizing ability. The cold shock of spermatozoa is associated with oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) generation (Chatterjee et al, 2001). Glutathione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) is a tripeptide ubiquitously distributed in living cells, and it plays an important role as an intracellular defense mechanism against oxidative stress (Irvine, 1996). The process of freezing is associated with a significant reduction in GSH content in porcine (Gadea et al, 2004), bovine (Bilodeau et al, 2000) and human sperm (Molla and Gadea, unpublished data). Sperm freezing has also been reported to result in a reduction in sperm viability, changes in sperm function, lipid composition, and organization of the sperm plasma membrane (Buhr et al, 1994), as well as changes in sulfhydryl group content in membrane proteins (Chatterjee et al, 2001).

We have previously reported the effect of addition of GSH to the freezing and thawing extender on sperm cry-

osurvival (Gadea et al, 2004, 2005). However, few studies have investigated the precise mechanism by which GSH could mediate this effect (Nishimura and Morii, 1993; Funahashi and Sano, 2005). Therefore, more thorough studies are needed to elucidate what changes in sperm function take place during cryopreservation and the mechanisms by which GSH exerts its effects. To answer these questions, we incorporated a new set of functional sperm tests. These included tests of sperm motility assayed by computer-assisted semen analysis (CASA), changes in sulfhydryl group content in the membrane protein, capacitation status, free radical production (ROS generation) and sperm chromatin condensation by flow cytometry, and finally the in vitro penetrability of immature oocytes.

CASA has provided an objective and accurate means of evaluating overall sperm motility (Verstegen et al, 2002). Likewise, flow cytometry has also been very helpful in evaluating sperm quality by providing a specific, objective, accurate, and reproducible method compared to traditional microscopy-based methods (Graham, 2001).

Sperm capacitation and acrosome reaction are two key steps in the fertilization process. Thus, evaluation of these processes would be of paramount importance in assessing sperm fertilizing ability (Harrison, 1997). The measurements of the ROS intracellular generation could be decisive when evaluating the balance between free-radical generating and scavenging systems. Although levels of ROS are commonly evaluated by chemiluminescence as-

Supported by the project AGL-2003-03144 from the Spanish Ministry of Education and Science.

Correspondence to: Prof Dr Joaquín Gadea, Department of Physiology, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain (e-mail: jgadea@um.es).

Received for publication March 23, 2005; accepted for publication June 8, 2005.

DOI: 10.2164/jandrol.05057

say (Sikka, 2004), it is possible to use flow cytometry for accurate and low-cost measurements, using fluorochromes for evaluating intracellular ROS production as the dichloro-dihydrofluorescein diacetate.

Previous studies have shown greater boar sperm chromatin condensation after freezing-thawing procedures (Hamamah et al, 1990; Cordova et al, 2002). In addition, changes in the status of nuclear chromatin structure have been proposed as a possible cause of infertility (Evenson et al, 1994; Fernandez et al, 2003; Alvarez et al, 2004). Thus, evaluation of chromatin condensation could be a valuable tool for evaluation of cryopreserved boar spermatozoa.

However, the binding and penetration of the zona pellucida is one of the most important barriers that spermatozoa must overcome to fertilize the egg. Also, sperm interaction with the oocyte plasma membrane appears to explain much of the variability in sperm fertilizing potential observed among fertile boars (Berger et al, 1996). Therefore, tests that measure gamete interaction may be more predictive of male fertility than routine semen analysis (Rodriguez-Martinez, 2003; Gadea, 2005). Moreover, we have previously shown that *in vitro* fertilization (IVF) has a high predictive value in evaluating boar semen fertility in both refrigerated and frozen-thawed semen (Gadea et al, 1998; Sellés et al, 2003). Therefore, IVF could also be helpful in identifying changes in sperm function that standard assays fail to detect (Rodriguez-Martinez, 2003).

The main objective of this study was to evaluate the effect of GSH supplementation of the thawing extender on boar sperm functionality measured by different assays.

## Materials and Methods

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich Química, S.A. (Madrid, Spain) unless otherwise indicated.

### Semen Collection and Handling

Semen was routinely collected from eight mature fertile boars using the manual method and a dummy. The sperm-rich fraction was collected in a prewarmed thermo flask, and the gel fraction was held on a gauze tissue covering the thermo opening. The semen was then diluted with isothermal Beltsville Thawing Solution extender (BTS; Pursel and Johnson, 1975).

### Freezing and Thawing Protocol

Semen samples were processed using the straw-freezing procedure described by Westendorf et al (1975) with minor modifications, as indicated below. Diluted semen was placed at 15°C for 2 hours and centrifuged at  $800 \times g$  for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the semen pellet was resuspended with lactose egg yolk (LEY) extender (80 mL of 11% lactose and 20 mL egg yolk) to provide  $1.5 \times 10^9$  spermatozoa/mL. After further cooling to 5°C for 120 minutes, two parts of LEY-

extender semen were mixed with LEY extender with 1.5% Orvus Es Paste (Equex-Paste, Minitüb, Tiefenbach, Germany) and 9% glycerol. The final concentration of semen to be frozen was  $1 \times 10^9$  spermatozoa/mL and 3% glycerol. The diluted and cooled semen was loaded into 0.5-mL straws (Minitüb), sealed, and transferred to a programmable freezer (Icecube 1800; Minitüb) and frozen horizontally in racks. The freezing rate was 1°C/min from 5°C to -4.5°C, 1 minute at -4.5°C, and then 30°C/min from -4.5°C to -180°C. The straws were then stored in liquid nitrogen until thawing.

Thawing was carried out by immersing the straws in a circulating water bath at 52°C for 12 seconds (Sellés et al, 2003). Immediately after thawing, the semen was diluted in the thawing media (BTS with or without GSH addition) at 37°C and maintained 30 minutes in these media before being assayed.

### Analysis of Seminal Parameters by Microscopy

Percentage motility and progression were determined by placing two sample aliquots on warm glass slides (37°C) and examining them under light microscopy (magnification  $\times 100$ ). The percentage of motile sperm was estimated to the nearest 10% (MOT) and the forward progressive motility, using an arbitrary scale from 0 to 5.

### Motion Parameters

Motion parameters were determined using a CASA system (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain). The CASA-derived motility characteristics studied were curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearity of the curvilinear trajectory (LIN, ratio of VSL/VCL, %), straightness (STR, ratio of VSL/VAP, %), amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ), wobble of the curvilinear trajectory (WOB, ratio of VAP/VCL, %), and beat cross-frequency (BCF, Hz).

A 7- $\mu\text{L}$  drop of the sample was placed on a warmed (37°C) slide and covered with a  $24 \times 24$  mm cover slip. The setting parameters were: 25 frames, of which spermatozoa had to be present in at least 15 to be counted; images were obtained at  $\times 200$  magnification in a contrast phase microscope. Spermatozoa with a VAP less than 20  $\mu\text{m/s}$  were considered immotile. A minimum of five fields per sample was evaluated, counting a minimum of 200 spermatozoa per subsample.

### Analysis of Seminal Parameters by Flow Cytometry

Flow cytometric analyses were performed on a Coulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter Inc, Miami, Fla). A 15-mW argon ion laser operating at 488 nm excited the fluorophores. Data from 10,000 events per sample were collected in list mode, and four measures per sample were recorded. Flow cytometric data were analyzed using the program Expo32ADC (Beckman Coulter Inc) using a gate in forward and side scatter to exclude eventual remaining debris and aggregates from the analysis.

### Assessment of Sperm Capacitation

To detect increase in plasma membrane lipid-packing disorder, sperm samples were stained with merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 (Harrison et al, 1996). Stock solutions of M540 (1 mM) and Yo-Pro 1 (25  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes, Eugene, Ore) in



DMSO were prepared. For each 1 mL diluted semen sample (containing  $5\text{--}10 \times 10^6$  cells), 2.7  $\mu\text{L}$  M540 stock solution (final concentration of 2.7  $\mu\text{M}$ ) and 1  $\mu\text{L}$  of Yo-Pro (25 nM final concentration) were added. M540 fluorescence was collected with a FL2 sensor, using a 575-nm band-pass filter, and Yo-Pro 1 with a FL1 sensor, using a 525-nm band-pass filter. Cells were classified in three categories: low merocyanine fluorescence (viable, incapacitated), high merocyanine fluorescence (viable, capacitated), or Yo-Pro-1 positive (dead).

#### *Sulfhydryl Group Content of Proteins from the Sperm Surface*

The sulfhydryl group content of proteins from the sperm surface were evaluated with a fluorescent staining 5-iodoacetamidofluoresceine (5-IAF). Seminal samples (1 mL of semen with  $5\text{--}10 \times 10^6$  cells) were incubated with 5  $\mu\text{L}$  of 5-IAF stock solution (500  $\mu\text{M}$ ), final solution 2.5  $\mu\text{M}$ , and 5  $\mu\text{L}$  propidium iodide (PI) stock solution (500 mg/mL) at room temperature for 10 minutes. Green 5-IAF fluorescence was collected with a FL1 sensor using a 525-nm band-pass filter, and red PI fluorescence was collected with a FL3 sensor using a 650-nm band-pass filter. Cells were classified in three categories: low 5-IAF fluorescence (viable, intact proteins), high 5-IAF fluorescence (viable, altered proteins), or PI positive (dead).

#### *Production of Reactive Oxygen Species*

Production of ROS was measured by incubating the spermatozoa in thawing media (BTS with and without the addition of GSH) in the presence of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) (0.5  $\mu\text{M}$ ) during 30, 60, and 90 minutes at 37°C. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production.  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  is a stable cell-permeable nonfluorescent probe. It is deesterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein on oxidation. Green 5-IAF fluorescence was collected with a FL1 sensor using a 525-nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean green intensity fluorescence units (mean channel in the FL1), and it was used as index of ROS generation.

#### *Determination of Chromatin Condensation*

Sperm chromatin was stained with propidium iodide for the determination of sperm chromatin condensation (Molina et al, 1995; Cordova et al, 2002).

Thawed samples were centrifuged ( $1200 \times g$  for 3 minutes), and the pellet resuspended in a solution of ethanol and Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (70/30 v/v) for 30 minutes for the sperm membranes' permeabilization. After that, the samples were centrifuged, the supernatant discarded, and the pellet resuspended in a propidium iodide solution (PI, 10 mg/mL) in PBS. Samples were maintained in the darkness for 1 hour before flow cytometric analysis. Red PI fluorescence was collected with a FL3 sensor using a 650-nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean red intensity fluorescence units (mean channel in the FL3), and they were used as an index of the state of the chromatin condensation, as this is directly related to the PI uptake by DNA.

#### *In Vitro Penetration*

Sperm in vitro penetration ability was assessed using immature oocytes, as previously described (Gadea et al, 1998) with minor modifications. In brief, porcine oocytes were collected from fresh ovaries from prepubertal gilts weighing approximately 95 kg, just after slaughter at a local abattoir, and transported to the laboratory within 30 minutes in saline (0.9% w/v NaCl) containing 100 mg  $\text{mL}^{-1}$  kanamycin at 37°C. Cumulus-oocyte complexes were collected from nonatretic follicles (3–6 mm in diameter) by slicing and were washed twice in modified Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  polyvinyl alcohol. Only oocytes with a homogeneous cytoplasm and a complete and dense cumulus oophorus were used. The selected complexes were then again washed twice in fertilization medium, previously equilibrated for a minimum of 3 hours at 38.5°C under 5%  $\text{CO}_2$  in air.

The sperm samples (diluted in BTS with or without GSH) were maintained at 37°C for 30 minutes, washed ( $1200 \times g$ , 3 minutes), and then resuspended in the corresponding IVF medium. Each group of 15 immature oocytes was coincubated with spermatozoa ( $10^7$  cells/mL) for 18 hours in a Petri dish containing 2 mL of fertilization medium modified Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (Rath et al, 1999) at 38.5°C under 5%  $\text{CO}_2$  in air. At the end of the coincubation period, oocytes were stripped of cumulus cells and attached spermatozoa, mounted on slides, and fixed for a minimum of 24 hours with ethanol:acetic acid (3:1 v/v). They were later stained with 1% lacmoid and examined for evidence of sperm penetration under a phase contrast microscope (magnification  $\times 400$ ). Immature oocytes were considered to be penetrated when spermatozoa heads and their corresponding tails were found in the vitellus.

#### *Experimental Design*

To examine the effect of GSH supplementation during the thawing process, spermatozoa from five freezing batches of pooled ejaculates from three boars were processed without addition of GSH (control) and with addition of 1 or 5 mM GSH to the BTS thawing extender, and maintained 30 minutes in these media before assayed.

#### *Effect of the Addition of GSH to the Thawing Media on Sperm Function*

Seminal samples were evaluated for percentage motility and forward progressive motility by microscopic observation, motion parameters by CASA, capacitation status by merocyanine 540 and plasma membrane integrity by Yo-Pro 1, sulfhydryl group content in membrane protein by 5-IAF and plasma membrane integrity by propidium iodide, reactive oxygen formation by  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  staining, and chromatin condensation by propidium iodide staining.

### ***Effect of the Addition of GSH to the Thawing Media on Sperm In Vitro Penetration Ability of Immature Oocytes***

#### *Statistical Analysis*

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed by ANOVA, considering the specific sperm treatment (GSH addition)

Table 1. Motility parameters measured by CASA. Frozen boar spermatozoa thawed in BTS medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)\*

	Motility (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)
Thawing media									
Control	33.08 $\pm$ 1.79	77.03 $\pm$ 1.67	25.93 $\pm$ 1.41	42.93 $\pm$ 1.58	2.75 $\pm$ 0.13	32.75 $\pm$ 1.40	59.03 $\pm$ 1.44	54.10 $\pm$ 1.19	6.77 $\pm$ 0.39
1 mM GSH	33.31 $\pm$ 1.86	77.50 $\pm$ 1.86	25.93 $\pm$ 1.59	42.34 $\pm$ 1.76	2.95 $\pm$ 0.20	32.41 $\pm$ 1.32	59.43 $\pm$ 1.48	52.88 $\pm$ 1.31	6.66 $\pm$ 0.37
5 mM GSH	37.98 $\pm$ 2.09	78.22 $\pm$ 1.63	26.67 $\pm$ 1.63	42.16 $\pm$ 1.26	2.95 $\pm$ 0.16	31.66 $\pm$ 1.16	59.93 $\pm$ 1.38	52.95 $\pm$ 0.89	6.40 $\pm$ 0.38
Source variation <i>P</i> values									
GSH	0.158	0.831	0.540	0.319	0.158	0.652	0.849	0.159	0.776
Batch	0.000	0.704	0.026	0.070	0.861	0.000	0.000	0.000	0.006
Interaction	0.545	0.306	0.661	0.108	0.438	0.737	0.830	0.106	0.587

\* VCL indicates curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity; VAP, average path velocity; LIN, linearity of the curvilinear trajectory; STR, straightness; ALH, amplitude of lateral head displacement; WOB, Wobble (VAP/VCL); and BCF, beat cross-frequency.

Table 2. Motility parameters measured by microscopic analysis; frozen boar spermatozoa thawed in BTS medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)\*

	Motility (%)	FPM* (%)
Thawing media		
Control	26.39 $\pm$ 2.13	2.58 $\pm$ 0.11
1 mM GSH	28.61 $\pm$ 2.28	2.61 $\pm$ 0.11
5 mM GSH	30.83 $\pm$ 2.53	2.64 $\pm$ 0.11
Source variation <i>P</i> values		
GSH	0.112	0.959
Batch	0.000	0.000
Interaction	0.670	0.623

\* BTS indicates Beltsville Thawing Solution extender; FPM, forward progressive motility.

and the freezing batches as the main variables. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared using the Fisher's least significant difference post hoc test. Differences were considered statistically significant at  $P < .05$ .

In vitro penetration rate data (categorical data) were modeled according to the binomial model of parameters and were analyzed by ANOVA.

## Results

### Effect of the Addition of GSH to the Thawing Media on Sperm Function

The addition of GSH to the thawing extender for 30 minutes did not have a significant effect on the motility parameters evaluated. The motion parameters monitored by CASA were similar to those evaluated by direct microscopic evaluation (Tables 1 and 2). Nevertheless, a higher motility score was recorded by CASA than by microscopic observation. Percentage motility (by CASA) ranged from 33.08 in the control group to 37.98 in the 5-mM GSH group. However, this difference did not reach statistical significance ( $P > .05$ ). Most of the motion parameters were affected by the freezing batch, but they presented a similar pattern under the same treatments. Although no significant differences were found for percentage of motility (both CASA and microscopic analysis), a slight tendency toward an increase in percentage motility was observed when GSH is added.

The addition of GSH to the thawing media reduced the percentage of capacitated viable sperm in a dose-dependent manner ( $P = .003$ , Table 3) and reduced the percentage of viable spermatozoa with changes in the sulfhydryl groups in membrane proteins ( $P < .04$ , Table 4). In both cases, no significant differences were observed with regard to the percentage of dead spermatozoa, and a significant batch effect was observed ( $P < .01$ , Tables 3 and 4).

The generation of ROS increased as a function of in-

Table 3. Capacitation status; subpopulations of spermatozoa after staining with merocyanine 540 and Yo-Pro 1 and examined by flow cytometry; boar frozen spermatozoa thawed in BTS medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)\*

	Viable Capacitated†	Viable Noncapacitated	Dead
Thawing media			
Control	16.44 ± 0.77 <sup>a</sup>	43.60 ± 1.39	39.96 ± 1.62
1 mM GSH	15.07 ± 0.59 <sup>b</sup>	45.91 ± 1.59	39.02 ± 1.65
5 mM GSH	14.35 ± 0.50 <sup>c</sup>	43.52 ± 1.68	42.13 ± 1.74
Source variation <i>P</i> values			
GSH	0.003	0.361	0.307
Batch	0.000	0.000	0.000
Interaction	0.080	0.263	0.376

\* BTS indicates Beltsville Thawing Solution extender.

† Numbers with different superscript letters differ ( $P < .05$ ).

cubation time (30, 60, and 90 minutes), and ROS levels were significantly reduced following addition of GSH to the thawing media ( $P < .0001$ , Table 5). Mean values of ROS generation for the GSH groups were close to 50% of the values of the control group (control: 140.45 vs. 1 mM GSH: 74.64 and 5 mM GSH: 66.32 fluorescence units).

Chromatin condensation was equally affected by the addition of GSH ( $P = .0013$ ). When GSH was added, a lower chromatin condensation was observed, as reflected by higher red fluorescence intensity and higher PI uptake (control: 78.11 ± 2.32 vs. 1 mM GSH: 89.24 ± 2.28 and 5 mM GSH: 92.85 ± 3.42 fluorescence units).

#### *Effect of the Addition of GSH to the Thawing Media on Sperm In Vitro Penetration Ability*

The data from the in vitro penetration assays showed that addition of GSH to the thawing media had a positive effect on the parameters studied in a dose-dependent manner ( $P < .001$ , Table 6). For the penetration rate and mean number of sperm per penetrated oocyte, a significant effect of the interaction between GSH addition and batches was detected ( $P < .05$ ). When GSH was added to the thawing extender, a higher proportion of decondensed sperm heads was observed inside the oocyte (18.52 vs 24.20 and 34.52%;  $P = .002$ , Table 6).

## Discussion

Freezing is associated with damage of sperm function, affecting those processes required for successful in vivo fertilization of the oocyte (Bailey et al, 2000). During freezing, two important processes have been reported: first, production of ROS (Bilodeau et al, 2000; Ball et al, 2001) that can induce changes in membrane function and structure. Because the posttranslational modification of protein thiols is one of the major mechanisms of redox regulation, and freezing could affect this process, this detrimental effect of freezing could be prevented, at least in part, by addition of exogenous GSH because the cell employs GSH and thioredoxin systems to reverse oxidative stress. Second is an alteration in antioxidant defense systems (Bilodeau et al, 2000), including a decrease in intracellular GSH content (Bilodeau et al, 2000; Gadea et al, 2004). So, one obvious way to improve the viability and subsequent fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm would be the addition of antioxidants to the freezing and thawing media.

In this study, we evaluated the effects of GSH supplementation of the thawing extender on sperm function to compensate the observed decrease in GSH content pro-

Table 4. Alteration of sulfhydryl group on the sperm membrane protein; subpopulations of spermatozoa after staining with 5-IAF and propidium iodide and examined by flow cytometry; boar frozen spermatozoa thawed in BTS medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)\*

	Viable Altered SH†	Viable Nonaltered SH	Dead
Thawing media			
Control	7.24 ± 0.31 <sup>a</sup>	60.14 ± 0.95	32.61 ± 0.95
1 mM GSH	6.83 ± 0.29 <sup>ab</sup>	60.79 ± 1.06	32.38 ± 1.08
5 mM GSH	6.41 ± 0.21 <sup>b</sup>	60.85 ± 1.04	32.73 ± 1.06
Source variation <i>P</i> values			
GSH	0.004	0.868	0.340
Batch	0.002	0.000	0.000
Interaction	0.001	0.946	0.486

\* BTS indicates Beltsville Thawing Solution extender; SH, sulfhydryl.

† Numbers with different superscript letters differ ( $P < .05$ ).

Table 5. ROS generation (mean channel of fluorescence) by boar frozen spermatozoa thawed in BTS medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) during different time of incubation\*

	30 min	60 min	90 min	Mean Value†	Source Variation P Values	ROS Generation
Thawing media						
Control	127.85 ± 6.39	142.11 ± 3.29	149.19 ± 3.21	140.45 ± 3.75 <sup>a</sup>	GSH	< .0001
1 mM GSH	69.12 ± 1.69	74.50 ± 2.70	79.17 ± 2.86	74.64 ± 1.64 <sup>b</sup>	Time	.0004
5 mM GSH	61.91 ± 0.87	66.90 ± 0.77	69.39 ± 2.09	66.32 ± 1.05 <sup>c</sup>	Interaction	.4244

\* BTS indicates Beltsville Thawing Solution extender; ROS, reactive oxygen species.

† Numbers with different superscript letters differ ( $P < .05$ ).

duced during the sperm freezing. The main findings emerging from this study indicate that addition of GSH to the thawing media resulted in a lower number of capacitated viable spermatozoa, a decrease in the number of spermatozoa with changes in sulfhydryl groups in membrane proteins, a reduction in ROS generation, lower chromatin condensation, and a higher oocyte penetration rate in vitro and a higher proportion of decondensed sperm heads inside the oocyte. This protective effect on sperm function was more pronounced with 5 mM GSH than with 1 mM GSH.

Addition of GSH to the freezing and thawing extenders would be expected to improve the quality and fertilizing ability of frozen-thawed boar spermatozoa (Nishimura and Morii, 1993; Gadea et al, 2004, 2005), as addition of GSH has been shown to help to maintain sperm motility (Lindemann et al, 1988; Bilodeau et al, 2001, Foote et al, 2002; Funahashi and Sano, 2005) and to protect sperm against oxidative damage (Alvarez and Storey, 1989). In this study, no significant effect on percentage motility and motion parameters was found after addition of GSH to the thawing medium. In contrast, motility significantly improved when GSH was added to the freezing media (Gadea et al, 2005). This observation could be related to the contact time of GSH with the sperm cells. When GSH was added to the freezing media, exposure time was lon-

ger (at least 90 minutes) than when it was added to the thawing media (30 minutes). Perhaps 30 minutes was an insufficient contact time to produce a significant effect on the motility pattern. The other possible explanation could be related to the variability associated to the different batches used in this study that could mask the GSH effect.

The results of this study indicate that GSH probably affects plasma membrane lipid packing and sulfhydryl group content in membrane proteins in sperm, as reflected by the lower percentage of capacitated sperm and the lower number of crosslinked proteins observed when GSH was added to the thawing media. Similar results were found when GSH was added to the freezing media (Gadea et al, 2005).

The initiation of the sperm capacitation process is related to an alteration in the redox balance between ROS generation and the activity of the antioxidant defense mechanisms (Aitken et al, 1989; Griveau and Le Lannou, 1997). GSH could be an important regulator of the scavenging system and one of the most important nonenzymatic antioxidants in sperm. In this study, a decreased ROS generation was found when GSH was present in the thawing media, indicating that it may be responsible, at least in part, for the lower disruption of lipid packing and the lower changes in membrane proteins. Nevertheless, studies on these cellular changes affect sperm function,

Table 6. In vitro penetration ability of boar frozen spermatozoa thawed in BTS medium with or without the addition of reduced glutathione (GSH)\*†

	N Oocytes	Penetration Rate (%)	Sperm per Penetrated Oocyte‡	Decondensed Sperm (%)
Thawing media				
Control	307	35.18 ± 2.73 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.06 <sup>a</sup>	18.52 ± 3.76 <sup>a</sup>
1 mM GSH	308	51.94 ± 2.85 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.07 <sup>b</sup>	24.20 ± 3.43 <sup>b</sup>
5 mM GSH	285	58.95 ± 2.92 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.08 <sup>c</sup>	34.52 ± 3.68 <sup>c</sup>
Source variation P values				
GSH		0.000	0.000	0.002
Batch		0.000	0.001	0.000
Interaction		0.026	0.039	0.831

\* BTS indicates Beltsville Thawing Solution extender; N, number of immature oocyte inseminated.

† Numbers with different superscript letters differ ( $P < .05$ ).

‡ Related to penetrated oocytes.



and whether these changes could be reversed by antioxidants is open to further investigations (reviewed by Sikka, 2004).

One of the main findings emerging from this study is that the addition of GSH to the thawing extender significantly improves sperm's in vitro oocyte penetration ability, as we previously hypothesized (Gadea et al, 2004). Therefore, cryopreservation-induced oxidative stress in boar sperm affects a sperm property that is related to both sperm binding and penetration of the zona pellucida, sperm-oocyte membrane fusion, oocyte activation, or pronuclear formation. In this sense, the membrane fusion events involved in binding with the oolema and the acrosome reaction appear to be more vulnerable to ROS-induced damage than overall motility (Aitken et al, 1989). Also, we have previously shown that IVF is a highly valuable tool to assess boar semen fertilizing ability in both refrigerated and frozen-thawed semen (Selles et al, 2003; Gadea et al, 1998).

Another important observation is the higher proportion of decondensed sperm heads found inside the oocytes when GSH was added to the thawing extender. We had previously reported improved male pronuclear formation ratios in an IVM/IVF system when oocytes matured in vitro were used (Gadea et al, 2004). In this way, up to now, the main factors associated with sperm head decondensation were related to the enzymatic mechanisms present in the oocyte cytosol (Funahashi et al, 1995). However, GSH also participates in the decondensation of the paternal genome after oocyte penetration (Calvin et al, 1986; Perreault et al, 1988) and may alter spindle microtubule formation in the ovum (Sikka, 2004). These results indicate that pretreatment of sperm with GSH could have an additional effect on sperm decondensation and male pronuclear formation inside the oocyte. Also, Boquest et al (1999) reported a higher embryo development rate when GSH was present during the gamete incubation. Further studies are needed to clarify these observations.

With regard to the sperm chromatin condensation/decondensation status, it is well known that sperm freezing induces chromatin hypercondensation (Hamamah et al, 1990; Cordova et al, 2002). In this study, a lower level of sperm chromatin condensation was observed when GSH was added. This protective effect of GSH could be the result of two different mechanisms: an indirect one, by reducing oxidative stress, thiol oxidation, and hypercondensation of sperm chromatin, and a direct one, by inducing sperm decondensation, as it normally occurs in the cytosol of the oocyte after sperm penetration. In addition, GSH may also be acting by reducing oxidative stress-induced DNA oxidation and DNA fragmentation (reviewed by Agarwal and Said, 2003).

In any case, important questions still remain to be solved. Is GSH content in raw semen a good predictor of

semen quality following the freeze-thaw cycle? In a recent paper Meseguer et al (2004) found a negative correlation between postthaw motile sperm recovery rate and GSH concentration in raw human semen. In boar sperm, a direct correlation was found between acrosome status in frozen-thawed spermatozoa and GSH content in fresh semen ( $r = 0.36$ ,  $P = .02$ ), whereas no significant correlation was found for motility and viability (Gadea, unpublished data).

Other interesting questions are: How is GSH produced by the sperm cell? How is GSH metabolized in this highly specialized cell? In other type of cells, intracellular GSH levels are maintained indirectly by two tightly coupled enzymatic processes involving  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and membrane-bound dipeptidases that supply amino acids for GSH and protein biosynthesis.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase is widely expressed in many mammalian tissues, and it is essential for catalyzing secreted GSH into cysteinyl-glycine and  $\gamma$ -glutamic acid. After cleavage of cysteinyl-glycine by a dipeptidase, the amino acids are reabsorbed and used to synthesize GSH, a process known as the  $\gamma$ -glutamyl cycle. The generation of GSH is crucial for the protection of cells against oxidative stress and other forms of cellular injury. Although GSH metabolic pathways are known, little is known about GSH metabolism in sperm. Glutamyl transpeptidase is present in the mid-piece and acrosomal regions of spermatozoa (Funahashi et al, 1996; Boilart et al, 2002), and it also has been detected in seminal fluid (Tate and Meister, 1981; Zalata et al, 1995). In fact, it has been used for semen identification in forensic samples (Abe et al, 1998).

In conclusion, GSH appears to play an important role in sperm antioxidant defense strategy. The addition of GSH to the thawing extender could be of significant benefit in improving the function and fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa.

## Acknowledgment

We thank Dr Juan G. Alvarez for critical review and editing of the manuscript.

## References

- Abe S, Kunii S, Fujita T, Hiraiwa K. Detection of human seminal gamma-glutamyl transpeptidase in stains using sandwich ELISA. *Forensic Sci Int.* 1998;91:19-28.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003;9:331-345.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41:183-197.
- Alvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL, Evenson DP. Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level

- of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril*. 2004;81:712–713.
- Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*. 1989;23:77–90.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. 2000;21:1–7.
- Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*. 2001;62:508–515.
- Berger T, Anderson DL, Penedo MCT. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim Reprod Sci*. 1996;44:231–239.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 2001;56:275–286.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*. 2000;55:282–288.
- Boilard M, Bailey J, Collin S, Dufour M, Sirard MA. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. *Biol Reprod*. 2002;67:1125–1132.
- Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH, Day BN. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology*. 1999;51:1311–1319.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 1994;31:224–238.
- Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res* 1986;14:265–275.
- Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev*. 2001;60:498–506.
- Cordova A, Perez-Gutierrez JF, Lleo B, Garcia-Artiga C, Martin-Rillo S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology*. 2002;57:2119–2128.
- Evenson DP, Thompson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994;41:637–651.
- Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24:59–66.
- Foot RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*. 2002;71:13–23.
- Funahashi H, Machaty Z, Prather RS, Day BN. gamma-Glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. *Mol Reprod Dev*. 1996;45:485–490.
- Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. *Theriogenology*. 2005;63:1605–1616.
- Funahashi H, Stumpf TT, Cantley TC, Kim NH, Day BN. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro-matured porcine oocytes following in vitro fertilisation and/or electrical activation. *Zygote*. 1995;3:273–281.
- Gadea J, García-Vazquez FA, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl*. 2005;26:396–404.
- Gadea J, Matas C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci*. 1998;54:95–108.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation; Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 2004;62:690–701.
- Gadea J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 2005;63:431–444.
- Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 2001;68:239–247.
- Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997;20:61–69.
- Hamamah S, Royere D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev*. 1990;30:59–64.
- Harrison RA. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997;52:195–211.
- Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev*. 1996;45:378–391.
- Irvine DS. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod*. 1996;1:6–12.
- Lindemann CB, O'Brien JA, Giblin FJ. An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reacted bull sperm models. *Biol Reprod*. 1988;38:114–120.
- Meseguer M, Garrido N, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl*. 2004;25:773–780.
- Molina J, Castilla JA, Gil T, Hortas ML, Vergara F, Herruzo A. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod*. 1995;10:1280–1286.
- Nishimura K, Morii H. Effects of glutathione on the motility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Anim Sci Technol (Jpn)*. 1993;64:433–439.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VI. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*. 1988;125:181–186.
- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*. 1975;40:99–102.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci*. 1999;77:3346–3352.
- Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*. 2003;38:312–318.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim*. 2003;38:66–72.
- Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004;25:5–18.
- Tate SS, Meister A. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem*. 1981;39:357–368.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002;57:149–179.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. Deep freezing of boar spermatozoa. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillete method [in German]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1975;82:261–267.
- Zalata A, Hafez T, Mahmoud A, Comhaire F. Relationship between resazurin reduction test, reactive oxygen species generation, and gamma-glutamyltransferase. *Hum Reprod*. 1995;10:1136–1140.

ORIGINAL ARTICLE

# Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa

Joaquín Gadea, David Gumbao, Sebastián Cánovas, Francisco Alberto García-Vázquez, Luis Alberto Grullón and Juan Carlos Gardón

Department of Physiology, School of Veterinary, University of Murcia, Murcia, Spain

## Summary

### Keywords:

bull spermatozoa, capacitation status, cryopreservation, in vitro fertilization, oxidative stress

### Correspondence:

Joaquín Gadea, Department of Physiology, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain. E-mail: jgadea@um.es, <http://www.um.es/grupos/fisiomet>

Received 2 November 2006; revised 23 January 2007; accepted 25 January 2007

doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00756.x

In this study, we evaluated the effects of glutathione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) supplementation of the thawing extender on bull semen parameters to compensate for the decrease in GSH content observed during sperm freezing. To address these questions fully, we used a set of functional sperm tests. These included tests of sperm motility assayed by computer-assisted semen analysis, membrane lipid packing disorder, spontaneous acrosome reaction, free radical production [reactive oxygen species (ROS) generation], sperm chromatin condensation, DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling and acridine orange staining measured by flow cytometry. Finally, the in vitro penetrability of in vitro matured oocytes and the in vitro production of embryos were evaluated. The main findings emerging from this study were that addition of GSH to the thawing medium resulted in: (i) a higher number of non-capacitated viable spermatozoa; (ii) a reduction in ROS generation; (iii) lower chromatin condensation; (iv) lower DNA fragmentation; (v) higher oocyte penetration rate in vitro and (vi) higher in vitro embryo production compared with control group. Nevertheless, GSH had no significant effect on motion parameters or the occurrence of the spontaneous acrosome reaction. Addition of GSH to the thawing extender could be of significant benefit in improving the function and fertilizing capacity of frozen bull spermatozoa.

## Introduction

The processes of cooling, freezing and thawing produce physical and chemical stress on the sperm membrane that reduces their viability and fertilizing ability. The cold shock of spermatozoa is associated with oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) generation (Chatterjee *et al.*, 2001). Glutathione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine) (GSH) is a tripeptide ubiquitously distributed in living cells and it plays an important role as an intracellular defence mechanism against oxidative stress. The process of freezing is associated with a significant reduction in GSH content in porcine (Gadea *et al.*, 2004), bovine (Bilodeau *et al.*, 2000) and human sperm (M. Molla and J. Gadea, unpublished observations). Sperm freezing has also been reported to result in a reduction in

sperm viability, changes in sperm function, lipid composition and organization of the sperm plasma membrane (reviewed by Foote & Parks, 1993; Bailey *et al.*, 2000).

We have previously reported the effect of addition of GSH to the freezing and thawing extender on boar sperm cryosurvival (Gadea *et al.*, 2004, 2005a,b), as well as in human, ovine and goat spermatozoa (M. Molla, E. Sellés, J. C. Gardón and J. Gadea, unpublished observations). However, few studies have investigated the precise mechanism by which GSH could mediate this effect (Foote *et al.*, 2002). Therefore, more thorough studies are needed to elucidate what changes in sperm function take place during cryopreservation and the mechanism(s) by which GSH exerts its effect(s). To answer these questions, we used a set of functional sperm tests. These included tests of sperm motility assayed by computer-assisted semen

analysis (CASA), membrane lipid packing disorder, spontaneous acrosome reaction, free radical production (ROS generation), sperm chromatin condensation and DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) and acridine orange (AO) staining measured by flow cytometry. Finally, the *in vitro* penetrability of *in vitro* matured oocytes and the *in vitro* production of embryos were evaluated. Therefore, *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* embryo production could also be helpful in identifying changes in sperm function that standard assays fail to detect (Rodríguez-Martínez, 2003; Gadea, 2005; Graham & Moce, 2005).

With the increasing evidence that oxidative stress is a major cause of DNA damage in spermatozoa (Aitken *et al.*, 1998), it was important to determine if any improvement in survival and fertility of cryopreserved bull spermatozoa could be accomplished by treating semen and/or semen extender with various combinations of antioxidants (Foote *et al.*, 2002).

The main objective of this study was to evaluate the effect of GSH supplementation of the thawing extender on bull sperm function.

## Materials and methods

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich Química, S.A. (Madrid, Spain) unless otherwise indicated.

### Semen handling

Frozen bull spermatozoa from six fertile bulls of autochthonous Spanish breed 'Asturiana de Valles' generously provided by the Breeders Association (ASEAVA, Gijón, Asturias, Spain) were used. Straws (0.5 mL) were thawed in a water bath at 37 °C for 30 sec and the content was diluted in Tyrode's sperm medium (sperm-TALP; Parrish *et al.*, 1988) without addition of GSH (control), and with addition of 1 mM or 5 mM GSH to the sperm-TALP medium and maintained 30 min at 37 °C in this medium before assayed.

### Analysis of the motion parameters

Motion parameters were determined using a CASA system (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain). The CASA-derived motility characteristics studied were total motility (%), progressive motility (%), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearity of the curvilinear trajectory (LIN, ratio of VSL/VCL, %), straightness (STR, ratio of VSL/VAP, %), wobble of the curvilinear trajectory (WOB, ratio of VAP/VCL, %), amplitude of

lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ) and beat cross-frequency (BCF, Hz).

A 7  $\mu\text{L}$  drop of the sample was placed on a warmed (37 °C) slide and covered with a 24  $\times$  24 mm cover slip. The setting parameters were: 25 frames in which spermatozoa had to be present in at least 15 in order to be counted, images were obtained at  $\times 200$  magnification in a contrast phase microscope. Spermatozoa with a VAP < 20  $\mu\text{m/s}$  were considered immotile. A minimum of five fields per sample was evaluated, counting a minimum of 200 spermatozoa per sub-sample.

### Analysis of seminal parameters by flow cytometry

Flow cytometric analyses were performed on a Coulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA). A 15 mW argon ion laser operating at 488 nm excited the fluorophores. Data from 10 000 events per sample were collected in list mode, and four measures per sample were recorded. Flow cytometric data were analysed using the program Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.) using a gate in forward and side scatter to exclude eventual remaining debris and aggregates from the analysis.

### Assessment of plasma membrane lipid packing disorder

To detect an increase in plasma membrane lipid packing disorder, sperm samples were stained with merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 (Harrison *et al.*, 1996). Stock solutions of M540 (1 mM) and Yo-Pro 1 (25  $\mu\text{M}$ ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in DMSO, were prepared. For each 1 mL diluted semen sample (containing 5–10  $\times 10^6$  cells), 2.7  $\mu\text{L}$  M540 stock solution (final concentration of 2.7  $\mu\text{M}$ ) and 1  $\mu\text{L}$  of Yo-Pro (25 nM final concentration) were added. M540 fluorescence was collected with a FL2 sensor using a 575 nm band-pass filter and Yo-Pro 1 with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter. Cells were classified into three categories: low merocyanine fluorescence (viable, low disorder), high merocyanine fluorescence (viable, high disorder) or Yo-Pro-1 positive (dead).

### Acrosome reaction

Seminal samples (1 mL of semen with 5–10  $\times 10^6$  cells) were incubated with 2  $\mu\text{L}$  of fluorescein-labelled lectin from the peanut plant, *Arachis hypogaea* (FITC-PNA, 100 mg/mL) and 5  $\mu\text{L}$  of propidium iodide (PI) stock solution (500 mg/mL), at room temperature for 10 min. Fluorescence was measured using a FL-1 sensor, a 525 nm band-pass filter to detect FITC-PNA, and a FL-2 sensor and a 575 nm band-pass filter to detect PI. Three sperm subsets were detected: live acrosome intact,



live acrosome damaged and dead spermatozoa (with and without acrosome intact).

### Production of reactive oxygen species

Production of ROS was measured by incubating the spermatozoa in thawing medium (sperm-TALP) with and without the addition of GSH in the presence of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (0.5  $\mu$ M) for 60 min at 37 °C (Gadea *et al.*, 2005b). This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. H<sub>2</sub>DCFDA is a stable cell-permeable non-fluorescent probe. It is de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. Green fluorescence was collected with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean green intensity fluorescence units (mean channel in the FL1) and it was used as index of ROS generation.

### Determination of chromatin condensation

Sperm chromatin was stained with propidium iodide for the determination of sperm chromatin condensation (Gadea *et al.*, 2005b). Thawed samples after 30 min of incubation in the experimental media were centrifuged (1200  $g \times 3$  min) and the pellet resuspended in a solution of ethanol and phosphate-buffered saline (PBS) (70/30 v/v) for 30 min for the sperm membranes permeabilization. After that the samples were centrifuged, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in a propidium iodide solution (PI, 10 mg/mL) in PBS. Samples were maintained in darkness for 1 h before flow cytometric analysis. Red PI fluorescence was collected with a FL3 sensor using a 650 nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean red intensity fluorescence units (mean channel in the FL3) and it was used as an index of the state of the chromatin condensation, as this is directly related to the PI uptake by DNA.

### Evaluation of sperm DNA fragmentation by TUNEL

Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling staining was used to determine sperm DNA fragmentation according to the method described previously by Li *et al.* (1995). In brief, the cells were concentrated by centrifugation, fixed in a solution of ethanol and PBS (70/30 v/v), and stored overnight at -20 °C. Cells (aprox. 10<sup>6</sup>) were washed twice with PBS and resuspended in 50  $\mu$ L of Terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) reaction buffer containing: 10  $\mu$ L of 5 $\times$  concentrated buffer solution (Invitrogen S. A, Barcelona, Spain), 1  $\mu$ L (15 units) of TdT (Invitrogen), 0.25 nmoles of

fluorescein-dUTP (BODIPY®-FL-X-14-dUTP; Molecular Probes, C7614) (0.25  $\mu$ L) and 39  $\mu$ L distilled water.

Negative controls were incubated in fluorescein-dUTP in the absence of enzyme terminal transferase. The cells were incubated with the reaction buffer for 60 min at 37 °C, then rinsed twice and measured by flow cytometry. Green fluorescence was collected with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter and two populations were determined. The cells with fragmented DNA presented an intense green nuclear fluorescence. Measurements were expressed as the mean green intensity fluorescence units (mean channel in the FL1) and it was used as an index of the DNA fragmentation, as this is directly related to the dUTP uptake by DNA.

### Assessment of DNA fragmentation by the SCSA assay

Staining of single-stranded DNA in sperm samples was performed as previously described (Evenson *et al.*, 2002). Sperm samples were centrifuged and the pellet was washed once and resuspended in TNE buffer (containing 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris, pH 7.2) at 4 °C to a final concentration of 5  $\times 10^6$  cells/mL. Two hundred microlitres of this sperm suspension was mixed with 400  $\mu$ L of a detergent/acid solution of 0.1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, and 0.08 M HCl (pH 1.4). After 30 sec, cells were stained by adding 1.2 mL of a solution containing 6 mg/mL of AO in staining buffer [0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citric acid (pH 6.0)].

Stained cells were analysed by flow cytometry. Under these experimental conditions, when excited with a blue-light source, AO intercalates with double-stranded DNA and emits green fluorescence (detected in a fluorescence detector FL1). AO associated with single-stranded DNA emits red fluorescence (detected in a fluorescence detector FL3). Equivalent instrument settings were used for all samples. By using a double scatter plot for forward and sideways scatter and based on different scatter properties, non-sperm events were gated out.

This shift is expressed as the function alpha t ( $\alpha t$ ), which is the ratio of red to the total (i.e. red and green) fluorescence intensity, thus representing the amount of denatured DNA relative to the total cellular DNA. In the analysis,  $\alpha t$  was calculated for each spermatozoon in a sample and the results were expressed as the mean ( $X\alpha t$ ), the standard deviation of the  $\alpha t$  distribution ( $SD\alpha t$ ), and the percentage of cells with high  $\alpha t$  values, named 'cells outside the main population (% COMP $\alpha t$ )', representing the cells with an excess of denatured DNA. Recently, this terminology has been changed: 'the mean of  $\alpha t$ ' has been renamed 'x-DNA fragmentation index (X-DFI)'; 'SD  $\alpha t$ ' has become 'SD-DFI'; and 'COMP  $\alpha t$ '

has become 'DFP' (Evenson *et al.*, 2002). In this study, we use the new nomenclature.

### **In vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture of embryos.**

In vitro maturation (IVM) and IVF, were performed as previously described by Coy *et al.* (2005). Oocyte–cumulus cell complexes (COC) were collected from antral follicles (3–8 mm) and then cultured for 24 h (30–40 COC in each well of a Nunclon 4-well plate containing 500 µL oocyte maturation medium (OMM; M199 with Earle's salts, 10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L L-glutamine, 0.2 mmol/L sodium pyruvate, 50 mg/mL gentamicin, 0.3 mg/mL LH and 5.0 mg/mL FSH) at 38.5 °C in 5% CO<sub>2</sub> and humidified air.

Oocytes presumed mature, were fertilized with frozen-thawed semen (10<sup>6</sup> total sperm/mL). The sperm samples (diluted in sperm-TALP with or without GSH) were maintained at 37 °C for 30 min, washed (1200 × g, 3 min), and then resuspended in the corresponding IVF-TALP medium (Parrish *et al.*, 1988). After resuspension in the IVF medium, 100 µL of diluted spermatozoa was added to the 35-mm plastic dish containing the oocytes, giving a final sperm concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL.

In experiment 2a, 18 h after IVF, putative zygotes were denuded of cumulus and fixed for penetration evaluation. The total number of pronuclei (female and male) within each oocyte was determined by staining the embryos with Hoechst 33342 (10 mg/mL; 20 min).

In experiment 2b, after 18 h of coincubation with spermatozoa, the presumptive zygotes were stripped of cumulus cells by repeated passage through a fine pipette, and then washed three times with culture medium. KSOM medium was used for the basal culture medium. It consisted of 94.97 mM NaCl, 2.50 mM KCl, 1.71 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.20 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.35 mM KHPO<sub>4</sub>, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 21.09 mM sodium lactate, 0.6 mM sodium pyruvate, 73.1 mM L-glutamine, 3 mg/L EDTA, 0.2 mM D-glucose, 1% basal medium Eagles (BME) essential amino acids solution, 1% minimum essential medium (MEM) non-essential amino acids solution and 50 µg/mL gentamicin sulphate. The presumptive zygotes were cultured in 500 µL of KSOM supplemented with 3 mg/mL fatty acid-free BSA for 7 days at 39 °C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. At 48 h post-insemination, cleavage rates were recorded and the embryos were transferred to newly prepared medium. Embryos were examined for developmental stages at intervals of 48 h until 168 h under a dissecting microscope. Finally the total number of nuclei within blastocyst was determined

by staining the embryos with Hoechst 33342 (10 mg/mL; 20 min).

### **Experimental design**

To examine the effect of GSH supplementation during the thawing process, spermatozoa from six different bulls were incubated without addition of GSH (control), and with addition of 1 or 5 mM GSH to the sperm-TALP thawing medium and maintained for 30 min at 37 °C in these media before assayed. Each assay was evaluated four straws per bull.

#### *Effect of the addition of GSH to the thawing medium on sperm function.*

Seminal samples were evaluated for:

- 1 Motion parameters by CASA.
- 2 Lipid membrane disorder status by merocyanine 540 and plasma membrane integrity by Yo-Pro 1.
- 3 Acrosome reaction by FITC-PNA and plasma membrane integrity by propidium iodide.
- 4 Reactive oxygen formation by H<sub>2</sub>DCFDA staining.
- 5 Chromatin condensation by propidium iodide staining.
- 6 Evaluation of sperm DNA fragmentation by TUNEL.
- 7 Evaluation of the sperm DNA stability by the SCSA assay.

#### *Effect of the addition of GSH to the thawing medium on sperm in vitro penetration ability of in vitro matured oocytes.*

- 1 *In vitro penetration capacity.* The penetration rate, sperm number per penetrated oocyte and male pronuclear formation were evaluated after 18 h coculture of gametes.
- 2 *In vitro embryo production.* Ability of putative zygotes to cleave (assessed by recording the number of two- to four-cell embryos present at 72–75 h post-insemination) and to develop to the blastocyst stage was recorded on Day 3 and Day 8 post-IVF, respectively. The total number of nuclei within blastocysts (Day 8, 186–193 h post-insemination) was determined by staining with Hoechst 33342.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as the mean ± SEM and analysed by ANOVA, considering the specific sperm treatment (GSH addition) and the bulls as the main variables. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared by the least significant difference pairwise multiple comparison post hoc test (Tukey). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

In vitro penetration rate and cleavage data (categorical data) were modelled according to the binomial model of

parameters by arcsin transformation of the data and were analysed by ANOVA.

**Results**

**Effect of the addition of GSH to the thawing medium on sperm function**

Addition of GSH to the sperm-TALP medium for 30 min did not have a significant effect on the motility parameters evaluated (Table 1). Progressive motility (evaluated by CASA) ranged from 40.2% in the control group to 43.6% in the 5 mM GSH group. This difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The same pattern was observed for sperm velocities. The control group had 115.8  $\mu\text{m/s}$  for VCL and increased to 118.5 in the 5 mM GSH group. Only STR and BCF were affected by GSH addition, the 1 mM GSH group presented lower values for STR and BCF than control and 5 mM GSH group. For these parameters bull-GSH interaction was not significant.

The addition of GSH to the thawing medium increased both the percentage of viable low lipid disorder and of dead sperm in a dose-dependent manner ( $p < 0.01$ , Table 2). The viable low lipid disorder sperm increased from 58.8% in the control group to 61.0% in the 5 mM GSH group and reduced the percentage of dead spermatozoa ( $p < 0.01$ , Table 2) (ranged from 39.5% for control vs. 34.4% for 5 mM GSH). In both cases a significant bull effect was observed ( $p < 0.01$ , Table 2) but they presented a similar pattern under the same treatments (interaction between GSH treatment and bull  $\geq 0.05$ ).

The generation of ROS during the 60 min of incubation period was significantly reduced following the addition of GSH to the thawing medium ( $p < 0.01$ , Table 3). Mean values of ROS generation for the GSH groups were close to 50% of the values obtained in the control group (control: 13.0 vs. 1 mM GSH: 9.5 and 5 mM GSH: 7.8 arbitrary fluorescence units). A very low percentage of

**Table 2.** Membrane lipid packing disorder. Sub-populations of spermatozoa after staining with merocyanine 540 and Yo-Pro 1 and examined by flow cytometry. Bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)

	Viable high lipid disorder	Viable low lipid disorder	Dead
Thawing media			
Control	4.7 $\pm$ 0.2	58.8 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	39.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
1 mM GSH	4.9 $\pm$ 0.2	59.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	35.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
5 mM GSH	4.6 $\pm$ 0.3	61.0 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	34.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
Source variation <i>p</i> -values			
GSH	0.16	<0.01	<0.01
Bull	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.05	0.05	0.08

<sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Reactive oxygen species (ROS) generation (mean channel of fluorescence). Bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)

	ROS
Thawing media	
Control	13.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
1 mM GSH	9.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
5 mM GSH	7.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>
Source variation <i>p</i> -values	
GSH	<0.01
Bull	<0.01
Interaction	0.48

<sup>a,b,c</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

spermatozoa had a spontaneous acrosome reaction (spermatozoa acrosome reacted and viable were <0.5%) and no differences between experimental groups were observed (Table 4,  $p > 0.05$ ).

**Table 1.** Motility parameters measured by computer-assisted semen analysis. Frozen bull spermatozoa thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)

	% Progressive motility	% Motility	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Thawing media										
Control	40.2 $\pm$ 1.2	59.0 $\pm$ 1.4	115.8 $\pm$ 2.0	87.1 $\pm$ 2.2	98.3 $\pm$ 2.1	74.0 $\pm$ 0.7	87.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	83.9 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.16	6.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
1 mM GSH	41.00 $\pm$ 1.4	61.8 $\pm$ 1.6	114.0 $\pm$ 2.1	84.2 $\pm$ 2.0	96.9 $\pm$ 2.1	72.3 $\pm$ 0.7	85.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	83.7 $\pm$ 0.4	2.87 $\pm$ 0.0	5.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
5 mM GSH	43.6 $\pm$ 2.0	59.3 $\pm$ 1.3	118.5 $\pm$ 2.00	88.7 $\pm$ 2.1	100.3 $\pm$ 2.1	73.6 $\pm$ 0.7	87.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	83.5 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.0	6.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Source variation <i>p</i> -values										
GSH	0.19	0.35	0.16	0.18	0.34	0.16	<0.01	0.79	0.60	0.04
Bull	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.15	0.02	<0.01	0.01	0.01	0.50	0.30	0.07	0.04	0.47

VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity; VAP, average path velocity; LIN, linearity of the curvilinear trajectory; STR, straightness; ALH, amplitude of lateral head displacement; WOB, Wobble (VAP/VCL); BCF, beat cross-frequency.

<sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Acrosome reaction. Sub-populations of spermatozoa after staining with FITC-PNA and PI and examined by flow cytometry. Bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)

	Intact acrosome and viable	Acrosome reacted and viable	Dead
Thawing media			
Control	55.7 ± 0.6	0.3 ± 0.0	44.0 ± 0.6
1 mM GSH	55.8 ± 0.6	0.3 ± 0.0	43.9 ± 0.6
5 mM GSH	56.0 ± 0.6	0.3 ± 0.0	43.7 ± 0.6
Source variation <i>p</i> -values			
GSH	0.56	0.93	0.57
Bull	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.66	1.00	0.61

Chromatin condensation and stability were equally affected by the addition of GSH ( $p < 0.01$ ; Table 5). When GSH was added, a lower chromatin condensation was observed, as reflected by the higher red fluorescence intensity and higher PI uptake (control: 22.1 vs. 1 mM GSH: 25.2 and 5 mM GSH: 27.5 fluorescence units). The evaluation of DNA fragmentation by TUNEL showed a significant decrease from 22.3 (arbitrary units) for control group to 17.5 and 17.9 for 1 and 5 mM GSH respectively ( $p < 0.01$ , Table 5). These results were consistent with the data obtained from the AO staining expressed as the percent cells outside the main population of  $\alpha t$  (DNA fragmentation index DFI) and SD-DFI were significantly higher in the control group than in the GSH group ( $p < 0.01$ , Table 5).

#### Effect of the addition of GSH to the thawing medium on sperm in vitro penetration ability and embryo production

The data from the in vitro penetration assays showed that addition of GSH to the thawing medium had a positive effect on the penetration rate. The penetration rate was

higher when GSH was used (50.8% from control to 62.8% and 66.8% for 1 and 5 mM GSH respectively,  $p < 0.01$ , Table 6). No differences were found for either sperm per penetrated oocyte, monospermy rate or male nuclear formation. The male nuclear formation was very high (more than 90%) in all the IVF replicates. The bull affected the parameters studied significantly with the exception of the monospermy rate.

When embryo production was evaluated, the percentage of cleaved embryos on day 2 (2–4 cells), day 3 (8–16 cells) and morulae and blastocysts at day 7 was higher in the 5 mM GSH group than in control, with the 1 mM group showing intermediate values (Table 7). The number of nuclei within the blastocysts ranged from 39.9 to 47.7 with a high standard error of the mean (SEM). No differences were observed between experimental groups (Table 7).

#### Discussion

Freezing is associated with damage to sperm function affecting those processes required for successful in vivo fertilization of the oocyte (Bailey *et al.*, 2000). During freezing, two important processes have been reported: (i) production of ROS (Bilodeau *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001) that can induce changes in membrane function and structure and (ii) an alteration in antioxidant defence systems (Bilodeau *et al.*, 2000), including a decrease in intracellular GSH content (Bilodeau *et al.*, 2000; Gadea *et al.*, 2004). Therefore, the supplementation of the freezing and thawing medium with antioxidants could potentially be used to improve the viability and subsequent fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa.

In this study, we evaluated the effects of GSH supplementation of the thawing extender on sperm function in

**Table 5.** Chromatin condensation (mean red intensity fluorescence units), DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) (mean green intensity fluorescence units) and SCSA parameters of bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH)

	Chromatin condensation (PI uptake)	TUNEL	DFI (%)	x-DFI	SD-DFI
Thawing media					
Control	22.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	22.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	404.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	21.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
1 mM GSH	25.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	17.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	410.0 ± 0.9 <sup>a,b</sup>	18.1 ± 1.1 <sup>b</sup>
5 mM GSH	27.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	17.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	413.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	17.6 ± 0.6 <sup>b</sup>
Source variation <i>p</i> -values					
GSH	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	0.01
Bull	<0.01	0.39	0.01	0.24	0.28
Interaction	0.45	0.01	0.02	<0.01	0.08

DFI, DNA fragmentation index; X-DFI, mean value-DFI; SD-DFI, standard deviation-DFI (Evenson *et al.*, 2002).

<sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 6.** In vitro penetration ability of bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium with or without the addition of reduced glutathione (GSH)

	N oocytes	Penetration rate (%)	Sperm per penetrated oocyte*	Male pronuclear formation (%)*	Monospermy (%)*
Thawing media					
Control	244	50.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1	96.8 ± 1.69	80.4 ± 3.4
1 mM GSH	234	62.8 ± 3.2 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.0	94.5 ± 1.9	74.2 ± 3.4
5 mM GSH	244	66.8 ± 3.0 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.1	92.6 ± 2.0	76.8 ± 3.1
Source variation <i>p</i> -values					
GSH		<0.01	0.73	0.21	0.52
Bull		<0.01	<0.01	0.04	0.12
Interaction		0.05	0.97	0.53	0.65

Pool data from seven IVF replicates.

\*Related to penetrated oocytes.

<sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 7.** In vitro embryo production using bull frozen spermatozoa thawed in sperm-TALP medium with or without the addition of reduced glutathione (GSH)

	N oocytes	Embryos 2–4 cells	Embryos 8–16 cells	Morulae + blastocysts	No cells
Thawing media					
Control	233	47.6 ± 3.3 <sup>a</sup>	42.2 ± 3.5 <sup>a</sup>	22.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	47.7 ± 8.4
1 mM GSH	246	54.9 ± 3.2 <sup>a,b</sup>	49.6 ± 3.3 <sup>a,b</sup>	29.0 ± 3.4 <sup>a,b</sup>	42.6 ± 5.8
5 mM GSH	229	64.6 ± 3.2 <sup>b</sup>	56.9 ± 3.6 <sup>b</sup>	31.3 ± 3.3 <sup>b</sup>	39.9 ± 3.1
Source variation <i>p</i> -values					
GSH		0.04	0.03	0.02	0.26
Bull		<0.01	<0.01	<0.01	0.30
Interaction		0.01	0.05	<0.01	0.13

<sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

order to compensate for the observed decrease in GSH content produced during the sperm freezing. The main findings emerging from this study are that addition of GSH to the thawing medium resulted in: (i) a higher number of non-capacitated viable spermatozoa; (ii) a reduction in ROS generation; (iii) lower chromatin condensation; (iv) lower DNA fragmentation; (v) higher oocyte penetration rate in vitro and (vi) higher in vitro embryo production. Nevertheless, no significant effect was observed on motion parameters and the occurrence of the spontaneous acrosome reaction.

Addition of GSH has been shown to help maintain bull sperm motility (Lindemann *et al.*, 1988; Bilodeau *et al.*, 2001; Foote *et al.*, 2002) and to protect sperm against oxidative damage (Alvarez & Storey, 1989). In this study, no significant effect on per cent motility and motion parameters was found after the addition of GSH to the thawing medium, as previously observed under similar experimental conditions in bull (Kim *et al.*, 1999) and frozen-thawed boar spermatozoa (Gadea *et al.*, 2005b). However, the addition of GSH to the thawing extender significantly increased the motility parameters in ram and

caprine frozen-thawed spermatozoa (J.C. Gardón and J. Gadea, unpublished data). This apparent discrepancy could be related to the contact time of GSH with the sperm cells which was 30 min in the present study compared with 6 h (Bilodeau *et al.*, 2001) or 12 h (Foote *et al.*, 2002) of incubation in the other studies. However, these latter studies were conducted using a disrupted membrane model (reactivated) (Lindemann *et al.*, 1988). Another possible explanation could be the variability between the bulls used in the present study that could have masked the GSH effect.

The initiation of the sperm capacitation process is related to an alteration in the redox balance between ROS generation and the activity of the antioxidant defence mechanisms (Aitken *et al.*, 1989; Griveau & Le Lannou, 1997). GSH could be an important regulator of the scavenging system and one of the most important non-enzymatic antioxidants in sperm. In this study, a decrease in ROS generation was found when GSH was present in the thawing medium, indicating that it may be responsible, at least in part, for the lower disruption of lipid packing. Nevertheless, in this study no differences were

found when the spontaneous acrosome reaction was evaluated. It is possible that the changes in the redox balance only affected the first steps of the capacitation process, and did not lead to the spontaneous acrosome reaction process. Previously some authors related the redox balance and acrosome reaction induced by the calcium ionophore A23187 or lysophosphatidylcholine (de Lamirande *et al.*, 1998; O'Flaherty *et al.*, 2005).

Previous studies in human and porcine spermatozoa have shown that freezing and thawing induce important changes in the sperm chromatin resulting in greater compactness (Hamamah *et al.*, 1990; Cordova *et al.*, 2002; Gadea *et al.*, 2005b). Thus, chromatin condensation and stability may be critical factors to consider when using frozen semen (Madrid-Bury *et al.*, 2005). In this study, we observed a lower condensation of the nucleus of the spermatozoa treated by GSH. This fact would be related to a lower condensation in the thawing process, because of the antioxidant effect of GSH against the high level of ROS generated during the thawing process and a direct decondensation effect induced by GSH as previously demonstrated in the bull (Delgado *et al.*, 2001). Concerning this mechanism, interaction of sperm chromatin with ROS such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could lead to sulphhydryl group oxidation (Pirie, 1931) and to an increase in disulfide bond cross linking and higher chromatin compactness. GSH would block this putative effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leading to a lower degree of compactness.

The lower DNA damage observed following supplementation of the thawing medium with GSH suggests that ROS generation and redox balance are the most important factors responsible for the disruption of the condensation and stability of sperm chromatin after cryopreservation. Muratori *et al.* (2003) showed that inhibition of the activity of the enzymatic ROS scavenger, GPX, markedly increased DNA fragmentation. Recently, Arabi (2005) also reported a decrease in GSH content and an increase in lipid peroxidation and DNA damage (measured by COMET) in bull spermatozoa exposed to mercury-induced oxidative stress. The increase in DNA fragmentation associated with ROS generation *in vitro* by xanthine-xanthine oxidase (X-XO) in equine spermatozoa was prevented by the addition of GSH (10 mM) (Baumber *et al.*, 2003).

The relationship between chromatin stability and the fertility has already been reported in the bull. Ballachey *et al.* (1987) showed a significant relationship between deviation of  $\alpha t$  and fertility rankings in bulls, while Januskauskas *et al.* (2003) found a significant inverse relationship between COMPT $\alpha t$  and fertility. Both parameters, now named SD DFI and DFI, were significantly reduced in this study when GSH was added to the thawing medium.

With regard to the capacity for penetration and the *in vitro* production of embryos, Kim *et al.* (1999) demonstrated a dose-dependent effect of GSH and other thiol group-containing compounds on oocyte penetration and embryo production in IVF when added to the fertilization medium. Addition of 1 mM GSH during IVF enhanced the blastocyst rate but had no effect on the rate of penetration, polyspermy, male pronuclear formation or embryo cleavage rate. On the other hand, when 10 mM GSH was used, the cleavage and blastocysts rates decreased. Luvoni *et al.* (1996) demonstrated a positive effect on blastocyst development when 1 mM GSH was added during the *in vitro* embryo culture, while addition of GSH during IVM and IVF had no effect.

Nevertheless, the effect of supplementation of the thawing medium with GSH in IVF and embryo production has not been addressed before. In this study we showed that incubation of spermatozoa with GSH for 30 min resulted in an improvement in sperm function as measured by the *in vitro* penetration of oocytes and embryo number and quality. Two main hypotheses can be provided to explain this improvement. (i) GSH supplementation increases the number of viable, low lipid disorder (non-capacitated) spermatozoa that have the ability to penetrate the oocyte; (ii) GSH supplementation improves embryo and blastocyst cleavage rate. *In vitro* culture results in an increased level of ROS production (Luvoni *et al.*, 1996) that can cause a disruption of normal cell function by inactivation of proteins, peroxidation of cell membranes and DNA damage. It has been shown that high ROS levels exert a negative effect on bovine embryo development up to the blastocyst stage (Hashimoto *et al.*, 2000).

The results emerging from this study also show that GSH supplementation results in a decrease in chromatin condensation. This could be mediated by the reduction of disulfide bonds by GSH in the sperm nucleus. An increase in disulfide bonds in sperm chromatin results in hypercondensation and packing of the sperm DNA (Calvin & Bedford, 1971). In addition to being a reducing agent, GSH is also important for sperm chromatin decondensation following sperm penetration of the oocyte, the destabilization and the replacement of the protamines by the oocyte-derived histones and the sperm nucleus develop into the male pronucleus (Sutovsky & Schatten, 1997). The DNA damage induced by ROS generation could negatively affect the fertilization rate and early embryonic development. Recently, Fatehi *et al.* (2006) have shown that although DNA damage in bovine sperm does not block fertilization or early embryo development, it induces apoptosis after the first embryo cleavage.

Finally, we would like to point out that the type of bull from which the sperm was obtained affected most of the

parameters assessed in this study. This could be related to differences in the levels of ROS produced by the spermatozoa of particular bulls, as previously suggested by Kim *et al.* (1999) and as also shown in this study. Therefore, it can be concluded that the overall effect of GSH supplementation of the thawing extender depends mainly on the balance between free radical generating and scavenging systems.

In conclusion, GSH appears to play an important role in the sperm antioxidant defence strategy. Addition of GSH to the thawing extender could be of significant benefit in improving the function and fertilizing ability of frozen bull spermatozoa.

### Acknowledgements

We would like to thank Dr Juan G. Alvarez for the critical review and editing of the manuscript. We thank 'Asturiana de Valles' Breeders Association (ASEAVA, Gijón, Asturias, Spain) for supplying bull semen samples for this study. This study was supported by the project AGL-2003-03144 from the Spanish Ministry Science and Technology.

### References

- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. & Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction* 41, 183–197.
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z. & Irvine, D. S. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59, 1037–1046.
- Alvarez, J. G. & Storey, B. T. (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research* 23, 77–90.
- Arabi, M. (2005) Bull spermatozoa under mercury stress. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 454–459.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F. & Cormier, N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21, 1–7.
- Ball, B. A., Vo, A. T. & Baumber, J. (2001) Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 62, 508–515.
- Ballachey, B. E., Hohenboken, W. D. & Evenson, D. P. (1987) Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biology of Reproduction* 36, 915–925.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J. & Meyers, S. A. (2003) Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology* 24, 621–628.
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A. & Gagnon, C. (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 55, 282–288.
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C. & Sirard, M. A. (2001) Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275–286.
- Calvin, H. I. & Bedford, J. M. (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 13, 65–75.
- Chatterjee, S., de Lamirande, E. & Gagnon, C. (2001) Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 60, 498–506.
- Cordova, A., Pérez-Gutiérrez, J. F., Lleo, B., Garcia-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak, V. & Martín-Rillo, S. (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.
- Coy, P., Romar, R., Payton, R. R., McCann, L., Saxton, A. M. & Edwards, J. L. (2005) Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* 129, 19–26.
- Delgado, N. M., Flores-Alonso, J. C., Rodriguez-Hernandez, H. M., Merchant-Larios, H. & Reyes, R. (2001) Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Archives of Andrology* 47, 47–58.
- Evenson, D. P., Larson, K. L. & Jost, L. K. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25–43.
- Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A., Colenbrander, B. & Gadella, B. M. (2006) DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology* 27, 176–188.
- Foote, R. H. & Parks, J. E. (1993) Factors affecting preservation and fertility of bull sperm: a brief review. *Reproduction Fertility and Development* 5, 665–673.
- Foote, R. H., Brockett, C. C. & Kaproth, M. T. (2002) Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science* 71, 13–23.
- Gadea, J. (2005) Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63, 431–444.
- Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R. & Ruiz, S. (2004) Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690–701.
- Gadea, J., Garcia-Vazquez, F., Matas, C., Gardon, J. C., Canovas, S. & Gumbao, D. (2005a) Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with

- reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology* 26, 396–404.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C. & Romar, R. (2005b) Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology* 26, 749–756.
- Graham, J. K. & Moce, E. (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492–504.
- Griveau, J. F. & Le Lannou, D. (1997) Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology* 20, 61–69.
- Hamamah, S., Royere, D., Nicolle, J. C., Paquignon, M. & Lansac, J. (1990) Effects of freezing–thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition and Development* 30, 59–64.
- Harrison, R. A., Ashworth, P. J. & Miller, N. G. (1996) Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development* 45, 378–391.
- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M. & Imai, H. (2000) Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development* 56, 520–526.
- Januskauskas, A., Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. (2003) Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743–758.
- Kim, I. H., Van Langendonck, A., Van Soom, A., Vanroose, G., Casi, A. L., Hendriksen, P. J. & Bevers, M. M. (1999) Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52, 537–547.
- de Lamirande, E., Tsai, C., Harakat, A. & Gagnon, C. (1998) Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *Journal of Andrology* 19, 585–594.
- Li, X., Traganos, F., Melamed, M. R. & Darzynkiewicz, Z. (1995) Single-step procedure for labelling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides: detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry* 20, 172–180.
- Lindemann, C. B., O'Brien, J. A. & Giblin, F. J. (1988) An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *Biology of Reproduction* 38, 114–120.
- Luvoni, G. C., Keskinetepe, L. & Brackett, B. G. (1996) Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction and Development* 43, 437–443.
- Madrid-Bury, N., Perez-Gutierrez, J. F., Perez-Garnelo, S., Moreira, P., Pintado Sanjuanbenito, B., Gutierrez-Adan, A. & de la Fuente Martinez, J. (2005) Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232–241.
- Muratori, M., Maggi, M., Spinelli, S., Filimberti, E., Forti, G. & Baldi, E. (2003) Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *Journal of Andrology* 24, 253–262.
- O'Flaherty, C., Breininger, E., Beorlegui, N. & Beconi, M. T. (2005) Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726, 96–101.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. & First, N. L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38, 1171–1180.
- Pirie, N. W. (1931) The oxidation of sulphhydryl compounds by hydrogen peroxide: Catalysis of oxidation of cysteine and glutathione by iron and copper. *Biochemical Journal* 25, 1565–1579.
- Rodriguez-Martinez, H. (2003) Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals* 38, 312–318.
- Sutovsky, P. & Schatten, G. (1997) Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biology of Reproduction* 56, 1503–1512.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/repbio>

## Original Research Article

# Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa

Joaquín Gadea <sup>\*</sup>, David Gumbao, Belén Gómez-Giménez, Juan Carlos Gardón <sup>1</sup>

Physiology of Reproduction Group, Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia, Campus Mare Nostrum, Murcia 30100, Spain<sup>2</sup>

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 August 2012

Accepted 13 January 2013

## Keywords:

Glutathione

Oxidative stress

Spermatozoa

Cryopreservation

Antioxidant

## ABSTRACT

Sperm cryopreservation represents a useful tool in the management of reproduction in goat production. However, freezing and thawing produce physical and chemical stress on the sperm membrane that reduces their viability and fertilizing ability. In this study, firstly we evaluated the effects of reduced glutathione (GSH, 1 and 5 mM) supplementation of the thawing extender on parameters of frozen-thawed goat spermatozoa. We used a set of functional sperm tests that included sperm motility assayed by computer-assisted semen analysis (CASA), membrane lipid packing disorder, spontaneous acrosome reaction, free radical production (ROS generation) and sperm chromatin condensation. The main findings from this study were that addition of GSH to the thawing medium resulted in: (1) a higher motility and progressive motility; (2) a higher number of non-capacitated viable spermatozoa; (3) higher number of viable spermatozoa with intact acrosome; (4) a reduction in ROS generation and (5) lower chromatin condensation. In a second study, the additions of reduced (GSH, 5 mM) or oxidized glutathione (GSSG, 2.5 mM) to the thawing media were evaluated. We confirmed the protective effect of GSH on the sperm functionality. The addition of GSSG to the thawing media was less protective to sperm functions compared to GSH. Addition of GSH to the thawing extender could be of significant benefit in improving the function and fertilizing capacity of frozen goat spermatozoa. The information derived from this study suggests the importance of oxidative stress as responsible for cryo-injury to spermatozoa and opens new windows to explore the practical application of antioxidants to improve the quality of post-thaw goat semen.

© 2013 Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Department of Physiology, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain.

Tel.: +34 868884655.

E-mail address: [jgadea@um.es](mailto:jgadea@um.es) (J. Gadea).

<sup>1</sup> Address: Fac. Veterinaria y Cs, Experimentales, Univ. Católica de Valencia San Vicente Martir, Valencia, Spain.

<sup>2</sup> <http://www.um.es/grupo-fisiovet>.

1642-431X/\$ – see front matter © 2013 Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.01.174>

## 1. Introduction

Artificial insemination has allowed increased genetic improvement, better control of reproduction and sexually transmitted diseases, dissemination of valuable genetics and preservation of the genetics of endangered breeds [1]. Cryopreservation of semen represents a useful tool in the management of reproduction in goat production [2–4]. However, during cryopreservation spermatozoa are exposed to physical and chemical stress that results in adverse changes in membrane lipid composition, sperm motility, viability and acrosome status. All these changes reduce the fertilizing ability of goat spermatozoa after cryopreservation [2].

Cold shock during sperm cryopreservation is associated with oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) generation [5]. ROS-induced damage to spermatozoa is mediated by oxidative attack of bis-allylic methylene groups of sperm phospholipid-bound polyunsaturated fatty acids (PUFAs), leading to lipid peroxidation [6]. To counteract the harmful effects of ROS, spermatozoa and seminal plasma possess a number of antioxidant systems that scavenge ROS and prevent internal cellular damage. Enzymatic antioxidant defence mechanisms in seminal plasma and spermatozoa include the glutathione peroxidase/reductase system, superoxide dismutase, and catalase [7–9]. Non-enzymatic antioxidants include reduced glutathione (GSH), urate, ascorbic acid, vitamin E, carotenoids, ubiquinones, taurine and hypotaurine [9–11]. It is known that the process of freezing is associated with a significant alteration of the antioxidant system [12–14].

Oxidative stress may be defined as any imbalance between pro-oxidants and anti-oxidants in which the former prevail and produce a free radical cascade leading to a lipoperoxidative process. The effects of lipid peroxidation include irreversible loss of motility, leakage of intracellular enzymes, damage to sperm DNA [15], and deficiencies in oocyte penetration and spermatozoa-oocyte fusion [16].

Glutathione ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is a tripeptide ubiquitously distributed in living cells. It plays an important role in the intracellular defence mechanism against oxidative stress. Glutathione peroxidase uses GSH to reduce hydrogen peroxide to  $H_2O$  and lipoperoxides to alkyl alcohols. The resulting oxidized glutathione (GSSG) is reduced to GSH by glutathione reductase using NADPH as the co-factor. GSH content has been reported in different mammalian spermatozoa [9,10,12], goat included [10]. A reduction in GSH content in spermatozoa induced by the freezing procedures has been previously described in human [13] and in domestic animals such as bull [17,18] or boar [12].

Once it is known that freezing induces a decrease in the antioxidant system and that increased ROS levels are present after cryopreservation [5,14,19], it is reasonable to explore the use of antioxidant strategies in an attempt to overcome cryodamage related to this oxidative stress. A limited number of studies have explored the use of antioxidant in goat frozen semen [20–22]. Our group has previously reported the effect of addition of GSH to the freezing and thawing extender on boar sperm cryosurvival [12,23,24], as well as on bovine and human spermatozoa [13,25]. On the other hand, glutathione could be supplemented in reduced (GSH) or oxidized form (GSSG). Some

previous experiments with bull, ram and rabbit spermatozoa have shown discrepancies in the results [26–30].

The main aim of this study was to investigate the effects of addition of GSH to thawing extenders on motility parameters, membrane lipid disorder, acrosome reaction and ROS generation in frozen-thawed goat spermatozoa. In a second experiment, the protective effects of GSH on post-thaw sperm goat function were compared to GSSG.

## 2. Materials and methods

All reagents were obtained from Sigma–Aldrich Química, S.A. (Madrid, Spain) unless otherwise indicated.

### 2.1. Semen handling

Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks autochthonous Spanish breed 'Murciano-Granadina' generously provided by Ovigen (ES08RS04OC, Zamora, Spain) were used. Frozen 0.25 mL French straws were thawed in a water bath at 37 °C for 30 s and the content was diluted in Tyrode's sperm medium (sperm-TALP [31]: 1/without addition of glutathione (control); 2/with addition of 1 mM or 5 mM GSH to the sperm-TALP medium (in experiment 1); or 3/with addition of 5 mM GSH or 2.5 mM GSSG (in experiment 2) and maintained 30 min at 37 °C in this medium before assayed.

### 2.2. Analysis of the post-thaw sperm motion parameters

Analysis of post-thaw sperm motion parameters were determined using a Computer assisted sperm analysis (CASA) system (ISAS<sup>®</sup>, Proiser, Valencia, Spain). The CASA-derived motility characteristics studied were total motility (%), progressive motility (%), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearity of the curvilinear trajectory (LIN, ratio of VSL/VCL, %), straightness (STR, ratio of VSL/VAP, %), wobble of the curvilinear trajectory (WOB, ratio of VAP/VCL, %), amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ) and beat cross-frequency (BCF, Hz). A 7  $\mu\text{L}$  drop of the sample was placed on a warmed (37 °C) slide (Superfrost Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and covered with 24 mm  $\times$  24 mm cover slips that produce a depth of 10  $\mu\text{m}$ .

The setting parameters were: 100 frames in which spermatozoa had to be present in at least 15 in order to be counted, 50 images per second. Images were obtained at 200 $\times$  magnification using a negative contrast phase objective (Nikon, Tokyo, Japan). Spermatozoa with a VAP < 10  $\mu\text{m/s}$  were considered immotile. A minimum of five fields per sample was evaluated, counting a minimum of 200 spermatozoa per sub-sample. For statistical analysis the mean measurements of CASA for each field were entered into the analysis of variance model (ANOVA).

### 2.3. Analysis of post-thaw semen quality by flow cytometry

Analysis of post-thaw semen quality by flow cytometric analyses were performed on a Coulter Epics XL cytometer

(Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, USA). A 15 mW argon ion laser operating at 488 nm excited the fluorophores. Data from 10,000 events per sample were collected in list mode, and 4 measures per sample were recorded. Flow cytometric data were analyzed using the program Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.) using a gate in forward and side scatter to exclude eventual remaining debris and aggregates from the analysis.

### 2.3.1. Assessment of sperm plasma membrane lipid packing disorder

To detect an increase in sperm plasma membrane lipid packing disorder, sperm samples were stained with merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 [32]. Stock solutions of M540 (1 mM) and Yo-Pro 1 (25  $\mu$ M, Invitrogen, Eugene, OR) in DMSO, were prepared. For each 1 mL diluted semen sample (containing 5–10  $\times 10^6$  cells), 2.7  $\mu$ L M540 stock solution (final concentration of 2.7  $\mu$ M) and 1  $\mu$ L of Yo-Pro (25 nM final concentration) were added. After 10 min at 37  $^{\circ}$ C in the darkness, M540 fluorescence was collected with a FL2 sensor using a 575 nm band-pass filter and Yo-Pro 1 with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter. Cells were classified in three categories: low merocyanine fluorescence (viable, low disorder), high merocyanine fluorescence (viable, high disorder) or Yo-Pro-1 positive (dead).

### 2.3.2. Viability and acrosome status

Acrosome status and viability were simultaneously assayed by lectins and propidium iodide. Sperm samples (1 mL of sperm sample with 5–10  $\times 10^6$  cells) were incubated with 2  $\mu$ L of fluorescein isothiocyanate-labeled pisum sativum agglutinin (FITC-PSA, 100 mg/mL) [33] and 5  $\mu$ L of propidium iodide (PI) stock solution (500 mg/mL), at room temperature for 10 min. Fluorescence was measured using a FL1 sensor, a 525 nm band-pass filter to detect FITC-PNA, and a FL3 sensor using a 650 nm band-pass filter to detect PI. Three sperm subsets were detected: live with intact acrosome, live with damaged acrosome and dead spermatozoa (with and without acrosome intact) [25].

### 2.3.3. Production of reactive oxygen species

Production of reactive oxygen species (ROS) was measured by incubating the spermatozoa (1 mL of semen with 5–10  $\times 10^6$  cells) in thawing medium (sperm-TALP) in the presence of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $H_2DCFDA$ ) (0.5  $\mu$ M) at 37  $^{\circ}$ C [25]. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production.  $H_2DCFDA$  is a stable cell-permeable non-fluorescent probe. It is de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. Green fluorescence was collected with a FL1 sensor using a 525 nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean green intensity fluorescence units (mean channel in the FL1) and it was used as index of ROS generation.

### 2.3.4. Determination of sperm chromatin condensation status

Propidium iodide staining was used for the determination of sperm chromatin condensation status [24,25,34]. Thawed samples after 30 min of incubation in the experimental media were centrifuged (1200  $\times g \times 3$  min) and the pellet was

resuspended in a solution of ethanol and phosphate buffered saline (PBS) (70/30, v/v) for 30 min to induce permeabilization of sperm membrane. After that the samples were centrifuged (1200  $\times g \times 3$  min), the supernatant discarded and the pellet was resuspended in a Propidium Iodide solution (PI, 10 mg/mL) in PBS. Samples with 5–10  $\times 10^6$  cells/mL were maintained in darkness for 1 h before flow cytometric analysis. Red PI fluorescence was collected with a FL3 sensor using a 650 nm band-pass filter. Measurements were expressed as the mean red intensity fluorescence units (mean channel in the FL3) and it was used as index of the state of the chromatin condensation, as this is directly related to the PI uptake by DNA.

## 2.4. Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The data were firstly examined using the Shapiro–Wilk test to assess normality distribution. In view of the non-Gaussian distribution of most of the data gathered, percentage data were arcsin transformed. An analysis of variance model (ANOVA) was used, considering the specific sperm treatment (GSH addition) and the male as the main variables. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared by the least significant difference pairwise multiple comparison post hoc test (Tukey). Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . The analysis was conducted using SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Variation in sperm parameters in samples from different donors and in samples from the same donor collected over time, has long been known to be considerable [4]. Because of that, the model used in the first study was a two-way ANOVA, considering the specific sperm treatment and the donor as the main variables (two fully factorial). We select this two-factorial model to see the effect of the treatment and to check whether most of the donors in different treatment groups have the same pattern by the evaluation of the interaction between treatment and donor. In the second experiment the model was a two-way ANOVA, considering the specific sperm treatment and the time as the main variables (two fully factorial), and individual bucks were considered as covariable.

## 2.5. Experimental design

### 2.5.1. Addition of GSH to the thawing medium on sperm function (Exp. 1)

To examine the effect of GSH supplementation during the thawing process, spermatozoa from 7 different goat bucks (3 samples per buck) were incubated without addition of GSH (control), and with addition of 1 mM or 5 mM GSH to the sperm-TALP thawing medium and maintained for 30 min 37  $^{\circ}$ C in these media before assayed (time 0). Samples were maintained under the same conditions (37  $^{\circ}$ C) for subsequent 60 min. The following sperm parameters were evaluated at 0, 30 and 60 min of this incubation time: (i) motion parameters by CASA; (ii) lipid membrane disorder status by merocyanine 540 and plasma membrane integrity by Yo-Pro 1; (iii) acrosome status by FITC-PSA and plasma membrane integrity by PI; (iv) ROS formation by  $H_2DCFDA$  staining, and; (vi) chromatin condensation status by PI staining.

### 2.5.2. Addition of GSH and GSSG to the thawing medium (Exp. 2)

To examine the effect of GSH and GSSG supplementation during the thawing process, spermatozoa from 7 different goat bucks (3 samples per buck) were incubated without addition of GSH or GSSG (control), and with addition of 5 mM GSH or 2.5 mM GSSG to the sperm-TALP thawing medium and maintained for 30 min 37 °C in these media before assayed (time 0). Samples were maintained in same conditions (37 °C) for 60 min more. Sperm parameters were evaluated at 0, 30 and 60 min of this incubation time. The molar concentration of GSH (5 mM) was double that of GSSG (2.5 mM) because the molecular weight (MW = 307.32) of GSH is approximately half of the GSSG molecular weight (MW = 612.63). GSH can be regenerated from GSSG by the enzyme glutathione reductase. For every GSSG, two reduced GSH molecules are gained. Sperm samples were evaluated for: (i) motion parameters by CASA; (ii) acrosome status by FITC-PSA and plasma membrane integrity by propidium iodide, and; (iii) ROS formation by H<sub>2</sub>DCFDA staining.

## 3. Results

### 3.1. Effect of the addition of GSH to the thawing medium on post-thaw sperm function

Addition of GSH to the sperm-TALP medium for 30 min had a significant effect on the analyzed sperm motility parameters (Table 1,  $P < 0.01$ ). Total and progressive motility of spermatozoa were significantly higher in both 1 and 5 mM GSH groups than in the control (Table 1,  $P < 0.01$ ) with no differences between GSH groups. However, for the other motility parameters the differences were not significant except for ALH that was higher in the GSH groups than control (Table 1,  $P < 0.01$ ). For all the parameters evaluated, a significant buck effect was observed (Table 1,  $P < 0.01$ ). However, the interactions between GSH treatment and buck were only significant for some of the motion parameters.

The addition of 1 or 5 mM GSH to the thawing medium increased the percentage of viable spermatozoa with low lipid disorder and reduced the percentage of total dead sperm compared to control (Table 2,  $P < 0.01$ ), with no differences between 1 and 5 mM GSH. No differences were found for viable high lipid disorder that in all the groups were close to 7% (Table 2,  $P = 0.93$ ). For all the parameters evaluated, a significant buck effect was observed (Table 2,  $P < 0.01$ ) but all of them showed a similar pattern under the same treatment (interaction between GSH treatment and buck, Table 2,  $P > 0.05$ ). The acrosome status and viability was also improved by the GSH incubation, the addition of 5 mM of GSH increased the percentage of viable spermatozoa with intact acrosome and reduced the percentage of dead spermatozoa in comparison to control group (Table 3,  $P < 0.01$ ). The incubation with 1 mM GSH did not significantly improve these parameters.

The generation of ROS was significantly reduced following the addition of GSH to the thawing medium compared to control group during the 60 min of incubation period (Table 4,  $P < 0.01$ ). No differences were found between 1 and 5 mM GSH. After 60 min, mean values of ROS generation for the GSH groups were close to 50% of the values obtained in the control group (Table 4,  $P < 0.01$ ).

Chromatin condensation and stability were equally affected by the addition of GSH (Table 5,  $P < 0.01$ ). When GSH was added, a lower chromatin condensation was observed in a dose-dependent manner, as reflected by the higher red fluorescence intensity and higher PI uptake (Table 5,  $P < 0.01$ ).

### 3.2. Effect of the addition of GSH and GSSG to the thawing medium on post-thaw sperm function

The addition of glutathione in a reduced form increased the values of motility and progressive motility (Tables 6 and 7,  $P < 0.05$ ) and the percentage of viable spermatozoa with intact acrosome compared to controls (Table 8,  $P < 0.05$ ). However, the supplementation with glutathione in an oxidized form had no effect on motility, viability and acrosome status. The percentage of viable spermatozoa with damaged acrosomes

**Table 1 – Motility parameters of frozen-thawed goat spermatozoa measured by the computer assisted semen analysis (CASA) system.**

Group	Total motility	Progressive motility	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Control	53.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	41.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	90.1 ± 1.6	52.8 ± 1.5	67.7 ± 1.6	56.8 ± 0.9	76.1 ± 0.6	74.2 ± 0.7	2.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.1
1 mM GSH	60.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	49.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	92.4 ± 1.7	53.5 ± 1.5	68.6 ± 1.7	56.3 ± 0.8	74.9 ± 0.5	73.2 ± 0.6	3.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.1
5 mM GSH	59.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	50.6 ± 1.5 <sup>b</sup>	91.4 ± 1.2	54.7 ± 1.4	68.0 ± 1.3	57.4 ± 0.9	76.2 ± 0.7	73.2 ± 0.6	3.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.1
Source of variation	Total motility	Progressive motility	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Sperm treatment	<0.01	<0.01	0.54	0.62	0.94	0.72	0.20	0.38	<0.01	0.42
Buck	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	<0.01	0.15	0.15	0.07	0.15	<0.01	0.01	0.03	<0.01	0.02

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) (Control). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. VCL: curvilinear velocity, VSL: straight-line velocity, VAP: average path velocity, LIN: linearity of the curvilinear trajectory, STR: straightness, ALH: amplitude of lateral head displacement, WOB: Wobble (VAP/VCL), BCF: beat cross-frequency. <sup>a,b</sup>Numbers within columns with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).



**Table 2 – Membrane lipid packing disorder of frozen-thawed goat spermatozoa measured by flow cytometry.**

Group	Viable spermatozoa with low membrane lipid disorder (%)	Viable spermatozoa with high membrane lipid disorder (%)	Non-viable spermatozoa (%)
Control	47.53 ± 2.28 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.60	45.81 ± 2.08 <sup>a</sup>
1 mM GSH	52.98 ± 2.06 <sup>b</sup>	6.91 ± 0.52	40.10 ± 1.82 <sup>b</sup>
5 mM GSH	51.78 ± 2.37 <sup>b</sup>	6.95 ± 0.65	41.27 ± 2.10 <sup>b</sup>
Source of variation	Viable spermatozoa with low membrane lipid disorder (%)	Viable spermatozoa with high membrane lipid disorder (%)	Non-viable spermatozoa (%)
Sperm treatment	0.04	0.93	0.02
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.17	0.11	0.23

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) (Control). Sperm samples were stained with Merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 and immediately evaluated by flow cytometry. Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 3 – Acrosome status and viability of frozen-thawed goat spermatozoa measured by flow cytometry.**

Group	Viable spermatozoa with intact acrosome (%)	Viable spermatozoa with altered acrosome (%)	Non-viable spermatozoa (%)
Control	42.29 ± 1.54 <sup>a</sup>	6.21 ± 0.51	51.51 ± 1.66 <sup>a</sup>
1 mM GSH	44.15 ± 1.37 <sup>ab</sup>	6.09 ± 0.56	49.75 ± 1.44 <sup>ab</sup>
5 mM GSH	47.87 ± 1.46 <sup>b</sup>	5.63 ± 0.51	46.50 ± 1.54 <sup>b</sup>
Source of variation	Viable spermatozoa with intact acrosome (%)	Viable spermatozoa with altered acrosome (%)	Non-viable spermatozoa (%)
Sperm treatment	<0.01	0.73	<0.01
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.42	0.95	0.68

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) (Control). Sperm samples were stained with fluorescein isothiocyanate-labeled pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) and propidium iodide (PI) and immediately evaluated by flow cytometry. Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 4 – Reactive oxygen species (ROS) generation (fluorescence arbitrary units) of frozen-thawed goat spermatozoa measured by flow cytometry after 0, 30 and 60 min of incubation at 37 °C.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	6.37 ± 0.63 <sup>a</sup>	10.27 ± 1.10 <sup>a</sup>	21.40 ± 2.33 <sup>a</sup>
1 mM GSH	4.00 ± 0.27 <sup>b</sup>	6.37 ± 0.56 <sup>b</sup>	12.57 ± 1.23 <sup>b</sup>
5 mM GSH	3.33 ± 0.23 <sup>b</sup>	6.92 ± 0.52 <sup>b</sup>	11.76 ± 0.97 <sup>b</sup>
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	<0.01	0.01	<0.01
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.27	0.11	0.38

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) (Control). Sperm samples were stained with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 5 – Chromatin condensation status (fluorescence arbitrary units) of frozen-thawed goat spermatozoa measured by flow cytometry after 0, 30 and 60 min of incubation at 37 °C.**

Group	0 min
Control	21.47 ± 5.63 <sup>a</sup>
1 mM GSH	8.38 ± 1.00 <sup>b</sup>
5 mM GSH	3.36 ± 0.48 <sup>c</sup>
Source of variation	0 min
Sperm treatment	<0.01
Buck	<0.01
Interaction	0.12

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented (1 and 5 mM) or not with reduced glutathione (GSH) (Control). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b,c</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 6 – Total motility (%) of frozen-thawed goat spermatozoa measured by the computer assisted semen analysis (CASA) system.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	50.23 ± 0.84 <sup>a</sup>	52.43 ± 0.84 <sup>a</sup>	44.56 ± 0.91 <sup>a</sup>
GSH	55.35 ± 0.84 <sup>b</sup>	54.44 ± 0.87 <sup>b</sup>	49.32 ± 0.88 <sup>b</sup>
GSSG	49.03 ± 0.88 <sup>a</sup>	46.74 ± 0.90 <sup>a</sup>	44.33 ± 0.88 <sup>a</sup>
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	<0.01	<0.01	<0.01
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	<0.01	<0.01	<0.01

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented with 5 mM reduced glutathione (GSH) or 2.5 mM oxidized glutathione (GSSG) or not supplemented (Control). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 7 – Progressive motility (%) of frozen-thawed goat spermatozoa measured by the computer assisted semen analysis (CASA) system.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	45.64 ± 0.84 <sup>a</sup>	42.51 ± 0.84 <sup>a</sup>	39.27 ± 0.90 <sup>a</sup>
GSH	49.42 ± 0.84 <sup>b</sup>	48.73 ± 0.87 <sup>b</sup>	43.90 ± 0.87 <sup>b</sup>
GSSG	43.88 ± 0.87 <sup>a</sup>	40.82 ± 0.88 <sup>a</sup>	40.27 ± 0.86 <sup>b</sup>
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	<0.01	<0.01	0.01
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	<0.01	<0.01	0.01

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented with 5 mM reduced glutathione (GSH) or 2.5 mM oxidized glutathione (GSSG) or not supplemented (Control). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

that could be interpreted as spontaneous acrosome reacted spermatozoa was always lower than 5% and no effect was detected for the addition of antioxidants (Table 9,  $P > 0.30$ ). When the ROS generation was evaluated for a period of 60 min, we detected a reduction in ROS generation in GSH group compared to controls (Table 10,  $P < 0.05$ ). The treatment with GSSG did not affect ROS generation.

#### 4. Discussion

Freezing is associated with damage to sperm function, affecting those processes required for successful in vivo fertilization of the oocyte. During freezing, two important

**Table 8 – Viable frozen-thawed goat spermatozoa with intact acrosome measured by flow cytometry.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	41.00 ± 1.26 <sup>a</sup>	34.78 ± 1.20 <sup>a</sup>	29.34 ± 1.21 <sup>a</sup>
GSH	45.54 ± 1.35 <sup>b</sup>	39.97 ± 1.22 <sup>b</sup>	33.41 ± 1.13 <sup>b</sup>
GSSG	42.15 ± 1.21 <sup>ab</sup>	35.49 ± 1.23 <sup>a</sup>	30.72 ± 1.13 <sup>ab</sup>
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	0.03	0.02	0.03
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.94	0.99	0.92

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented with 5 mM reduced glutathione (GSH) or 2.5 mM oxidized glutathione (GSSG) or not supplemented (Control). Sperm samples were stained with fluorescein isothiocyanate-labeled pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) and propidium iodide (PI) and immediately evaluated by flow cytometry. Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 9 – Viable frozen-thawed goat spermatozoa with altered acrosome measured by flow cytometry.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	1.99 ± 0.10	2.25 ± 0.11	2.17 ± 0.12
GSH	1.78 ± 0.09	2.21 ± 0.12	2.03 ± 0.12
GSSG	2.01 ± 0.09	2.22 ± 0.11	2.11 ± 0.11
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	0.38	0.80	0.99
Buck	0.07	0.04	<0.01
Interaction	0.16	0.95	0.92

ANOVA. P-Values.

Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented with 5 mM reduced glutathione (GSH) or 2.5 mM oxidized glutathione (GSSG) or not supplemented (Control). Sperm samples were stained with fluorescein isothiocyanate-labeled pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) and propidium iodide (PI) and immediately evaluated by flow cytometry. Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

processes have been reported: the production of ROS that can induce changes in sperm membrane function and structure and a decrease in the antioxidant defenses [5,17]. Because the posttranslational modification of protein thiols is one of the major mechanisms of redox regulation, and freezing could affect this process, this detrimental effect of freezing could be prevented, at least in part, by addition of exogenous GSH because the cell employs GSH and thioredoxin systems to reverse oxidative stress. Second is an alteration in antioxidant defense systems, including a decrease in intracellular GSH content [12,13,17]. So, one obvious way to improve the viability and subsequent fertilizing capacity of frozen-thawed goat spermatozoa would be by the addition of antioxidants to the freezing and thawing media.

**Table 10 – Reactive oxygen species (ROS) generation (fluorescence arbitrary units) of frozen-thawed goat spermatozoa measured by flow cytometry after 0, 30 and 60 min of incubation at 37 °C.**

Group	0 min	30 min	60 min
Control	4.66 ± 0.43 <sup>a</sup>	8.45 ± 0.70 <sup>a</sup>	15.46 ± 1.43 <sup>a</sup>
GSH	3.22 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.60 ± 0.37 <sup>b</sup>	9.03 ± 0.63 <sup>b</sup>
GSSG	4.46 ± 0.40 <sup>a</sup>	7.89 ± 0.64 <sup>ab</sup>	13.44 ± 1.25 <sup>a</sup>
Source of variation	0 min	30 min	60 min
Sperm treatment	<0.01	0.02	<0.01
Buck	<0.01	<0.01	<0.01
Interaction	0.29	0.98	0.74

ANOVA. P-Values.  
Frozen goat spermatozoa were thawed in sperm-TALP medium supplemented with 5 mM reduced glutathione (GSH) or 2.5 mM oxidized glutathione (GSSG) or not supplemented (Control). Sperm samples were stained with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA). Commercial frozen goat semen from seven fertile goat bucks was analyzed. Values are expressed as the means ± SEM. <sup>a,b</sup>Different superscripts in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Previously some studies have evaluated the use of some compounds with antioxidant activity in the goat freezing media, including catalase, ascorbic acid, trolox, methionine, glutamine, taurine, hypotaurine, carnitine [20,21,35–40]. In the same way GSH has been added to the freezing media with different results. So, Sinha et al. [22] showed that addition of glutathione (5 mM) to Tris freezing medium increased the motility of thawed spermatozoa and decreased the percentage of acrosomal abnormality, however 2 mM GSH was insufficient to bring about this increase. Addition of 5 mM glutathione decreased the release of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) from the sperm cell in the medium. Fertility rate with Tris with 5 mM GSH extended semen was higher (59.18%), but was not significantly higher than control (49.23%,  $P = 0.21$ ) [22]. Later, other authors reported that the simultaneous addition of catalase (200 UI/mL) and GSH (2 mM) in Tris based freezing media improved the sperm motility before and after freezing procedure [35]. On the other hand, Soares et al. reported that the addition of 2, 5 and 7 mM GSH to a skimmed-milk freezing medium had no effect on sperm parameters [38].

It is, in our knowledge, the first study developed in goat spermatozoa with the addition of the antioxidant in the thawing media. The supplementation with antioxidants of the freezer extenders is easier and more practical; than adding the supplements to the thawing media, because artificial insemination in small ruminants is done directly from the straw without a dilution process. Nevertheless, the efficiency in the supplementation of antioxidants is increased when it is done after the thawing process as previously our research group showed in boar [12,23,24] and human frozen-thawed spermatozoa [41]. Sinha et al. [22] suggested that the sudden increase in oxygen utilization by spermatozoa during thawing, following the dormant metabolic stage, might be responsible for increased production of free radicals, inducing spermatozoa membrane damage.

In this study we showed that addition of GSH to the thawing medium had a positive influence on the sperm parameters, increasing the motility, viability and the proportion of viable spermatozoa with low lipid membrane disorder and intact acrosome. On the other hand GSH supplementation induces a reduction in the ROS generation and the nuclear hypercondensation. The use of techniques such as flow cytometry and CASA allowed us to evaluate sperm functionality in a specific, objective, accurate and reproducible method compared with traditional microscopy-based methods and to detect slight significant differences [42,43]. On the other hand, using two-way ANOVA analysis, we were able to evaluate the effect of the treatment and distinguish it from the potential effect of an individual animal.

The main effect of the addition of GSH to the media is the control of the ROS generation that in this study is equally effective with 1 and 5 mM GSH. This reduction in the ROS generation leads to increased motility parameters [9]. GSH supplementation, compared to control media, appears to preserve sperm viability by protecting membrane structure and function.

The initiation of the sperm capacitation process is related to an alteration in the redox balance between ROS generation and the activity of the antioxidant defense mechanisms [44]. GSH could be an important regulator of the scavenging system and one of the most important nonenzymatic antioxidants in sperm. In this study, a decreased ROS generation was found when GSH was present in the media after thawing, indicating that it may be responsible, at least in part, for the lower disruption of lipid packing and the lower changes in membrane proteins. In relation to membrane functionally, Watson [45] suggested that cryopreservation-induced modifications in sperm membranes make them more prone to capacitation, so that cryopreserved sperm have been thought to be in a partially capacitated state. In the present study, the addition of GSH affected the percentage of viable sperm with low plasma membrane lipid packing disorder and also the percentage of viable spermatozoa presenting intact acrosome. Nevertheless, in this study no differences were found when the spontaneous acrosome reaction was evaluated. It is possible that the changes in the redox balance only affected the first steps of the capacitation process, and did not lead to the spontaneous acrosome reaction process.

Previous studies in human and domestic animal spermatozoa have shown that freezing and thawing induce important changes in the sperm chromatin, resulting in greater compactness [46,47]. Thus, chromatin condensation and stability may be critical factors to consider when using frozen semen [48,49]. In this study, we observed a lower condensation of the nucleus of the spermatozoa treated by GSH. This fact would be related to a lower condensation in the thawing process due to the antioxidant effect of GSH against the high level of ROS generated during and after the thawing process. Concerning this mechanism, interaction of sperm chromatin with ROS such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could lead to sulphhydryl group oxidation [50] and to an increase in disulfide bond cross-linking and higher chromatin compactness. GSH would block the putative effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leading to a lower degree of compactness and DNA damage. Nevertheless, further studies will be necessary to confirm these preliminary findings and determine the best

concentration of GSH for protecting DNA in a higher number of animals.

In the second experiment we explored the use of glutathione in reduced or oxidized form. The results showed that GSSG is not as effective as GSH. The GSSG must be reduced to GSH by glutathione reductase to be efficient in the ROS scavenger system. The amount of GSSG used, or the time of interaction may not have been enough for the reduction by glutathione reductase of the frozen-thawed spermatozoa, which is reduced in enzymatic activity and changed in localization as previously reported [51]. These results were similar to a study performed on cryopreserved bull semen [26]; the addition of 0.5 mM or 1 mM of GSH to the thawing extender improved motility, progressive motility and velocities. However, the addition of GSSG did not improve these motion parameters compared to control.

Some previous experiments with supplementation of the freezing media with GSSG for bull, ram and rabbit spermatozoa have shown discrepancies in the results [27–30]. These contradictory reports may result from species diversity, the use of extenders with different compositions (e.g. Tris based and dried milk extenders) and the concentration of glutathione used in the studies. However in other cases contradictory results have been found by the same research group. So, Uysal and Bucak [30] described that the addition of 5 mM GSSG to the freezing media from ram spermatozoa improved the motility and viability [30], but later reported that oxidized (GSSG, 5 mM) or reduced glutathione (GSH, 5 mM) addition to the freezing media for ram spermatozoa, elevated the levels of certain antioxidant activities such as GSH and glutathione peroxidase, but it did not improve the post-thawed sperm motility and viability, when compared to the control [29]. In bull spermatozoa, GSSG added to the freezer media partially prevented the loss of sperm motility after a freezing/thawing cycle while GSH did not [52]. Finally in cryopreserved rabbit spermatozoa, the addition of GSH or GSSG improved membrane integrity and mitochondrial activity compared to control, but in a fertility trial no differences were found for the embryo recovery rate [27].

Taking into consideration that GSH is not permeable to the sperm membrane; the mechanism of action of this antioxidant remains unclear. On one hand, the mechanism could be related to the use of GSH present in the extracellular fluid or the medium by the enzyme glutathione S-transferase (GST) [53]. Several authors have reported the importance of the role of GST in maintaining normal motility, acrosome reaction, and fertilizing ability of the goat sperm [54,55]. Moreover Hemachand et al. described the capability of sperm GSTs to use extracellular GSH to provide protection to sperm in terms of maintaining motility, viability, mitochondrial status, oocyte binding capacity and fertilizing capabilities during exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or to products of lipid peroxidation [56].

On the other hand, enzymes related to the glutathione cycle (glutathione peroxidase and glutathione reductase) are present in the membrane of the spermatozoa [51]. These enzymes are altered by the freezing procedure with a significant change in the distribution of these enzymes in the sperm membrane and also an alteration of the enzyme activity [17,51]. Other authors have described g-Glutamyl transpeptidase (GGT), enzyme that catalyzes the transfer of the g-glutamyl moiety of glutathione and certain other

g-glutamyl peptides to amino acids or to peptides, and shows high activity in human semen [57]. Glutamyl transpeptidase is present in the midpiece and acrosomal regions of spermatozoa [58], and it has also been detected in seminal fluid [57,59]. The possible combined action of all these enzymatic systems related to GSH suggests that the addition of GSH or GSSG to the media finally raises the level of intracellular GSH to those of fresh semen, as previously reported [29].

In conclusion, the addition of GSH to the thawing media reduced ROS generation and showed a protective effect on sperm function because it (1) improved motility and motion parameters of frozen-thawed spermatozoa; (2) increased the proportion of viable spermatozoa with intact acrosome; (3) increased the proportion of viable spermatozoa with low lipid membrane disorder; and (4) decreased the percentage of spermatozoa with hyper-condensated nucleus. The addition of oxidized glutathione (GSSG) to the thawing media was less protective to sperm functions compared to reduced glutathione (GSH). The information derived from this study suggests the importance of oxidative stress as responsible for cryo-injury to spermatozoa and opens new windows to explore the practical application of antioxidants to improve the quality of post-thaw goat semen.

### Authors' roles

DG, BG-G and JG performed flow cytometry assessments; JCG and BG-G performed CASA assessments. DG, BG-G, JCG and JG were involved in study design and data analysis. J.G. conceived the project and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### Acknowledgments

This work was partially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and FEDER, Grant AGL2009-12512-C02-01. The authors would like to acknowledge Prof. William V. Holt (The University of Sheffield, UK) for his critical reading of this manuscript. The authors would like to thank "Ovigen" (Zamora, Spain) for supplying of semen samples for this study. We also thank Mr Juan A. Carvajal for technical assistance.

### REFERENCES

- [1] Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* 2012;130(3–4):187–92.
- [2] Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009;10(1):49–62.
- [3] Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 2006;63(3):215–25.
- [4] Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 2000;62(1–3):113–41.
- [5] Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997;49(6):921–5.



- [6] Aitken RJ. The role of free oxygen radicals and sperm function. *International Journal of Andrology* 1989; 12(2):95-7.
- [7] Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research* 1989;24(2):185-96.
- [8] Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* 1987;8(5):338-48.
- [9] Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research* 1989;23(1):77-90.
- [10] Li TK. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction* 1975;12(5):641-6.
- [11] Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction* 1996;2(10):739-44.
- [12] Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 2004;62(3-4):690-701.
- [13] Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011;62(1):40-6.
- [14] Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology* 1994;15(3):255-65.
- [15] White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development* 1993;5(6):639-58.
- [16] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction Fertility and Development* 1995;7(4):659-68.
- [17] Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 2000;55(3):282-8.
- [18] Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* 2007;67(7):1249-55.
- [19] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology* 1992;13(3):232-41.
- [20] Atessahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kizil M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 2008; 77(1):38-44.
- [21] Bucak MN, Sarlözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Atessahin A, Kulaksız R, et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research* 2010;89(1):24-30.
- [22] Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science* 1996;41(3):237-43.
- [23] Gadea J, Garcia-Vazquez F, Matas C, Gardon JC, Canovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology* 2005;26(3):396-404.
- [24] Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology* 2005;26(6):749-56.
- [25] Gadea J, Gumbao D, Canovas S, Garcia-Vazquez FA, Grullon LA, Gardon JC. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology* 2008;31(1):40-9.
- [26] Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 2001;56(2):275-86.
- [27] Marco-Jimenez F, Lavara R, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. Cryopreservation of rabbit spermatozoa with freezing media supplemented with reduced and oxidised glutathione. *Cryo Letters* 2006;27(4):261-8.
- [28] Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 2001;60(4):498-506.
- [29] Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 2008; 75(2-3):128-34.
- [30] Uysal O, Bucak M. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno* 2007;76(3):383-90.
- [31] Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Critser E, Eyestone W, First N. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25(4):591-600.
- [32] Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development* 1996;45(3):378-91.
- [33] Buffone MG, Calamera JC, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera MM, Storey BT, et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2012;97(2):293-8.
- [34] Molina J, Castilla JA, Castaño JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L. Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Human Reproduction* 2001;16(3):534-9.
- [35] Khalifa TA, El-Saidy BE. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Animal Reproduction Science* 2006;93(3-4):303-15.
- [36] Bucak MN, Sarlözkan S, Tuncer PB, Ulutas PIAI, Akçadag HI. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research* 2009;81(2-3):90-5.
- [37] Bucak MN, Tuncer PB, Sarlözkan S, Ulutas PA, Cayan K, Baspınar N, et al. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science* 2009;87(3):468-72.
- [38] Soares AT, Silva SV, Almeida FC, Lemos PFBda, Nunes JF, Peixoto CA, et al. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutatona reduzida. *Ciência Rural* 2011;41:1991-7.

- [39] Tuncer PB, Bucak MN, Sariozkan S, Sakin F, Yeni D, Cigerci IH, et al. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology* 2010;61(1):89–93.
- [40] Castilho EFd, Guimarães JD, Martins LF, Pinho RO, Guimarães SEF, Espescht CJB. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2009;38:2335–45.
- [41] Martinez-Soto JC, de DiosHourcade J, Gutierrez-Adan A, Landeras JL, Gadea J. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* 2010;12(3):431–41.
- [42] Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006;65(5):958–78.
- [43] Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 2004;25(3):317–25.
- [44] Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction* 1989;41(1):183–97.
- [45] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 1995;7(4):871–91.
- [46] Hamamah S, Royere D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing–thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction nutrition development* 1990;30(1):59–64.
- [47] Córdova A, Pérez-Gutiérrez JF, Lleó B, García-Artiga C, Alvarez A, Drobchak V, et al. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* 2002;57(8):2119–28.
- [48] Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Sanjuanbenito BP, Gutiérrez-Adán A, et al. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 2005;64(2):232–41.
- [49] Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Gouraud A, Holt WV. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development* 2011;78(12):951–61.
- [50] Pirie NW. The oxidation of sulphhydryl compounds by hydrogen peroxide: catalysis of oxidation of cysteine and glutathione by iron and copper. *Biochemical Journal* 1931;25(5):1565–79.
- [51] Marti E, Marti JI, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology* 2008;29(4):459–67.
- [52] Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 2001;59(4):451–8.
- [53] Mukhtar H, Lee IP, Glutathione Bend JR. S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1978;83(3):1093–8.
- [54] Gopalakrishnan B, Aravinda S, Pawshe CH, Totey SM, Nagpal S, Salunke DM, et al. Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochemical Journal* 1998;329(2):231–41.
- [55] Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM, Shaha C. Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *Journal of Cell Science* 2002;115(10):2053–65.
- [56] Hemachand T, Shaha C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Letters* 2003;538(1–3):14–8.
- [57] Abe S, Kunii S, Fujita T, Hiraiwa K. Detection of human seminal  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in stains using sandwich ELISA. *Forensic Science International* 1998;91(1):19–28.
- [58] Funahashi H, Machaty Z, Prather RS, Day BN.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. *Molecular Reproduction and Development* 1996;45(4):485–90.
- [59] Chen F, Lu JC, Xu HR, Huang YF, Lu NQ. Preliminary investigations on the standardisation and quality control for the determination of gamma-glutamyltranspeptidase activity in seminal plasma. *Andrologia* 2007;39(1):1–6.