



## **ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA**

### **OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS IN THE SPERMATIC CONSERVATION**

**Alejandro Córdova Izquierdo<sup>1</sup>, Claudio Gustavo Ruiz Lang<sup>1</sup>, Cristian Alejandro Córdova Jiménez<sup>2</sup>, Mary Silvia Córdova Jiménez<sup>3</sup>, Juan Eulogio Guerra Liera<sup>5</sup>, Blanca Estela Rodríguez Denis<sup>5</sup> y Katherine Arancibia Salinas<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área de Investigación: Ecodesarrollo de la Producción Animal. Cuerpo Académico: Salud y Bienestar Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México.

<sup>2</sup>Becario de CONACyT-México. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, España.

<sup>3</sup>Laboratorios Brovel, S.A. de C.V. México.

<sup>4</sup>Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

<sup>5</sup>Maestría en Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

<sup>6</sup>Departamento de Morfología. FMVZ-UNAM.

#### **RESUMEN**

El estrés oxidativo de los espermatozoides, se refiere al daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos; cuyo efecto está directamente relacionado con la disminución de la sobrevivencia y capacidad fecundante después de ser eyaculados. El estrés oxidativo, es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, las cuales se hacen presentes durante el manejo y manipulación del eyaculado, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides. La pérdida de la funcionalidad de los espermatozoides –capacidad fecundante- por la presencia de grandes cantidades de ROS, después de ser eyaculados, es motivo de gran interés y preocupación en el tema de la conservación seminal de machos reproductores, cuyo objetivo es mantener, mejorar y optimizar la eficiencia reproductiva en las Unidades de Producción Animal, en cualquier parte del mundo. En este trabajo se presenta una revisión sobre estrés oxidativo, antioxidantes, técnicas para valorar el estrés oxidativo en espermatozoides y al final un glosario de términos relacionados con el tema.

**PALABRAS CLAVE:** Estrés oxidativo. Antioxidantes. Conservación espermática.

## ABSTRACT

Oxidative stress of spermatozoa, it refers to damage that may have on the integrity of their structural and physiological components, whose purpose is directly related to the decrease in the survival and fertilizing capacity after he ejaculates. Oxidative stress is caused by the formation of large amounts of reactive oxygen species (ROS), or molecules containing free radicals, which are present during the handling and manipulation of the ejaculate and jeopardize the viability of spermatozoa. The loss of the functionality of sperm-fertilizing capacity, the presence of large amounts of ROS, after he ejaculates, is of great interest and concern on the issue of preservation of seminal male breeding, which aims to maintain, improve and to optimize reproductive efficiency in animal production units, anywhere in the world. This paper presents an overview on oxidative stress, antioxidants, techniques for assessing oxidative stress in spermatozoa and in the end a glossary of terms related to the topic.

**KEY WORDS:** Oxidative stress. Antioxidants. Spermatoc preservation.

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo de los espermatozoides, se refiere al daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos; cuyo efecto está directamente relacionado con la disminución de la sobrevivencia y capacidad fecundante después de ser eyaculados. El estrés oxidativo, es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, las cuales se hacen presentes durante el manejo y manipulación del eyaculado, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides. Las principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), Peroxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , precursor de radical) y la mayoría de radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ); cuya presencia en el ambiente espermático, se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos.

La pérdida de la funcionalidad de los espermatozoides –capacidad fecundante- por la presencia de grandes cantidades de ROS, después de ser eyaculados, es motivo de gran interés y preocupación en el tema de la conservación seminal de machos reproductores, cuyo objetivo es mantener, mejorar y optimizar la eficiencia reproductiva en las Unidades de Producción Animal, en cualquier parte del mundo.

Las ROS, altamente reactivas a los agentes oxidativos pertenecen a la clase de los radicales libres; un radical libre es cualquier componente (no necesariamente derivado de oxígeno) que puede contener uno o más electrones sin división. Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas (Hicks, 2001). Las especies más comunes que implican un potencial alto para biología reproductiva son los aniones radicales *Superoxido* ( $O_2^-$ ), *Peroxido de hidrógeno* ( $H_2O_2$ ) principal especie reactiva y aunque no es un radical libre, es la molécula que más se ha involucrado en el daño de los espermatozoides de equino, según Baumber *et al* (2000), *hidroxilo* ( $-OH$ ), Peroxil ( $ROO$ ) y la mayoría de los radicales hidroxilos ( $OH$ ). Los nitrógenos derivados de radicales libres como óxido nítrico ( $NO$ ) y los aniones peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) también pueden jugar un papel significativo en la reproducción y fecundación. Estos últimos efectos dependen en base a su concentración e interacción con el peróxido de hidrogeno. Los aniones Peroxinitratos (oxidoperoxinitrato) pueden ser formados *in vitro* por la superoxidasa y oxido nítrico, que se activan y reaccionan con el glutatión, cisterna, desoxirribosa y otros Thioles y Thioeteres. Estos pueden formar especies muy fuertes de nitratos en la presencia de metales, iones o complejos.

La hipótesis de que los radicales libres pueden influir en la fertilidad del macho ha mostrado un soporte científico. El mecanismo de pérdida de función espermática, está basada en el efecto del estrés oxidativo, el cual está involucrado en la excesiva producción de ROS. El  $H_2O_2$  ha sido igualmente beneficiado y demanda sus efectos en el espermatozoide y su influencia sobre el proceso de fecundación. Por esta razón, los radicales libres y los ROS han sido asociados con el estrés oxidativo y se han involucrado en numerosas funciones en el momento de la reproducción. Investigaciones clínicas reportan que el medio ambiente de los ROS y los antioxidantes en condiciones normales garantizan una mejor función espermática.

El  $H_2O_2$  no posee electrones libres y por lo tanto no es un radical libre, sin embargo, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales libres  $-OH$  en presencia de metales de transición (Hicks, 2001).

Wayne, en 1998 indicó que el término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del

metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de óxido en motores de combustión interna.

Blokhina *et al.* (2002) indicaron que las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en biología, se centró en su uso en la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la causa de la rancidez. La actividad antioxidante podía ser medida simplemente colocando la grasa en un de contenedor cerrado con oxígeno y midiendo la tasa de consumo de éste. Sin embargo, fue la identificación de las vitaminas A, C, y E como antioxidantes, la que revolucionó el campo y condujo a hacer énfasis en la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos.

Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes, fue investigada por primera vez cuando fue reconocido que una sustancia con actividad antioxidante es probable que sea una que se oxida a sí misma fácilmente. La investigación en cómo la vitamina E previene el proceso de peroxidación de lípidos, condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores que previenen reacciones oxidativas, a menudo depurando las ROS antes de que puedan dañar a las células (Wayne, 1998; Blokhina *et al.*, 2003).

Según (Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006) un radical libre es cualquier átomo o molécula que contenga algún electrón no apareado en su órbita externa y que puede existir en forma independiente; lo cual concuerda con lo indicado por (Membrillo *et al.*, 2003), estos autores indicaron los radicales libres pueden provocar inestabilidad y un aumento en la reactividad. Por otro lado, Olguín *et al.* (2004) y Sánchez *et al.* (2004) señalaron que los radicales libres, en un intento por completar sus pares de electrones interaccionan con moléculas adyacentes, en este sentido Chihuailaf *et al.* (2002) indicaron que una de ellas cede electrones libres, proceso denominado oxidación y otra, necesariamente los recibe, proceso denominado reducción) y forman, como en una reacción en cadena, nuevos radicales libres.

Olguín *et al.* (2004) indicaron que los radicales libres se forman normalmente en el cuerpo, las fuentes más importantes son el metabolismo anaeróbico a través de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, así como la oxidación de los ácidos grasos, reacciones del citocromo P450 y las células fagocíticas como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que las enzimas oxidantes involucradas son la xantin-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la

mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa.

Según lo mencionado por Chihuailaf *et al.* (2002), las fuentes exógenas aumentan en forma notable la producción de ROS; se ha establecido que altas ingesta de algunos metales de transición como el Fe y Cu promueven la generación de radicales libres a partir de peróxidos. Otras fuentes exógenas que concuerdan con (Venereo,2002), son la radiación humo de cigarrillos, la luz solar, el *shock* térmico, algunos solventes orgánicos y pesticidas, las micotoxinas, el trauma, la hiperoxia y el sobre ejercicio.

Para Venereo (2002) y Hicks *et al.* (2006), los radicales libres también tienen importantes funciones fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis; en este sentido, Chihuailaf *et al.* (2002) indicaron que los radicales libres se deben considerar que son benéficos o tóxicos, dependiendo de su concentración y de los mecanismos antioxidantes que los produzcan.

En el 2004, Olguín *et al.* indicaron que cuando la formación de radicales libres excede la capacidad de defensa ante ellos, falla el balance oxidativo y se produce daño a las moléculas biológicas. El ataque a los grupos funcionales de las proteínas, provoca oxidación de aminoácidos y modificación de las proteínas como fragmentación y agregación.

Diversos autores han clasificado a los radicales libres de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula. El tipo más frecuente es el radical libre de oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional. De menor preponderancia son los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Otros radicales descritos contienen carbono, fósforo o nitrógeno como centro reactivo (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olivares *et al.*, 2006). Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los radicales libres con oxígeno reactivo son los más comunes. Según (Chihuailaf *et al.*, 2002; Membrillo *et al.*, 2003; Córdova *et al.*, 2006) han indicado que entre ellos, están el radical hidroxilo (HO)<sup>•</sup>, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a lo que Venereo (2002) suma a esta lista al Oxígeno solo (1O<sub>2</sub>), Oxígeno nítrico (NO), Peróxido (ROO), Semiquinona y al Ozono.

Aunque el peróxido de hidrogeno no es un radical libre por no poseer electrones libres, pero es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales HO en presencia de metales de transición (Chihuailaf *et al.*, 2002; Membrillo *et al.*, 2003).

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1. *Radicales libres inorgánicos o primarios.* Se originan durante el metabolismo aeróbico normal, las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua. Una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente y los inevitables productos intermedios de esta reacción son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y el óxido nítrico, se caracterizan por tener una vida media muy corta (Chihuailaf *et al.*, 2002).

2. *Radicales libres orgánicos o secundarios.* Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre (Chihuailaf *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003).

3. *Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.* En este grupo se incluye a un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno solo, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito y los hidroperóxidos orgánicos (Venereo, 2002).

En la actualidad, la calidad espermática ha tomado importancia debido a que trae consigo mayores porcentajes de fertilidad, lo que se traduce en una eficiencia reproductiva y por lo tanto mayores ganancias para el productor, por lo que es necesaria una buena conservación del semen.

El presente texto, trata sobre estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática, con el fin de proporcionar elementos que orienten al conocimiento y entendimiento de la importancia del estrés oxidativo y los antioxidantes en la conservación seminal. Está organizado en tres capítulos. 1.- Estrés oxidativo el cual se divide en tres subcapítulos: el primer subcapítulo, etapas del estrés oxidativo, indica tres etapas la de adopción que es cuando hay una sobreexpresión y activación de los sistemas antioxidantes, que proporciona protección sistémica completa al daño; la aguda, es cuando hay daño celular y la tercera es cuando hay muerte celular. El segundo subcapítulo, es daño oxidante con cuatro subcapítulos; se indica cómo afecta el estrés oxidativo a

los lípidos, donde se produce el daño mayor a la célula, en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados; proteínas que causan la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídico y la agregación entre proteínas; ácido desoxirribonucleico (ADN) las ROS, dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas trayendo consigo una fragmentación del DNA y carbohidratos, éstos sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman radicales libres provocando más daño a la célula. El tercer subcapítulo, se refiere a el estrés oxidativo en espermatozoides, daño del acrosoma, la fragmentación de DNA y cuál es la estrategia metabólica del espermatozoide contra el estrés oxidativo; el capítulo 2.- Antioxidantes, se refiere a antioxidantes, para contrarrestar estas alteraciones causadas por el estrés oxidativo; se compone de tres subcapítulos; el primero indica la red antioxidante, la cual está organizada de forma preventiva, que previenen: la formación de ROS por encima de los niveles normales del organismo; reparadora: son enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de radicales libres y secuestradora: cuya acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$ , ya que su exceso promueve la generación de radicales libres. El segundo subcapítulo, está relacionado con la clasificación de antioxidantes, existen varias clasificaciones, pero una de las más importantes es la que establece diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos; pero, también se toman en cuenta algunos minerales que tienen función de antioxidantes. En cuanto a los enzimáticos, los espermatozoides del epidídimo son protegidos por cinco enzimas principales, glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los no enzimáticos constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular, entre estas se encuentran las vitaminas A, C, E, glutatión, ácido úrico, Ergotioneína y compuestos polifenólicos. Los minerales ligados a la protección contra el daño oxidativo son: Zn, Se, Mn, Fe y Cu, su mecanismo general de acción es a través de la participación en sistemas enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores. Dentro del tercer subcapítulo, se encuentran los antioxidantes sintéticos, cuatro de ellos son los más utilizados en la industria alimenticia y en la actualidad en la conservación seminal: BHT, BHA, Galato de Propilo y TBHQ y el capítulo 3.- Técnicas para valorar el estrés oxidativo en semen, se refiere a las técnicas para valorar el estrés oxidativo en

semen, se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para medir el estrés oxidativo, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por radicales libres, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados; no obstante, el estrés puede ser estudiado indirectamente mediante la determinación de la concentración o actividad de los agentes antioxidantes circulantes, tales como proteínas, vitaminas, minerales y enzimas.

El texto está dirigido a estudiantes de las Licenciaturas de las Ciencias Biológicas y de la Salud de instituciones de educación y de investigación a nivel pregrado y postgrado; puede servir al público en general interesado en el tema, como material de apoyo y orientación de la importancia del estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática.

Esperamos que este documento sea de utilidad y reiteramos nuestro compromiso de servir como –institución educativa- en el intercambio de ideas que favorezcan al progreso técnico-científico de la conservación seminal con antioxidantes para mejora de la reproducción y producción animal.

**Los autores**

## **1. ESTRÉS OXIDATIVO**

Chihuailaf *et al.* (2002); Venereo (2002); Olgún *et al.* (2004) y Sánchez *et al.* (2004) definieron a el estrés oxidativo como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. Membrillo *et al.* (2003); Córdova *et al.* (2006); Cárdenas y Pedraza (2006) lo definieron como un desequilibrio entre oxidantes y los mecanismos antioxidantes de los organismos que involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas como algunas vitaminas como la E y la C.

### **1.1.- ETAPAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

Agarwal y Tamer (2005) y Hicks *et al.* (2006) indicaron que con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidativo puede dividirse en tres etapas (adaptación, agudo y crónico); tomando en consideración las características del daño estructural y funcional ejercido como consecuencia de la reactividad de las diferentes especies reactivas (reto

oxidante), así como el tiempo de exposición a las mismas y la evidencia concomitante de modificaciones en los procesos biológicos afectados.

### ***1.1.1.- Adaptación al estrés oxidativo***

Blokhina *et al.* (2003) y Hicks *et al.* (2006) indicaron que la respuesta al estrés oxidativo, es la respuesta de la célula o del organismo para equilibrar por medio de procesos de sobreexpresión genética y activación enzimática, la sobreproducción de ROS, que han superado a los sistemas antioxidantes naturales, estableciendo las condiciones de estrés oxidativo. En 2001, Aitken y Krausz indicaron que el resultado de la adaptación, es una protección parcial o total contra el daño, el cual no es cuantificable e incluso puede llegar a crear una condición de resistencia a niveles intensos y constantes.

### ***1.1.2.- Estrés oxidativo agudo***

Hicks *et al.* (2006) y Castillo *et al.* (2007) coincidieron en indicar que en ocasiones el estrés oxidante es menos intenso, debido a un desequilibrio menor, su expresión en cambios estructurales y funcionales, suele ser más sutil que el proceso crónico, ya que generalmente es mediado por las ROS menos reactivas como son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional, afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suele acompañar también a procesos crónicos.

### ***1.1.- 3 Estrés oxidativo crónico***

Agarwal y Tamer (2005) y Hicks *et al.* (2006) indicaron que generalmente se trata de un proceso que al ser mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular.

Hicks *et al.* (2006) y Castillo *et al.* (2001) señalaron que las moléculas generadas por el daño oxidativo pueden interactuar con otras biomoléculas, afectándolas en su estructura y función. Algunas modificaciones inducidas por este tipo de estrés oxidativo se reflejan como cambios

bioquímicos intracelulares (estrés oxidativo intracelular) y se manifiestan fundamentalmente por alteraciones funcionales locales y sistémicas (hipertensión arterial, arritmias, fibrilación, broncoconstricción, shock).

Tanto en el estrés agudo, como en el crónico, se presentan dos mecanismos de daño, el oxidativo y el no oxidativo (modificación de la homeostasis), la diferencia es que en el agudo, la eliminación del reto oxidante permite la recuperación celular y del organismo; en el crónico, el daño es frecuentemente irreversible (Hicks *et al.*, 2006).

## **1.2.- DAÑO OXIDATIVO**

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos perjudiciales por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Hicks *et al.*, 006).

### **1.2.1.- Lípidos**

Hyang Song *et al.* (2000) y Venereo (2002) indicaron que es en los lípidos donde se produce el daño mayor, en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica (LOP), lo cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica o enranciamiento, se inicia según Cárdenas y Pedraza (2006) y Blokhina *et al.* (2003) cuando las ROS atacan un ácido graso polinsaturado (AGP) y le quitan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acilácido graso. Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre, peroxilo ácido graso, que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones. En este sentido, Chihuailaf *et al.* (2002) y Cerolini *et al.* (2001) indicaron que éste mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición y por los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP. Los productos finales de la LPO, son lípidos peroxidados, que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA); aunque se ha comprobado que este último posee una baja toxicidad. Las consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica produciéndose edema y por lo tanto muerte celular.

Para Venereo (2002); Cerolini *et al.* (2001) y Sellés (2001), los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión, etc.) y la activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción, como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

### **1.2.2.- Proteínas**

Las proteínas, también constituyen un blanco para las ROS, pero su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones. Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que causan la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. El daño oxidativo a las proteínas puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. En 1998, Kirchhoff indicó que la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteínica la hacen más vulnerable a los radicales libres. Venereo (2002) precisó que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición. Estos sitios son particularmente susceptibles debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar iones hidroxilo los que, posteriormente, atacan a los aminoácidos adyacentes. Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.

Kirchhoff (1998); Blokhina *et al.* (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que los sistemas de reparación de las proteínas solo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

### **1.2.3.- Ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Venereo (2002) y Tamer *et al.* (2005) indicaron que el ADN también constituye un blanco de ataque por parte de las ROS, principalmente el ADN mitocondrial. Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ROS provenientes de la cadena respiratoria; además, carece de histonas en su estructura, lo que le resta estabilidad. Las

ROS, dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. Trisini *et al.* (2004); Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que en presencia de las ROS, se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura del ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas) ocasionando con ello, problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética.

Por otro lado, Chihuailaf *et al.* (2002) indicó que sus mecanismos de reparación son menos eficientes, en contradicción con Agarwal *et al.* (2005); Agarwal y Tamer (2005); Cárdenas y Pedraza (2006) quienes señalaron que cuando las ROS alcanzan el núcleo o se generan dentro de éste, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN, y en caso de que exista alguna mutación (ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases) reparan el daño causado y cuando la modificación es más extensa del ADN, actúa el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser remplazado por la ADN polimerasa I y la ligasa.

#### **1.2.4.- Los carbohidratos**

Blokhina *et al.* (2003) indicó que la glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman compuestos dicarbonílicos y peróxido de hidrógeno. La importancia de este hecho radica en que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y conformar nuevas asociaciones moleculares.

### **1.3.- ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES**

Kirchhoff (1998) y Álvarez (2006) indicaron que los espermatozoides producen y exportan ROS al medio extracelular, de las cuales la mayoría son producidos por las mitocondrias y son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa.

Rooke *et al.* (2001) señaló que los fosfolípidos realizan una esencial función en la promoción óptima de la fertilidad, ya que las bajas cantidades de este ácido graso en los lípidos de espermatozoides se han correlacionado con reducciones en la concentración de espermatozoides; sin embargo, Saez *et al.* (1998) indicó que el alto contenido de ácidos grasos insaturados en sus

membranas plasmáticas y su pequeño volumen del citoplasma facilita la producción de ROS, las cuales perjudican la actividad funcional de las células de espermáticas, tales como disminución de la motilidad y vitalidad, y pérdida en la capacidad de fusión espermato-ovocito, lo cual concuerda con Castillo *et al.* (2001) y Álvarez (2006) quienes demostraron que los ROS inducen peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados eterificados a fosfolípidos de membrana, lo cual produce una permeabilización de la membrana plasmática y acrosomal; en pocas palabras, produce verdaderos agujeros en la membrana espermática conduciendo a una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide. Además, las ROS inactivan enzimas glucolíticas que traen como consecuencia un bloqueo en la biosíntesis de ATP y la consiguiente pérdida de la motilidad por falta de combustible necesario para la contracción de los microtubulos flagelares de los espermatozoides.

Saez *et al.* (1998) indicó que paradójicamente, los espermatozoides requieren una ligera producción intracelular de anión superóxido ( $O_2^-$ ) para mejorar el proceso de formación y la reacción acrosomal.

### **1.3.1.- Daño del acrosoma por estrés oxidativo**

Álvarez (2006) señaló que el daño acrosomal por efecto de el estrés oxidativo es causado durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo, principalmente, por el peróxido de hidrógeno, el cual daña al acrosoma e inhibe la inducción de la reacción acrosomal, lo cual concuerda con lo antes indicado por Castillo *et al.* (2001) quienes señalaron que el peróxido de hidrógeno causa daño acrosomal, pero no afecta la motilidad espermática.

### **1.3.2.- Fragmentación de DNA por estrés oxidativo**

Aitken y Krausz (2001) indicó que el daño al DNA de los espermatozoides es producido después de la espermiación, durante la co-migración de espermatozoides maduros e inmaduros, desde los túbulos seminíferos, al epidídimo ya que los espermatozoides inmaduros producen elevados niveles de ROS, los cuales inducen fragmentación de DNA a nivel del epidídimo, ya sea actuando de forma directa sobre el ADN o indirectamente, mediante la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas. Por otro lado, el mismo epidídimo podría jugar un papel activo a la hora de inducir fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por él mismo, ya sea producido por radicales libres como el anion superóxido (Sun *et al.*, 1997; Aitken

y Krausz, 2001) el radical hidroxilo o el óxido nítrico, o bien mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por agentes tóxicos o por factores pro-inflamatorios a nivel epididimario.

En este sentido, la calidad de los espermatozoides y su sucesiva habilidad de fecundación está ligada a la integridad del ADN, el cual se considera como un factor significativo involucrado en la etiopatogenia de la infertilidad (Aitken y Clarkson, 1998; Aitken y Krausz, 2001; Tamer *et al.*, 2005).

Trisini *et al.* (2004); Agarwal *et al.* (2005); Olsen *et al.* (2005) y Henkel *et al.* (2005) indicaron que el estrés oxidativo no sólo ataca a la membrana, debido a su vulnerabilidad los gametos son más susceptibles al daño genotóxico al ADN durante la espermatogénesis o en la maduración epididimaria. En 2005, Henkel *et al.* indicaron que bajo estas circunstancias, los espermatozoides que se liberan en la espermiación, son inmaduros y generadores de una producción excesiva de ROS, lo cual concuerda con Aitken y Krausz (2001) y Tamer *et al.* (2005) produciendo de este modo una inhibición en el metabolismo oxidativo y glicólisis aunado a una inactivación enzimática pudiendo generar efectos negativos alterando la integridad genómica del ADN de los espermatozoides.

### ***1.3.3.- Estrategia metabólica de los espermatozoides contra el estrés oxidativo***

Sellés (2001) y Álvarez (2006) señalaron que la estrategia metabólica del espermatozoide está dirigida a la producción de fuerza contráctil. Esto va a depender de la capacidad de los espermatozoides de producir ATP, que luego será utilizado como sustrato de la ATPasa situada en los brazos de dineína para convertir la energía química en trabajo mecánico, por las proteínas contráctiles del flagelo. Esto supone que la maquinaria metabólica de los espermatozoides está principalmente dedicada a la producción de ATP para el trabajo de motilidad de los microtúbulos del flagelo espermático. Castillo *et al.* (2001) indicaron que únicamente pequeñas cantidades de ATP son consumidas en otras funciones espermáticas, como las relacionadas con el proceso de fecundación. La conversión preferente de glucosa a lactato en condiciones aeróbicas a través de la glucólisis, parece ser una peculiaridad crucial en la evolución de los espermatozoides, quizás dirigida a minimizar el cúmulo de equivalentes reductores en la mitocondria, y por lo tanto, reducir la producción de ROS.

Castillo *et al.* (2001) y Sellés (2001) indicaron que la conversión de glucosa a lactato en condiciones aeróbicas disminuye la producción de equivalentes de NADH y FADH derivados del ciclo de Krebs y el flujo de electrones a través de la membrana mitocondrial interna, regulando a la baja producción de ROS.

## 2. ANTIOXIDANTES

Los espermatozoides están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS, por lo que la función de un antioxidante, según Hicks *et al.* (2006) es actuar como un donador de electrones, capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción o como lo indicó Venereo (2002), sacrifica su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas, ADN, etc. -funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidro-fóbicos. Actúan como eliminadoras con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de estos últimos o simplemente como lo definieron Chihuailaf *et al.* (2001) y Membrillo *et al.* (2003) son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones.

### 2.1.- RED ANTIOXIDANTE

Chihuailaf *et al.* (2001); Aitken y Krausz (2001) y Castillo *et al.* (2001) coincidieron al señalar que para proveer el máximo de protección, los antioxidantes plasmáticos e intracelulares, están armónicamente integrados para lograr la máxima supresión de las reacciones que generan los radicales libres. Estos últimos, se distribuyen preferentemente en los organelos que, por la intensidad de su actividad y su función metabólica, generan una mayor producción de radicales libres, localizados tanto en membranas, como en el citosol celular. Existe consenso de que la defensa antioxidante en los organismos aerobios, involucra antioxidantes con función:

**Preventiva:** Diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales (albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, cobre); ferritina, transferritina y mioglobina, así como hierro, previenen la formación de ROS por encima de los niveles normales del organismo (Chihuailaf *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2001; Aitken y Krausz, 2001).

**Reparadora:** Enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de radicales libres, tales como superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GP),

Glutación reductasa y Catalasa (Chihuailaf *et al.*, 2001; Castillo *et.al.*, 2001; Aitken y Krausz, 2001).

**Secuestradora:** Cuya acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$ , ya que su exceso promueve la generación de radicales libres. Las proteínas que cumplen esta función son: Ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina. Otros, como Tocoferol (VE), Betacaroteno (BC), Acido ascórbico (VC) y Flavonoides (Chihuailaf *et al.*, 2001; Castillo *et.al.*, 2001; Aitken y Krausz, 2001).

Un componente adicional en la red antioxidante, son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos (Chihuailaf *et al.*, 2001).

## 2.2.- Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes naturales han sido clasificados de diferentes maneras. Venereo en el 2002 los clasificó según su sitio de acción.

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN EL SITIO DONDE EJERCEN SU ACCIÓN**

<b>INTRACELULAR</b>	<b>MEMBRANA</b>	<b>EXTRACELULAR</b>
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafanasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Venereo, 2002.

Otra de las clasificaciones citadas por Reylli *et al.* (1990), es según su origen.

**TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES, SEGÚN SU ORIGEN**

ORIGEN	ACCIÓN
<b>1. EXÓGENOS</b>	
Vitamina E	Neutraliza al oxígeno singlete. Captura radicales libres de hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> . Neutraliza peróxidos.
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno singlete. Captura radicales libres de hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> . Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Betacarotenos	Neutraliza al oxígeno singlete.
Flavonoides, licopenos	
<b>2. Endógenos</b>	
Enzimáticos	Cofactor.
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, magnesio.
Catalasa (CAT)	Hierro.
Glutation Peroxidasa (GPx)	Selenio.
<b>3. No enzimáticos</b>	
Glutation	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
Coenzima Q	
Ácido tioctico	Transportadores de metales (transferían y ceruloplasmina).

Reylli *et al.*, 1990.

Las clasificaciones más utilizadas, según Hicks *et al.* (2006) establecen las diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en naturales enzimáticos y no enzimáticos.

## **2.2.1.- Antioxidantes naturales**

### **2.2.1.1.- Antioxidantes enzimáticos**

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos, los cuales son regulados de acuerdo a los requerimientos celulares; pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos (Hicks *et al.*, 2006). Los espermatozoides del epidídimo son protegidos por cinco enzimas principales: glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Membrillo *et al.*, 2003).

Chihuailaf *et al.* (2001) indicaron que el grupo de antioxidantes enzimáticos, catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas. Frente a una situación de exposición prolongada a ROS, puede ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH, necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores.

#### **a) Glutatión peroxidasa (GPx)**

Chihuailaf *et al.* (2001); Venereo (2002) y Blokhina *et al.* (2003) indicaron que la enzima GPx es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio (Se) dependiente que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune; cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH), los productos de la reacción, son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Esta enzima se ha encontrado en tejido testicular y en espermatozoides de mamíferos (Ursini *et al.*, 1999) y como una enzima que realiza un papel estructural en la cápsula mitocondrial en la parte media y en el flagelo de los espermatozoides (Kirchhoff, 1998; Marín-Guzmán *et al.*, 2000b), cumpliendo de esta manera una función metabólica importante como antioxidante (Verma y Kanwar, 1999).

Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GPx contiene Se bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Chihuailaf *et al.*, 2002, Olfield, 2003).

Para Venereo (2002); Cárdenas y Pedraza (2006) existen 3 formas de GPx que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad de sustrato:

**GPx-c clásica o forma celular:** tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido, está prácticamente en todas las células, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

**GPx -p plasmática o forma extracelular:** presenta afinidad semejante para ambos sustratos es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

**GPx-PH fosfolípido hidroperóxido:** tiene afinidad específica para los lipoperóxidos, cuya función biológica primaria es proteger contra la lipoperoxidación, reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Es la única isoforma cuya estructura es monomérica; es decir, contiene un solo residuo de selenocisteína (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Chihuailaf *et al.* (2002) indicó una cuarta forma de la GPx, que es la gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal.

Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos (Venereo, 2002).

La GPx, actúa junto con el superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y la catalasa (CAT) para catalizar la degradación intracelular de hidroperóxidos lipídicos, evitando de esta forma posibles daños oxidativos a las proteínas y a las membranas de los organelos, pudiendo llegar a causar alteraciones al ADN en los espermatozoides (Verma and Kanwar, 1999; Tamer *et al.*, 2005).

### ***b) Catalasa (CAT)***

Para Chihuailaf *et al.* (2002) y Venereo (2002) la catalasa es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, de amplia distribución intracelular, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos). Cárdenas y Pedraza (2006) señalaron que en general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la

actividad de peroxidasas, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.

Esta enzima, presenta 2 funciones fundamentales; la primera es catalítica (Blokhina *et al.*, 2003), ya que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno —proveniente de la dismutación del superóxido— en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores; segunda función, es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superoxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Venereo, 2002).

### ***c) Superóxido dismutasa (SOD)***

Chihuilaf *et al.* (2002) indicó que esta enzima está presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que esta enzima es una metaloproteína, es decir que está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD contienen cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; Mn-SOD: contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; Fe-SOD: contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. Coli*, su distribución es amplia en el organismo.

Una de sus funciones es catalizar la dismutación de radicales libres superóxido a peróxido de hidrógeno, lo que no requiere de co-sustratos, su principal función es la protección contra el anión superóxido (Venereo, 2002). La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Blokhina *et al.*, 2003).

### ***d) Glutatión S-transferasa (GST)***

Blokhina *et al.* (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) señalaron dos isoformas de GST citosólicas y GSTS microsomales. Su función primaria es catalizar la conjugación de glutatión reducido (GSH) con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio; también pueden detoxificar al 4-hidroxinonal un producto de la peroxidación de lípidos.

**e) Tiorredoxina reductasa (TrxR)**

Blokhina *et al.* (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que esta enzima es una selenoproteína que contiene en su penúltimo carbono un residuo de selenocisteína, necesario para su actividad catalítica. Existen dos isoformas: la TrxR1 citosólica y la TrxR2 mitocondrial. Las dos isoformas cuentan con un FAD por subunidad, el cual reduce el grupo disulfuro del sitio activo, su función es catalizar la reducción del polipéptido tiorredoxina.

**f) Peroxirredoxinas (Prxs)**

Estas enzimas se caracterizan por poseer residuos de cisteína en su centro catalítico, lo cual las identifica como enzimas antioxidantes específicas para el grupo tiol. Los grupos cisteínas son oxidados a ácido sulfénico en forma reversible por los sustratos de estas enzimas (peróxidos). Están subdivididas en tres subclases: Prx 2-cisteína típica (Prx I-IV) se localiza en mitocondrias, Prx 2-cisteína atípica núcleo y citoplasma (Prx V) y Prx 1-cisteína citoplasma (Prx VI) (Chihuailaf *et al.*, 2001; Blokhina *et al.*, 2003; Olguín *et al.*, 2004).

Están envueltas en degradación enzimáticas de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitros, por lo tanto, las Prxs asumen un papel importante contra el estrés oxidativo. La tiorredoxina puede regenerar la forma reducida de las Prx (Cárdenas y Pedraza, 2006).

**g) Hemo oxigenasa (HO)**

Esta enzima está presente en dos isoformas: una constitutiva (HO-2) y una inducible (HO-1). Se localiza en el retículo endoplásmico. La HO cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo proveniente de las hemoproteínas, produciendo biliverdina, monóxido de carbono y hierro. La biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (Blokhina *et al.*, 2003; Cárdenas y Pedraza, 2006; Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004).

La expresión de HO-1 aumenta en respuesta a muchos agentes que inducen estrés oxidativo como lo es el mismo grupo hemo. La actividad antioxidante de la HO-1 se puede explicar, al menos en parte, por el hecho de que esta enzima degrada a un prooxidante (grupo hemo) y genera un compuesto con actividad antioxidante (biliverdina) el cual es transformado a otro antioxidante (bilirrubina) (Cárdenas y Pedraza, 2006).

### **2.2.1.2.- Antioxidantes no enzimáticos**

Los antioxidantes no enzimáticos, constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Los antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos, se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares; éstos incluyen vitamina C, glutatión, ácido úrico, ergotioneína y flavonoides polifenólicos (Chihuailaf *et al.*, 2001).

#### **a) Vitamina A**

Es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales, existe como provitamina llamada B-caroteno. Por su conformación estructural son excelentes capturadores de radicales libres. Protegen contra la liperoxidación, sobre todo, la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, y elimina el ion superóxido y radicales peroxilos. Al igual que la vitamina C, puede comportarse como prooxidante, pueden inducir estrés oxidativo incrementando la producción de radicales libres, aparentemente en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno. Estas acciones dependen también de la presencia de otros carotenoides y de la interacción con antioxidantes como la vitamina E (Olguin *et al.*, 2004).

#### **b) Vitamina C**

La vitamina C, es una sustancia hidrosoluble y es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares. Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los radicales libres superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos (Chihuailaf *et al.*, 2002). La vitamina C protege contra el daño oxidativo al ADN, proteínas y contra la peroxidación lipídica de los espermatozoides (Membrillo *et al.*, 2003), también actúa sobre el radical libre tocoferoxilo regenerándolo a vitamina E. Este proceso transforma el ascorbato en el radical libre eshidroascorbato. La regeneración de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico requiere la unión con los sistemas reductores no radicales como glutatión o niacina (NADH y NADPH). Dado que la vitamina C es un compuesto redox activo, puede actuar como antioxidante o puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia

de excesivas concentraciones de iones  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$ . Los productos generados por estas reacciones incluyen radicales de lípidos que propagan la peroxidación de grasas y los radicales hidroxilos. Se ha especulado también que altos consumos de vitamina C disminuyen la absorción de selenio, que funciona como un importante cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Membrillo *et al.* (2003) señalaron que la vitamina C, ha tenido efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5°C; sin embargo, no mejora significativamente el mantenimiento de la utilidad espermática.

La absorción primaria de la vitamina C, se lleva a cabo en el yeyuno, mediante un proceso saturable según la dosis, lo que traduce que a mayor ingestión, la absorción disminuye (Olguín *et al.*, 2004).

### **c) Vitamina E**

El nombre genérico de esta vitamina, hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es una vitamina liposoluble, principal antioxidante en las membranas celulares y en las LDL, junto al  $\gamma$ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. Unida a la porción hidrofóbica del alfa-tocoferol existe un grupo OH, cuyo H puede removerse fácilmente y funcionar como donador de electrones (Oldfield, 2003).

La captura de radicales libres superóxido, hidroxilo y peroxilos lipídicos, la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Los radicales peroxilos generados durante la peroxidación lipídica extraen el H de la molécula del tocoferol. El radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena. El radical tocoferol migra hacia la superficie de la membrana y se convierte en el radical libre tocoferoxilo; se regenera en alfa tocoferol a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Blokina *et al.*, 2003). La vitamina E, además, protege la oxidación de los lípidos, también ayuda a daños en el ADN y reduce el nivel de mutación cromosómica en las células espermáticas (Fenech *et al.*, 1997).

La absorción de la vitamina E dietaria, ocurre vía los quilomicrones en el yeyuno (15-45%) y posteriormente pasa a la vía del sistema linfático. Los tocoferoles son transportados como parte

del complejo de las lipoproteínas. Su absorción requiere de sales biliares y jugos pancreáticos cuya secreción es estimulada por la grasa dietaria ( Castellini *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004).

Membrillo *et al.* (2003) señalaron que la vitamina E, en el semen equino almacenado a 5°C no mejoró la motilidad espermática, esto concuerda con Marin-Guzman *et al.* (1997) quienes indicaron que la vitamina E sirve de antioxidante en el semen de verraco, también demostraron que los daños estructurales en los espermatozoides se produce cuando ácidos grasos insaturados están presentes en el semen, como es el caso de la especie porcina, lo que da lugar a una disminución de la motilidad de los espermatozoides.

#### ***d) Ubiquinona, también llamada coenzima Q***

Esta enzima es un derivado de la quinona. Su estructura es semejante al tocoferol y se le ha identificado como un portador adicional en la cadena respiratoria. Aproximadamente 50% de la ubiquinona celular se encuentra en la mitocondria. Aunque su función antioxidante in vivo está en discusión, su forma reducida, el ubiquinol, tiene una fuerte actividad antioxidante, comparado con su forma oxidada, llegando a consumirse antes que la vitamina E, frente a una situación de exposición a radicales libres. El ubiquinol, impide que las ROS desencadenen la lipoperoxidación, también participa en el reciclaje de la vitamina E en el ámbito mitocondrial (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

#### ***e) Glutación***

Membrillo *et al.* (2003) indicaron que el glutatión reducido es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Blokhina *et al.* (2003) comunicó que es un agente de bajo peso molecular que atrapa ROS. Su forma reducida (GSH) es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; además, reduce el radical libre tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004).

### **f) Ácido úrico**

Aunque tradicionalmente ha sido considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, su función como antioxidante, tanto intra como extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción aparentemente es prevenir la oxidación de la Vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

### **g) Ergotioneína**

Esta enzima, llega a las células de los mamíferos a través de la ingesta de vegetales. Es un poderoso capturador de ROS producido por la acción de la mieloperoxidasa presente en neutrófilos. Puede reaccionar con peroxinitritos y sus derivados y capturar iones hidroxilos. Sus estados oxidados intermedios son rápidamente regenerados en presencia de ascorbato (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

### **h) Compuestos Polifenólicos**

Sebastián (2003) indicó que estos compuestos que se encuentran en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y granos, tienen actividad biológica entre la que destaca su actividad antioxidante, antiinflamatoria, como antiagregantes plaquetarios, antimicrobiana y antitumoral. Los principales son ácidos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, flavonoles, derivados de la cumarina, derivados de fitoalexane, ácido cinámico y antocianidinas).

Según Chihuailaf *et al.* (2002), pueden ser lipo o hidrosolubles y se localizan tanto intra como extracelularmente. Los antioxidantes no enzimáticos de naturaleza hidrófoba se ubican en membranas y, generalmente, bloquean la formación de hidroperóxidos, o interrumpen la propagación de la lipoperoxidación, lo cual concuerda con Olguín *et al.* (2004) quien indicó otras de sus funciones como son: actuar como capturadores de radicales libres, agentes reductores, formación de complejos con metales prooxidantes o extinguidores de la formación de oxígeno solo. La mezcla de estos compuestos puede actuar en forma sinérgica con las vitaminas funcionando como protectores y regeneradores de los antioxidantes (Olguín *et al.*, 2004).

Otros compuestos sugeridos con actividad antioxidante son la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa (Chihuailaf *et al.*, 2002).

### 2.2.1.3.- Función de los metales en la defensa antioxidante

Una atención especial merecen algunos minerales traza ligados a la protección contra el daño oxidativo, tales como Zn, Se, Mn, Fe y Cu. Aunque su mecanismo general de acción es a través de la participación en sistemas enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer funciones antioxidante en forma independiente (Chihuailaf *et al.*, 2002).

#### a) Zinc

En este sentido, el Zn puede ejercer sus efectos en forma mediata o inmediata. La primera requiere de una prolongada exposición al Zn, lo que desencadena la inducción de metalotioneínas, las cuales, en último término, cumplen la acción antioxidante. La mecánica del efecto inmediato se desarrolla a través de dos vías: reduciendo la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno mediante la competencia con los iones Fe<sup>+2</sup> y Cu<sup>+</sup> que participan en la reacción de Fenton; o bien, disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfidrilos de las proteínas a la oxidación. Se ha informado, además, que la actividad antioxidante del Zn influye en la estabilización no enzimática de membranas (Chihuailaf *et al.*, 2002).

#### b) Selenio

Oldfield (2003) indicó que el selenio (Se) se establece como un elemento traza esencial y como un tóxico natural para la salud animal. Chihuailaf *et al.* (2002) indicaron que la función que desempeña en el organismo es bajo la forma de selenoenzimas. Marin-Guzmán *et al.* (2000b) indicaron que en sus inicios, el Se fue estudiado como un elemento tóxico, y sólo hace unos treinta años se estableció su importancia en la salud y producción de ganado, cuando se demostró que prevenía la distrofia muscular de origen nutricional, enfermedad asociada con una deficiencia de la metaloenzima GSHPx. La deficiencia de Se es traducida en la disminución de la actividad de GSH-Px y otras selenoenzimas, dejando a la célula expuesta al ataque oxidativo de las ROS. Rooke *et al.* (2001); Kaur y Mohinder (2004) han caracterizado 11 selenoproteínas. Los valores de Se han sido modificados continuamente con la cantidad y tipo de dieta consumida (Marin-Guzmán *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Rooke *et al.*, 2001) y el aumento en la producción de ROS como, el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); generados continuamente como un producto del metabolismo

normal de los espermatozoides, lo cual perjudica sus defensas antioxidantes (Castillo *et al.*, 2001; Tamer *et al.*, 2005).

Las deficiencias de Se, están relacionadas con el riesgo de padecer problemas de fertilidad, esto ha hecho que el estudio del Se sea de importancia en la salud animal, donde se han implicado al estrés oxidativo como un factor y un causante mayor que altera la calidad y viabilidad espermática (Tamer *et al.*, 2005). Se sabe que una dieta suplementada con Se y Vitamina E mejora la calidad espermática. Debido a que los espermatozoides de la especie porcina contienen un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática, los predispone a la peroxidación lipídica, daño oxidativo a la mitocondria y daño nuclear al ADN, más que a los espermatozoides de otras especies (Hyang Song *et al.*, 2000; Sellés, 2001; Cerolini *et al.*, 2001).

### **c) Magnesio**

Estudios recientes, realizados en ratas, señalan que el magnesio (Mg) manifiesta propiedades protectoras contra la lipoperoxidación en algunos tejidos; aunque los mecanismos involucrados no son del todo claros, se presume que el Mg puede incrementar la actividad de SOD, actuar como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, actuar como promotor de la síntesis de metalotioneínas e interferir por competencia con los iones Fe (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cádenas y Pedraza, 2006).

### **d) Fierro y cobre**

Si bien los metales de transición Fe<sup>+2/+3</sup> y Cu<sup>+/+2</sup> desarrollan importantes funciones antioxidantes, como constituyentes de enzimas y proteínas, también pueden actuar como poderosos generadores de radicales libres cuando estos iones se encuentran libres en altas concentraciones. La forma reducida de estos iones, Fe<sup>+2</sup> y Cu<sup>+</sup>, es mucho más reactiva que su forma oxidada, Fe<sup>+3</sup> y Cu<sup>+2</sup>. Los iones Fe<sup>+2</sup> y Cu<sup>+</sup> promueven la descomposición del peróxido de hidrógeno cuyo producto final más importante es el radical hidroxilo.

Esta es una de las principales vías de producción del radical hidroxilo en el medio celular y se conoce como reacción de Fenton. Por otra parte, la autoxidación de estos iones puede llevar a la formación de radicales superóxido que facilitan la transferencia de electrones a macromoléculas biológicas tales como lípidos, proteínas y ADN. Se confirma, así, la importancia de las proteínas

séricas encargadas de transportar y quelar estos metales (Chihuilaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

La adición de sulfato ferroso al semen equino almacenado a 5°C aumenta la peroxidación, disminuyendo la motilidad espermática debido a que coadyuva a la generación de ROS (membrillo *et al.*, 2003).

### **2.2.2.- Antioxidantes sintéticos**

Los antioxidantes sintéticos fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y, al mismo tiempo, más económica en relación a los antioxidantes naturales. Entre los antioxidantes sintéticos, cuatro de ellos son los más utilizados en la industria alimenticia y ahora para la conservación espermática: BHT, BHA, Galato de Propilo y TBHQ (Vieira, 2004).

#### **a) El BHT (butil hidroxitolueno – INS 321)**

Vieira (2004) indicó que es uno de los antioxidantes más utilizados en Brasil, por ser uno de los más antiguos en el mercado y poseer costo relativamente bajo. Brasil era un productor de esta molécula, hasta hace algunos años, pero actualmente este producto es totalmente importado. El BHT tiene apariencia de un polvo blanco cristalino y posee excelente solubilidad en varios aceites y grasas. Pero no es muy eficiente, si se compara a otros antioxidantes. Para que su efecto se refuerce, generalmente debe utilizarse en conjunto con otro oxidante. Su volatilidad es relativamente alta, por eso el producto se debe mantener en un embalaje bien cerrado mientras está almacenado y que no sea expuesto a altas temperaturas de proceso. Membrillo *et al.* (2003) señalaron que el BHT en espermatozoides durante el almacenamiento líquido, logra un mejoramiento en la integridad de la membrana, en la motilidad y en la sobrevivencia espermática.

#### **b) El BHA (butil hidroxianisol – INS 320)**

Vieira (2004) indicó que es más eficiente que el BHT en grasas animales. Posee excelente solubilidad en aceites y grasas, pero tampoco es muy eficiente en varios aceites vegetales. El BHA tiene apariencia de copos blancos cerosos. Debido a su inestabilidad, se debe guardar en un embalaje bien cerrado, al abrigo de la luz. Este procedimiento evita que el producto quede amarillento, lo que demuestra oxidación del propio material. Posee volatilidad relativamente alta,

debiendo tomarse los mismos cuidados aplicados al BHT. Membrillo *et al.* (2003) indicaron que tiene buena habilidad para preservar la motilidad espermática en semen bajo conservación.

**c) El Galato de Propilo (INS 310)**

Vieira (2004) señaló que se utiliza poco en el mercado cárnico; sin embargo, es más eficiente que el BHT y el BHA en la estabilización de varios aceites vegetales. Se trata del más eficiente antioxidante disponible en el mercado para estabilización de grasas de origen animal. El Galato de Propilo muchas veces se utiliza en conjunto con el BHT y el BHA para reforzar la actividad de estos últimos. A veces, ante la presencia de iones metálicos, principalmente, hierro y cobre; el Galato de Propilo puede formar complejos coloridos, afectando la apariencia del producto. Su forma física es de un polvo blanco cristalino. El Galato de Propilo se desarrolló hace muchos años para sustituir al BHA y al BHT en sus aplicaciones, debido a posibles efectos nocivos de estos dos productos para la salud humana. Membrillo *et al.* (2003) indicaron que al igual que el butil hidroxitianisol, el n-propil galato tiene la habilidad para preservar la motilidad espermática, aunque el diluyente definido puede anular los efectos benéficos de estos.

**d) El TBHQ (terc-butilhidroquinona – INS 319)**

Vieira (2004) señaló que es el antioxidante sintético más moderno disponible en el mercado mundial y el más eficiente en una mayor gama de aplicaciones; es formado por cristales levemente amarillentos. El producto lo utilizan varias empresas del mercado alimenticio brasileño. Se puede afirmar que el antioxidante es el más eficiente, en la mayoría de los aceites y grasas vegetales, incluyendo los aceites poliinsaturados. El TBHQ es, normalmente, más eficiente que el BHT y el BHA en grasas de origen animal. Se trata de una buena alternativa para estabilización de aceites esenciales y aceites cítricos. Es el más eficiente en grasas de origen animal. Se trata de una buena alternativa para estabilización de aceites esenciales y aceites cítricos. Es el más eficiente en la estabilización de aceites de pescado y de aves, los cuales generalmente son muy inestables. El TBHQ da excelente protección a aceites y grasas utilizados en frituras y prefrituras de productos cárnicos, cargándose al producto final, protegiéndolo contra oxidación. El TBHQ puede formar complejos en presencia de algunas proteínas y sales de sodio, en pH alcalino.

Muchas veces se utilizan agentes quelantes de metales, también llamados antioxidantes secundarios, en conjunto con los antioxidantes descritos anteriormente. La función de estos agentes es dejar iones metálicos que estén presentes en el sistema, no disponibles para catalizar las reacciones de oxidación, evitando también la formación de complejos coloridos. Entre los agentes quelantes más utilizados están el ácido cítrico y el EDTA (Vieira, 2004).

Como efecto secundario, algunos antioxidantes también presentan acción antimicrobiana. El TBHQ y el BHA son los antioxidantes que más detienen este efecto contra proliferación de hongos y bacterias. El BHT y el Galato de Propilo no presentan este efecto de forma significativa (Vieira, 2004).

### **3. TÉCNICAS PARA VALORAR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES**

Sánchez *et. al.* (2004) indicaron que se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para medir el estrés oxidativo, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por radicales libres, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados, no obstante el estrés puede ser estudiado indirectamente mediante la determinación de la concentración o actividad de los agentes antioxidantes circulantes, tales como proteínas, vitaminas, minerales y enzimas) (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Algunos de los métodos descritos a continuación son para identificar ROS, también pueden ser usados para estudiar y caracterizar el potencial antioxidante de alguna sustancia o extracto (Cárdenas y Pedraza, 2005).

#### **3.1.-Detección del superóxido**

##### **3.1.1.- Reducción del citocromo C**

Blokhina et al. (2003) señaló que este método se basa en la reducción de ferricitocromo c(Fe<sup>3+</sup> cit c) a ferrocitocromoc(Fe<sup>2+</sup> cit c) razón por la cual ha sido utilizado para medir el tiempo de formación del superóxido por numerosas enzimas, células y tejido bascular, la reacción es: Fe<sup>3+</sup> cit c + O<sub>2</sub><sup>-</sup> → Fe<sup>2+</sup> cit c + O<sub>2</sub>

La reducción del citocromo se cuantifica espectrofotométricamente a 550nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para el ferricitocromo c de  $0.89 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.1.2.- Inhibición de aconitasa**

Sánchez *et al.* (2004) indicaron que las alteraciones en la actividad de la aconitasa han sido utilizadas como un indicador sensible de los cambios en la actividad del superóxido *in vivo e in Vitro*. La aconitasa cataliza la interconversión de citrato isocitrato y esta presente tanto en el citosol como en la mitocondria. El superóxido, inactiva a la aconitasa debido a la oxidación seguida por la pérdida reversible de hierro, el cual es cofactor de la enzima; por lo tanto, con la formación de superóxido, una fracción de la aconitasa en algún momento es inactiva, pero capaz de reactivarse, así la relación de aconitasa inactiva/aconitasa activa es un indicador de la producción de superóxido.

### **3.1.3.-Oxidación de hidroetidina**

Chihuailaf *et al.* (2002) y Sánchez *et.al.* (2004) señalaron que la hidroetidina (HE) es un compuesto permeable a la célula que pueden transferir dos electrones al superóxido provocando la oxidación de la hidroetidina; la reacción es relativamente específica para superóxido, con una mínima oxidación del compuesto inducida por la presencia de peróxido de hidrógeno o ácido hipocloroso. La oxidación intracelular de HE a etidio por el superóxido puede analizarse por citometría de flujo en sus pensiones celulares y por microfluorometría *in vivo* en cortes de tejidos y sangre.

### **3.2.- Reacciones de quimioluminiscencia**

Sánchez *et al.* (2004) indicaron que los métodos de quimioluminiscencia para la detección de superóxido han sido frecuentemente empleados por que son potencialmente accesibles a los sitios intracelulares en donde es generado este radical, por lo cual son altamente específicos. El compuesto quimioluminiscente utilizado más ampliamente es la licigenina, aunque ya se han desarrollado otros compuestos como la coelenterazina y el 2-metil-6-[4-metoxifenil]-3,7-dihidroimidazo[1,2- $\alpha$ ] pirazin-3-ona (MCLA) que se utilizan para medir la formación de superóxido en neutrofilos, macrófagos, cultivos celulares y tejido vascular.

### **3.2.1.- Resonancia del espín electrónico y atrapamiento del espín**

Chihuailaf *et al.* (2002) y Sánchez *et al.* (2004) han señalado que la espectroscopia por resonancia de electrón –espín (RES) también conocida como resonancia paramagnética electrónica (RPE), es un método analítico que permite la detección directa de los radicales libres. Cabe mencionar de manera general que esta técnica se basa en las propiedades magnéticas de los electrones no apareados y su ambiente molecular. Los electrones desapareados pueden existir en dos orientaciones en paralelo o antiparalelo con respecto al campo magnético aplicado; por ello es posible observar diferencias de energías en los estados correspondientes a la región de microondas del espectro electromagnético; así se pueden diferenciar especies tal como, el superóxido y radical hidroxilo en sistemas biológicos en bajas concentraciones.

### **3.3.- Detección de peróxido de hidrógeno**

#### **3.3.1.- Ensayos ligados a peroxidasa de raíz fuerte (HRP)**

Blokhina *et al.* (2003) indicó que estos ensayos dependen de la oxidación de un compuesto donador de átomos de hidrógeno. Así, bajo la presencia de peróxido de hidrógeno, los donadores de átomos de hidrógeno son oxidados por la HRP.

La cantidad de peróxido de hidrógeno presente se mide por la disminución de la fluorescencia de un compuesto fluorescente como la escopoletina, o bien el observado el aumento de la fluorescencia de un donador de átomos de hidrógeno, previamente no fluorescente, como la diacetildiclorofluoresceína, p-hidroxifenilacetato, ácido homovainillico y el rojo de fenol (Sánchez *et al.*, 2004).

#### **3.3.2.- Fluorescencia de la diclorofluoresceína**

Sanches *et al.* (2004) indicaron que la oxidación de la 2-7-diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto fluorescente 2-7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) por la presencia de peróxido de hidrógeno, permite utilizar esta reacción como indicador específico como formación de esta especie reactiva, este método se utiliza ampliamente en la detección de peróxido de hidrógeno en

neutrofilos. La fluorescencia producida por la DCF se mide 498nm de excitación y 522 de emisión.

### **3.3.3.- Inhibición de la catalasa por el aminotriazol**

Blokhina *et al.* (2003) señaló que el aminotriazol es un inhibidor irreversible de la catalasa, que reacciona con el complejo intermediario  $H_2O_2$ -catalasa, por ello inhibe a la catalasa solo en presencia de peróxido de hidrógeno; de ahí que esta reacción pueda utilizarse como indicador de la presencia de  $H_2O_2$ .

## **CONCLUSIONES**

El uso de antioxidantes para la conservación espermática, es un tema muy prometedor, cuyos efectos podrían verse reflejados en la optimización de los protocolos de conservación seminal de las especies de animales de granja de importancia económica; lo cual se reflejaría en un mejor aprovechamiento del rendimiento del material germinal de los machos reproductores, sobre todo en aquellas especies, como el cerdo, en donde es de vital importancia la conservación de la calidad seminal para su uso posterior, sin que los espermatozoides sufran daños que conducen a la pérdida de su capacidad fecundante. Esto solo sería posible, a medida que se tenga más y mejor conocimiento del efecto del estrés oxidativo que sufren los espermatozoides cuando son manipulados; por lo que el uso de antioxidantes con el fin de disminuir el estrés oxidativo, durante la conservación seminal, es un tema muy interesante y que requiere de más investigación.

## GLOSARIO

**Ácido ascórbico o vitamina C:** Es un antioxidante monosacárido encontrado en animales y plantas. Como no puede ser sintetizado por los seres humanos y debe ser obtenido de la dieta.

**Antioxidante:** Es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

**Apoptosis:** Es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Como tal es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis.

**Compuestos fenólicos:** Los compuestos fenólicos clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo, y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo) en su estructura molecular.

**Detoxificar:** Cuando un órgano o sistema biológico no responde adecuadamente, nos encontramos en clínica, ante la disyuntiva de verificar si ello sucede por una carencia de la capacidad de ese órgano o simplemente por una obstrucción funcional y mecánica de este.

**Estrés oxidativo:** Es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

**Glutación:** Es un péptido que contiene cisteína y es encontrado en la mayoría de las formas de vida aerobia. No es requerido en la dieta y es sintetizado en las células desde sus aminoácidos constitutivos

**Hiperoxia:** Estado que presenta un organismo sometido a un régimen respiratorio con exceso de oxígeno

**Isoformas:** Es una versión de una proteína con pequeñas diferencias de otra isoforma de la misma proteína. Se pueden producir diferentes formas de una proteína a partir de genes diferentes pero relacionados entre sí

**Oxidación:** Es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante.

**Radical libre:** Un radical libre es una molécula (orgánica o inorgánica), en general extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo.

**Prooxidante:** Los antioxidantes que son agentes de reducción pueden también actuar como prooxidantes. Por ejemplo, la vitamina C tiene actividad antioxidante cuando reduce sustancias oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno, sin embargo puede también reducir iones de metales lo que conduce a la generación de radicales libres.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Agarwal A and Tamer M. S. 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *B J U International*; 95: 503 – 507.
- Agarwal A; H.C.L.D and Shyam S. R. Allamaneni. 2005. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and Sterility*. 84 (4): 850 – 853.
- Aitken R J, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 122:497 – 506.
- Aitken RJ and Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl*; 9: 367-76.
- Alvares, 2006 Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida. *Rev Iberoamericana de fertilidad*. XXVI Congreso Nacional SEF.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany* 91:179-194
- Cárdenas, R.N., Pedraza, C.J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química* 17(2):164-173

- Castellini C; Lattaioli P; Dal Bosco A and Beghelli D. 2002. Effect of supranutritional level of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology* 58: 1723 – 1732.
- Castillo C; Benedito L J; López-Alonso M; Miranda M y Hernández J. 2001. Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. Med. Vet.* 33 (1) p. 204 – 218
- Castillo,C.; Hernández,J.; Pereira, V.;Vázquez P.; López A. M.;Gutiérrez,C; Benedito J.L. 2007 *Papel Del Estrés Oxidativo EnLas Enfermedades Del Vacuno Albéitar* N° 109
- Cerolini S; Maldjian A; Pizzi F and Gliozzi T. M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121: 395 – 401.
- Córdova,I.A.,Saltijeral, O.J., Guerra,L.J.E. 2006. Conservación seminal de mamíferos domésticos. 4<sup>o</sup> Seminario Internacional En Reproduccion Animal Y Produccion De Leche Y Carne. Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco.Mexico DF.
- Chihuailaf,R.H.;Contreras,P.A.;Wittwer,F.G.2002.Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal *Veterinaria México Volumen 33 Número 3*
- Fenech,M.;DReosti,I.; Aitken C. 1997.Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes .*Carcinogenesis* vol.18 no.2 pp.359–364
- Henkel R; Gesa Maaß; Rolf-Hasso Bödeker; Christine Scheibelhut; Thomas Stalf; Claas Mehnert; Hans-Christian Schuppe; Andreas Jung and Wolf-Bernhard Schill. 2005. Sperm function and assisted reproduction technology. *Reproductive Medicine and Biology.* 4: 7 – 30.
- Hicks, J.J. 2001. *Bioquímica*. McGraw-Hill. México. 900 pp.
- Hicks, J.J.; Torres,R.Y.; Sierra,V. M.2006 Estrés oxidante.Concepto y clasificación *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4 pp 223-226
- Hyang Song J; Fujimoto K and Miyazawa T. 2000. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J. Nutr.* 130: 3028 – 3033.
- Kaur Parminder and Mohinder P. Bansal. 2004. Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. *J Biomed Sci.* 11: 391 – 397

- Kirchhoff C. 1998. Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction* 3: 86 – 95.
- Marin-Guzman J.; Mahan, D. C.; Chung, K.J.; Pate L.; Pope W. F. 1997. Effects of Dietary Selenium and Vitamin E on Boar Performance and Tissue Responses, Semen Quality, and Subsequent Fertilization Rates in Mature Gilts. *J. Anim. Sci.* 1997. 75:2994–3003
- Marin-Guzman J.; Mahan D. C.; Whitmoyer, R. 2000a. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. Anim. Sci.* 2000. 78:1544–1550
- Marin-Guzman J.; Mahan D. C. and Pate J. L. 2000b. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim. Sci.* 78:1537–1543.
- Membrillo, O.A., Córdova, I.A., Hicks, G.J.J., Olivares, C.I.M., Martínez, T.V.M., Valencia, M.J.J. 2003. Peroxidación lípídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia.* 28(12):699-704.
- Oldfield J. E. 2003. Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E145–E148.
- Olguín, C.G.; Guiller, G.M.; Zúñiga, R.R.A.; Pasquetti, P.A. 2004. Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 12, No. 4 pp 199-206
- Olivares, C. I.M.; Medina, N.R.; Torres, Y.D.R., Montes, C. D. H. 2006 Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4
- Olsen Ann-Karin; Lindeman Birgitte; Richard Wiger, Nur Duale and Gunnar Brunbovg. 2005. How do male germ cells DNA damage?. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 207: S521 – S531
- Reylli PM, Burkley GB. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 1990;77:1324-5.
- Rooke J. A; Shao C-C and Speake B. K. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121, 315 – 322.
- Saez, F.; Motta C.; Boucher D.; Grizard, G. 1998. Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.7 pp. 667–672

- Sánchez, M.A.; Santiago, E.O.; Vargas L.A.; Mendoza, N.V.M. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo *Bioquímica*. Volumen 29 No. 3. p. 81-90
- Sebastián, M. 2003. Antioxidantes Biomoleculares En Nutrición Animal–Calidad De La Carne Con Bioflavonoides. II Seminario Internacional sobre Produção, Mercado e Qualidade da Carne de Suínos. Veterinario. PROBENA, S.L. Florianópolis – SC – Brasil
- Sellés S E. 2001. Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especie porcina. Cátedra de fisiología animal. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Departamento de biología animal, Universidad de Murcia, España.
- Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F., 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 602– 607.
- Tamer M. S; Ashok A; Rakesh K. Sharma, Anthony J. Thomas, Jr and Suresh C. Sikka. 2005. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate *Fertility and Sterility*. 83:95–103.
- Trisini T A; Narendra B.S; Singh P; Susan M. Duty and Russ Hauser. 2004. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertility and Sterility*. 82: 1623 – 32.
- Venereo, G.J.R. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002;31(2):126-33
- Verma A and Kanwar K.C. 1999. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*; 1: 151-154.
- Vieira, A.I.Q. 2004. La Oxidación Lipídica y el Uso de Antioxidantes Sintéticos en Productos Cárnicos
- Wayne, R.B. 1998. Food lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. *J. Am. Coll. Nutr.* 17:648.