

Artículo original:

USO DE ANTIOXIDANTES PARA MEJORAR LA CALIDAD DE SEMEN CRIOPRESERVADO

Use of antioxidants to improve quality of cryopreserved semen

A. Santiani

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos -Lima-Perú

Email:
asantiani@hotmail.com

Palabras Clave:
Espermatozoide, antioxidante, criopreservación

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales factores descritos que afectan la funcionalidad de espermatozoides son niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los principales efectos nocivos de ROS en la funcionalidad espermática son pérdida de motilidad (Peris *et al.*, 2007), incremento de peroxidación lipídica (Aitken, 1994) y fragmentación del ADN espermático (Baker y Aitken, 2004). Asimismo, en diferentes especies como en humanos (de Lamirande y Lamothe, 2009) y porcinos (Awda *et al.*, 2009) se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno también inducen la capacitación espermática.

Es interesante destacar que en ovinos (Santiani, 2003) y humanos (Wang *et al.*, 1997), se ha demostrado que durante el proceso de criopreservación de semen, los niveles de especies reactivas de oxígeno se incrementan significativamente, estando relacionados con pérdida de motilidad y viabilidad espermática, así como con capacitación espermática prematura (Santiani, 2003; Peris *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007) y fragmentación del ADN espermático (Peris *et al.*, 2007; Sue-Hee *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que el efecto negativo de los ROS puede ser prevenido parcialmente mediante la adición de antioxidantes análogos a superóxido dismutasa al medio dilutor de semen (Santiani, 2003; Ruiz *et al.*, 2007), mientras que en bovinos, el uso de antioxidantes en los diluyentes para congelar semen aún es controversial (Foote *et al.*, 2002). Recientemente se ha demostrado en alpacas que la adición de análogos de superóxido dismutasa reduce la fragmentación de ADN durante el proceso de criopreservación y mantiene la motilidad espermática (Santiani *et al.*, 2013).

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El término “especies reactivas de oxígeno” ó ROS se refiere a todos los radicales libres o especies activadas de oxígeno que puedan causar daño oxidativo (Fuchs *et al.*, 1997). En las mitocondrias, el oxígeno reacciona con el hidrógeno, en un proceso denominado fosforilación oxidativa. Algunos de los radicales libres de oxígeno son: radical peróxido (ROO \cdot), radical hidroxilo (OH) y anión superóxido (O $_2$ \cdot^-), mientras que el principal ROS no radical es el peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$) (Aitken y Fisher, 1994). Estas moléculas tienen uno o más electrones no apareados girando en sus órbitas externas (Warren *et al.*, 1987). Esta condición químicamente muy inestable, los torna sumamente activos, puesto que el electrón no apareado busca salir de su desequilibrio. Para ello, debe oxidar, es decir, sustraer un electrón a cualquier molécula vecina, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre (Fridovich, 1998). De esta manera pueden iniciar reacciones en cadena, como por ejemplo la peroxidación lipídica (Fuchs *et al.*, 1997).

EFFECTOS DE ROS EN ESPERMATOZOIDES

Los principales efectos nocivos de ROS en espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático. La pérdida de motilidad es el indicador más sensible de estrés oxidativo en comparación con otros parámetros seminales (Peris *et al.*, 2007). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen la capacidad de iniciar la cascada de la peroxidación lipídica en la membrana espermática. La peroxidación lipídica es el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados (Saleh y Agarwal, 2002). Los ácidos grasos poli-insaturados son susceptibles a experimentar ataque oxidativo porque la presencia de enlaces dobles debilita la unión C-H en los átomos de carbono adyacentes y facilita la sustracción de hidrógeno (Figura 1), paso inicial para el proceso oxidativo (Aitken y Fisher, 1994). Otra de las consecuencias más importantes de los ROS en espermatozoides, es el daño en la integridad del ADN (Baker y Aitken, 2004). En humanos, existe una alta relación entre pacientes infértiles y

fragmentación del ADN espermático (Lukanov *et al.*, 2004). Asimismo, estudios clínicos muestran una correlación negativa entre la tasa de clivaje y el daño al ADN (Aitken, 2004). También se ha reportado que los ROS producidos durante la criopreservación aumentan la fragmentación del ADN en ovinos (Peris *et al.*, 2007) y caninos (Sue-Hee *et al.*, 2010). Otros estudios parecen indicar que un espermatozoide con daño en su ADN es capaz de fecundar ovocitos, sin embargo puede estar relacionado con pérdidas embrionarias tempranas, disminución de la tasa de implantación y alta incidencia de anomalías estructurales en embriones implantados (Wai-sum *et al.*, 2006).

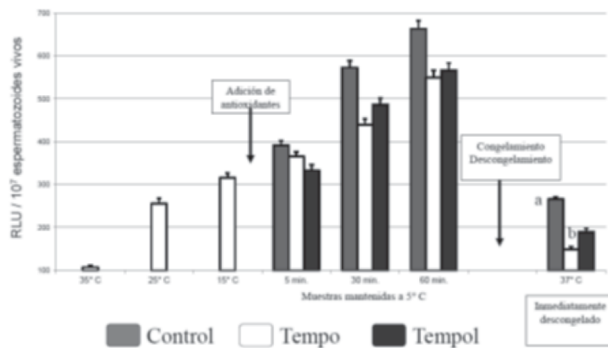


Figura 1: Producción de ROS durante el proceso de criopreservación de semen ovino. Efecto de la adición de antioxidantes (1mM) a los 10°C.

Sin embargo, los ROS también regulan la fisiología normal del espermatozoide. El anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) participan en la inducción de eventos fisiológicos del espermatozoide como capacitación espermática, hiperactivación y reacción acrosomal (Aitken y Fisher, 1994; Baker y Aitken, 2004). Además los ROS también estarían regulando la condensación nuclear, activación de la motilidad espermática, hiperactivación, y la fusión espermatozoide-ovocito (Baker y Aitken, 2004).

PRODUCCIÓN DE ROS DURANTE CRIOPRESERVACIÓN

La producción de ROS aumenta durante el proceso de criopreservación. En ese sentido, la gradual reducción de temperatura estimula la generación del anión superóxido (O_2^-) en espermatozoides bovinos. Asimismo, existe un aumento en los niveles de óxido nítrico durante el descongelamiento de espermatozoides bovinos (Chatterjee y Gagnon, 2001) y caninos (Tselkas *et al.*, 2000). Del mismo modo, en espermatozoides caninos (Sue-Hee *et al.*, 2010) y porcinos (Sue-Hee *et al.*, 2011), los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular se encuentran aumentados luego del proceso de criopreservación. En humanos, la producción de ROS aumenta significativamente durante el proceso de enfriamiento, con los máximos niveles observados a los 4°C (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002). Similares resultados han sido encontrados en espermatozoides de ovino (Santiani, 2003). Sin embargo, los niveles de ROS son extremadamente bajos en espermatozoides incubados a temperaturas inferiores a cero y en espermatozoides descongelados (Wang *et al.*, 1997). Debido a que la formación de ROS es parte de la actividad metabólica de las células, es probable que los ROS disminuyan por efecto de la congelación ya que la viabilidad disminuye.

Además, la disminución de la actividad enzimática en temperaturas muy reducidas también explicaría los bajos niveles de ROS observados en espermatozoides congelados y descongelados.

ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, reduce o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1995). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con las especies reactivas de oxígeno en un determinado microambiente. La acción de los antioxidantes es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de otras moléculas (Venereo, 2002). Intracelularmente, los principales mecanismos antioxidantes son las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, sin embargo, el espacio disponible para estas enzimas es bastante limitado en los espermatozoides. Además de las enzimas, existen moléculas presentes en el plasma seminal como la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina, las cuales se unen a metales de transición de tal forma que éstos no estimulen las reacciones de los radicales libres. Otro grupo de antioxidantes lo constituyen el ácido ascórbico y ácido úrico, los cuales rompen las cadenas de oxidación al eliminar radicales peróxido (Ochsendorf *et al.*, 1997). Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre (Venereo, 2002).

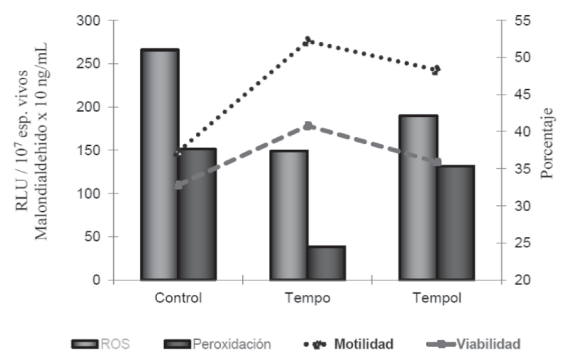


Figura 2: Producción de ROS, peroxidación lipídica, porcentaje de motilidad y viabilidad de semen congelado de ovino.

Cuadro 1. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
Glutathion reducido		Haptoglobinas
Proteínas ligadoras de metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Adaptado de Venereo (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CON ANTIOXIDANTES

El proceso de criopreservación de semen está relacionado con un aumento de ROS (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002, Santiani, 2003) y disminución de la actividad de enzimas antioxidantes presentes en el plasma seminal (Álvarez y Storey, 1992; Bilodeau *et al.*, 2001). En ese sentido, se han realizado algunos estudios en ovinos (Watson y Anderson, 1983; Askari *et al.*, 1994; Ollero *et al.*, 1997; Sánchez-Partida *et al.*, 1997, Santiani, 2003) y bovinos (Foote *et al.*, 2002) para determinar si la adición de antioxidantes al semen previo al proceso de congelamiento reduce el daño peroxidativo causado por ROS.

En ovinos, la adición de 2-4 mM de hidroxitolueno butilado (Watson y Anderson, 1983), alfa tocoferol (Askari *et al.*, 1994; Ollero *et al.*, 1997), lactoalbúmina, seroalbúmina (Ollero *et al.*, 1997) y 25–50 mM de taurina (Sánchez-Partida *et al.*, 1997) mejoran significativamente la motilidad, vitalidad e integridad de membrana luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. No obstante, Sánchez-Partida *et al.* (1997) refieren que la adición de taurina no produce ningún efecto en la fertilidad. Otros antioxidantes como ácido ascórbico (Askari *et al.*, 1994), hipotaurina ó carnosina (Sánchez-Partida *et al.*, 1997) no mejoran la función espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. Por el contrario, la adición de carnosina y ácido ascórbico en concentraciones mayores a 50 mM reducen significativamente la motilidad (Sánchez-Partida *et al.*, 1997).

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CON ANÁLOGOS DE SUPEÓXIDO DISMUTASA

Los radicales nitróxidos, Tempo y Tempol, tienen actividad similar a la superóxido dismutasa (SOD) (Mitchell *et al.*, 1990) y en comparación con la SOD, el Tempo y Tempol son de bajo peso molecular, altamente solubles y penetran la membrana celular fácilmente (Luo, 2001). En consecuencia, la adición de estos antioxidantes al medio de dilución debería mejorar la calidad de semen luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. Sin embargo, el efecto del Tempo y Tempol en la calidad seminal no está bien estudiado. Uno de los primeros trabajos sobre criopreservación de semen con estos antioxidantes fue realizado en bovinos. En esta especie, la adición de Tempo y Tempol al medio previo al congelamiento no produjo ningún efecto en la motilidad espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento (Foote *et al.*, 2002). Similares resultados son reportados por Coutinho da Silva *et al.* (2008), quienes han utilizado entre 0.7 a 6 mM de Tempol para congelar semen de equino o espermatozoides obtenidos del epidídimo (Johnson y Coutinho da Silva, 2008) en un dilutor en base a leche descremada.

Dichos resultados negativos o neutros del Tempo y Tempol pueden ser explicados porque de acuerdo a lo descrito por Santiani (2003), los niveles de ROS durante el proceso de criopreservación se incrementan recién al final de la curva de enfriamiento y por lo tanto su adición junto al dilutor estaría causando un efecto tóxico sobre los espermatozoides. En ese sentido, Santiani (2003) refiere que la adición de Tempo y Tempol 1 mM a los 35°C a un dilutor en base a leche.

descremada, causa una disminución significativa de la motilidad, en forma similar a lo descrito por Foote *et al.* (2002). Sin embargo, cuando se adicionan estos antioxidantes a los 5°C, es decir al final de la curva de enfriamiento, se consigue una motilidad superior al grupo control (Santiani, 2003). Similares resultados son reportados por Ruiz *et al.* (2007) quienes congelaron semen de ovino en un dilutor en base a Tris junto con Tempo 0.5 mM, el cual fue adicionado al final de la curva de enfriamiento.

Cuadro2: Efecto de la adición de antioxidantes (control, tempo 1mM, tempol 1mM para la criopreservacion de espermatozoides de alpaca.

Parámetros seminales evaluados	Semen Fresco	Semen luego del proceso de criopreservación		
	Inicio	Control	Tempo (1 mM)	Tempol (1 mM)
Motilidad (%)	53.17 (15.62)	11.21* (8.14)	19.75 ^{ab} (6.48)	22.08* (7.48)
HOS + (%)	23.47 (9.74)	9.85* (4.62)	14.48* (6.15)	13.12* (6.48)
Vitalidad/integr. acrosomal (%)	45.93 (18.13)	28.18* (11.09)	30.66* (8.03)	32.71* (11.22)
TUNEL + (%)	-----	38.76* (16.15)	25.41 ^{ab} (5.79)	16.72* (8.38)

CONCLUSIONES

La utilización de los antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol 1mM) como parte del dilutor para la criopreservación de espermatozoides de ovinos y alpaca previene parcialmente la pérdida de motilidad, pérdida de la integridad funcional de membrana y la fragmentación del ADN espermático.

REFERENCIAS

- Aitken R. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, 6:19-24.
- Aitken R, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16:259-267.
- Aitken, R. 2004. The founders lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seed of doubt. *Reprod Fertil Dev* 16:655-664.
- Álvarez J, Storey B. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13, 232-241.
- Askari H, Check J, Peymer N, Bollendorf A. 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 33:11-15.
- Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* 81(3):553-561.
- Baker M, Aitken R. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 216:47-54.
- Bilodeau J, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56:275-286.
- Coutinho da Silva M, Ferreira H, Johnson A. 2008. Effects

- of Tempol and L-Ergothioneine on motility parameters of cryopreserved stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 107:317-318.
10. Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.
 11. De Lamirande E, Lamothe G. 2009. Reactive oxygen-induced formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 46:502-510.
 12. Foote, R.H., Brockett, C.C. y Kaproth, M.T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71:13-23.
 13. Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-1209.
 14. Fuchs J, Thiele J, Ochsendorf F. 1997. Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardes! Verlag, Germany, pp 21-40.
 15. Halliwell B. 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp* 61:73-101.
 16. Johnson A, Coutinho da Silva. 2008. Effects of recovery technique, freezing extender and antioxidants on motility parameters of cryopreserved stallion epididymal sperm. *Abstract/Theriogenology* 70:579-580.
 17. Lukanov T, Lichev D, Konova E, Emin A, Ayvazova N, Velkov A, Roussev R. 2009. Flow cytometric measurement of sperm nuclear DNA fragmentation in infertile men with normal standard sperm parameters. *J Mens Health* 6:50-55.
 18. Luo J. 2001. Nitroxides-metal-independent SOD mimics. Free Radicals in Biology and Medicine. *Free radical and Radiation Biology Program. The University of Iowa*.
 19. Mitchell J, Samuni A, Krishna M, Degrat W, Ahn M, Samuni U, Russo A. 1990. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 29:2802-2807.
 20. Ochsendorf F, Thiele J, Fuchs J. 1997. Antioxidants in germinal epithelium, spermatozoa and seminal plasma. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds). *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardes! Verlag, Germany, pp 85-128.
 21. Ollero M, Blanco T, Lopez-Pérez M, Cevrian-Pérez J. 1997. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B Biomed Appl* 17:157-164.
 22. Peris SI, Bolideau JE, Dufour M, Bailey JL. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen. *Mol Reprod Dev* 74:878-892.
 23. Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Coronado L, Alzamora C. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet Perú* 18(2):99-106.
 24. Saleh R, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23:737-752.
 25. Sánchez-Partida L, Setchell B, Maxwell W. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:689-696.
 26. Santiani A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. *Tesis Magister en Ciencias. Temuco, Chile: Univ. La Frontera*. 95p.
 27. Sue-Hee K, Do-Hyeon Y, Yong-Jun K. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology* 73:282-292.
 28. Sue-Hee K, Yong-Jun L, Yong-Jun K. 2011. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15°C. *Anim Reprod Sa* 124:1118-124.
 29. Tselkas K, Saratsis P, Karagianidis A, Samoulidis S. 2000. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 107:69-72.
 30. Venereo G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Militar* 31:126-133.
 31. Wai-sum O, Chen H, Chow P. 2006. Male genital tract antioxidant enzymes – Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol* 250:80-83.
 32. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ y Loughlin, K.R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, 921-925.
 33. Warren J, Johnson H, Ward P. 1987. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Patol Immunopatol Res* 6:301-315.
 34. Watson P, Anderson W. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fertil* 69:229-235