

Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado

Giovanni Restrepo Betancur*, Edison Pizarro López**, Benjamín Alberto Rojano***

Resumen

La escasa fertilidad del semen equino criopreservado ha limitado de manera sustancial su uso en procedimientos de biotecnología reproductiva. El estrés oxidativo es uno de los factores más relacionados con este fenómeno, debido al incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el semen como resultado del choque térmico, de la toxicidad de los crioprotectores, y de la alteración en la disponibilidad y la funcionalidad de los antioxidantes endógenos durante los procesos de criopreservación. Esta revisión analiza el efecto del estrés oxidativo sobre la fertilidad del semen equino criopreservado.

Palabras clave: antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, fertilidad.

Oxidative stress in cryopreserved equine sperm

Abstract

The scarce fertility of the cryopreserved equine sperm has significantly limited its use in reproductive biotechnology. Oxidative stress is one of the facts that are related the most to this phenomenon, due to the increase in the levels of species that react to

oxygen in the sperm as a result of the thermal shock, the toxicity of cryoprotectors and the alteration in the disposal and the functionality of the endogenous antioxidants during cryopreservation. This revision article analyzes the effect of oxidative stress on the cryopreserved equine sperm's fertility

Key words: antioxidants, species that react to oxygen, fertility.

Estresse oxidativo no sêmen equino criopreservado

Resumo

A escassa fertilidade do sêmen equino crio-preservado limitou de maneira substancial seu uso em procedimentos de biotecnologia reproductiva. O estresse oxidativo é um dos fatores mais relacionados com este fenômeno, devido ao incremento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sêmen como resultado do choque térmico, da toxicidade dos crio-protetores, e da alteração na disponibilidade e a funcionalidade dos antioxidantes endógenos durante os processos de criopreservação. Esta revisão analisa o efeito do estresse oxidativo sobre a fertilidade do sêmen equino crio-preservado.

Palavras importantes: antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, fertilidade.

Introducción

La criopreservación de semen es uno de los procedimientos más importantes en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida, y es utilizado en la inseminación artificial y

la producción de embriones por metodologías *in vivo* e *in vitro*¹. Esta tecnología de conservación permite una máxima distribución y una adecuada disponibilidad de material germinal de especímenes de interés, facilitando el desarrollo de programas de mejoramiento genético

* Candidato a doctor en Biotecnología, Magíster en Ciencias Biotecnología, Zootecnista, Médico Veterinario. Docente Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

** Candidato a Magíster en Biotecnología, Zootecnista. Docente Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

*** Doctor en Ciencias Químicas, Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Químico. Docente Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Correspondencia: Giovanni Restrepo Betancur, e-mail: grestrepo@elpoli.edu.co

Artículo recibido: 12/03/2011; Artículo aprobado: 01/08/2012

para rasgos de valor comercial en la especie, a través de la selección o los cruces dirigidos. Sin embargo, la escasa fertilidad del semen equino criopreservado ha limitado de manera sustancial su utilización; esto es atribuible a la alteración de la fisiología normal y la viabilidad de los espermatozoides, que por la manipulación y procesamiento excesivos son sometidos a diferentes tipos de estrés. El estrés oxidativo puede considerarse como uno de los factores más relacionados con la aparición de estas alteraciones en el semen equino criopreservado, y es producido como resultado del incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) a causa del choque térmico y la naturaleza química de los crioprotectores utilizados; de la alteración de la disponibilidad y la funcionalidad de los antioxidantes endógenos a causa de la remoción del plasma seminal, y de la alteración estructural de los antioxidantes a causa de los efectos térmicos y tóxicos del proceso². El conocimiento detallado de los fenómenos oxidativos y la capacidad antioxidante del semen, así como la investigación de nuevos métodos para su criopreservación, y de diferentes moléculas antioxidantes para la suplementación de sus diluyentes son indispensables para el mejoramiento de la fertilidad del semen equino criopreservado.

Esta revisión tiene como objetivo reconocer los diferentes mecanismos biológicos que tienen relevancia en el estado redox del semen equino, tales como la producción de especies reactivas, la defensa antioxidante y la condición de estrés oxidativo derivada de procesos fisiológicos, o de procedimientos biotecnológicos como la criopreservación. Con lo cual se pretende aportar en el entendimiento de las implicaciones del estrés oxidativo en la fertilidad del semen equino criopreservado, y en el planteamiento de posibles medidas para su mitigación.

Las especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo en el semen equino

Ciertos niveles de radicales libres son necesarios para el funcionamiento normal de las células espermáticas, incluyendo procesos como la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica, la fusión al oocito y la fertilización³. Sin embargo, cuando se presenta una

producción exagerada de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido (O_2^-), el anión hidroxilo ($\cdot OH$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como precursor de los radicales libres, la capacidad antioxidante del semen es rebasada y da lugar al proceso denominado "estrés oxidativo", el cual contribuye al daño estructural de la cromatina, las membranas y las proteínas del espermatozoide^{4, 5}.

Los espermatozoides equinos generan ERO en forma natural, principalmente por su metabolismo mitocondrial, y por la enzima espermatozoide específica NADPH oxidasa (NOX5), presente en la membrana plasmática de la cabeza de esta célula^{6, 7}. El peróxido de hidrógeno es la especie reactiva más involucrada en el daño de los espermatozoides equinos⁸, y es generada a partir del anión superóxido, el cual es la principal ERO producida por el espermatozoide por la rápida acción de la superóxido dismutasa⁹. Varios procesos como la adición del diluyente, la centrifugación y la refrigeración entre 4 y 6° C pueden afectar la membrana plasmática del espermatozoide durante la manipulación del semen para su procesamiento¹⁰. Por lo tanto, cuando las ERO son generadas en exceso, se produce una consecuente disminución de la fertilidad del semen, principalmente por la peroxidación de los lípidos de la membrana¹¹. La peroxidación en los espermatozoides equinos es un proceso complejo promovido por el alto contenido en sus membranas de ácidos grasos poliinsaturados¹², los cuales, a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, generan gran cantidad de productos como dienos conjugados, aldehídos saturados e insaturados, cetonas, oxo- e hidroxiácidos, e hidrocarburos saturados e insaturados (ej.: etano, pentano)¹³. El producto oxidado más importante es el malondialdehído (citotóxico), y el más potente, el 4-hidroxinonenol¹⁴. A pesar de todo lo anterior, los espermatozoides equinos parecen ser relativamente más resistentes a la peroxidación de la membrana que los espermatozoides de otras especies domésticas¹⁵.

La presencia de leucocitos y espermatozoides morfológicamente anormales, caracterizados por la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o anomalías en la pieza media, incrementan de manera significativa la formación de ERO¹⁶, y de otros lípidos útiles como

sustratos para la peroxidación, como los plasmalogenos y las esfingomielinas, los cuales favorecen las alteraciones del espermatozoide¹⁷. Una concentración de 5 millones de neutrófilos activados/mL de seme es suficiente para alterar la movilidad de los espermatozoides equinos¹⁸, dado que los neutrófilos son capaces de generar hasta 100 veces más ERO que las células espermáticas. Aunque estas células no son comúnmente observadas en el semen equino, están presentes en casos de infección, y su efecto perjudicial sobre los espermatozoides es potenciado por la pérdida de los antioxidantes durante la remoción del plasma en las técnicas de preparación del semen¹⁹.

Dentro de los parámetros más utilizados convencionalmente para la evaluación de la fertilidad de los espermatozoides equinos, aparece la movilidad espermática como un indicador sensible del estrés oxidativo, debido a que la disminución de la movilidad espermática asociado con ERO, ocurre en ausencia de descensos detectables en la viabilidad, la integridad acrosomal, o el potencial de membrana mitocondrial²⁰. Otros autores han encontrado una correlación positiva entre la oxidación de las proteínas del semen, la movilidad y la viabilidad espermática, y sugieren que la oxidación de las proteínas podría ser importante para la función de los espermatozoides, mientras que la oxidación de los lípidos del plasma seminal fue definida como un indicador de daño espermático. Adicionalmente, evidenciaron que una correlación positiva entre los niveles de oxidación de lípidos y proteínas en espermatozoides y del plasma seminal, con la presencia de defectos severos en la función de los espermatozoides de equinos subfértiles, indica que la oxidación de lípidos y proteínas podría ser útil para la identificación de machos con problemas de fertilidad²¹.

La defensa antioxidante del semen equino

Un antioxidante con función biológica se define como una sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato, resultando ser un agente reductor más potente²². Los mecanismos de defensa antioxidante en los seres vivos pueden ser mediados por proteínas de unión a hierro y cobre, tales como la transferrina, la ferritina y la albúmina²³. También por pequeñas

moléculas antioxidantes como el ascorbato, el urato, el glutatión, los tocoferoles, los flavonoides, los carotenoides y el ubiquinol; y por enzimas, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx)²⁴, inclusive, por otras diferentes moléculas y extractos de origen natural²⁵.

El plasma seminal equino posee actividades de CAT de 98.7 ± 29.2 U/mg de proteína; de SOD de 29.15 ± 6.64 U/mg proteína; y de GPx de 0.87 ± 0.06 μ M de NADPH oxidado/min/mg de proteína^{26, 27}. Otras moléculas presentes en el plasma seminal, como taurina, hipotaurina, piruvato y lactato, podrían actuar como antioxidantes²⁸. Para minimizar los efectos de las ERO sobre los espermatozoides equinos, se ha suplementado el semen con una variedad de estos sistemas antioxidantes, entre los cuales se encuentran SOD, CAT, citocromo C líquido, ácido ascórbico, α -tocopherol, carotenoides, flavonoides, extractos naturales de ajo y soya, y otras múltiples moléculas individuales o combinadas^{29, 30}.

La actividad antioxidante enzimática en el semen equino aparentemente previene la formación de ERO, y es incrementada con la adición de un diluyente, posiblemente por sus cofactores y sustancias adicionales³¹. La CAT previene el descenso en la movilidad después del estrés oxidativo³². Un efecto protector de la CAT y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre la fragmentación del DNA ha sido observado en espermatozoides humanos³³. Para los espermatozoides equinos, el daño en el ADN puede ser bloqueado igualmente por la presencia de la CAT, y por la presencia de glutatión reducido (GSH), pero no por la presencia de SOD, lo cual reitera que el peróxido de hidrógeno es la principal ERO responsable del daño en el ADN de estas células³⁴.

Los antioxidantes pueden retardar la peroxidación, aunque nunca la detienen completamente³⁵. Resultados han demostrado que el DL- α -tocopherol succinato es efectivo en la prevención de la peroxidación lipídica durante períodos cortos de incubación³⁶. Otros hallazgos muestran que el ácido ascórbico ejerce un efecto protector en la integridad de la membrana espermática en semen equino diluido³⁷; sin embargo, se observó que no mejora signi-

ficativamente el mantenimiento de la movilidad espermática³⁸. La combinación de diferentes moléculas con acción antioxidante podría conducir a un efecto sinérgico, como es el caso de la combinación entre la vitamina E, la vitamina C y el selenio, la cual desintoxica los lípidos de los peróxidos³⁹.

La criopreservación de semen equino y su relación con el estrés oxidativo

Existen varias metodologías para la criopreservación del semen, las cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de temperatura, en las concentraciones de los crioprotectores utilizados, y en los soportes de almacenamiento empleados. Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de criopreservación, como son el glicerol, el dimeilsulfóxido, el etilenglicol y la dimetilformamida, entre otros⁴⁰⁻⁴².

La metodología más utilizada para la conservación de semen equino es posiblemente la refrigeración a 4°C. Esta técnica produce una reducción en la tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia. Sin embargo, el semen solo puede ser almacenado durante pocas horas, dada la rápida reducción de su fertilidad⁴³, la cual depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática, al daño causado por los cambios de temperatura y el choque térmico⁴⁴.

La congelación de semen y su almacenamiento en nitrógeno líquido permiten su conservación por largos períodos de tiempo, alcanzando tasas de fertilidad posteriores al proceso, del 60% al 70% en las especies bovina y canina⁴⁵. Para el caso del semen equino, es aún limitado el uso amplio y efectivo de semen congelado, principalmente por su asociación con la baja fertilidad, y por la inconsistencia en los resultados obtenidos. Como es conocido, el semen equino es extremadamente sensible a las alteraciones celulares generadas por la congelación, al estrés osmótico resultado de la exposición a medios hipertónicos y, adicionalmente, a los cambios osmóticos inducidos durante el proceso^{46, 47}. El estrés osmótico ha sido relacionado con efectos adversos sobre la movilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides equinos, lo

cual podría estar asociado con el estrés oxidativo^{48, 49}, debido a que el estrés osmótico, tanto en condiciones hipotónicas como hipertónicas, puede incrementar la producción de anión superóxido en el semen equino⁵⁰. Investigadores asociaron la criopreservación con la presentación de cambios celulares relacionados con la apoptosis en los espermatozoides equinos, al evidenciar estos cambios significativos en el porcentaje de caspasas activas, en la actividad mitocondrial, en la permeabilidad de la membrana plasmática, en la movilidad total, y en la movilidad progresiva⁵¹. Diferentes marcadores de apoptosis pueden ser usados para predecir la resistencia a la congelación de los espermatozoides equinos; entre estos, la actividad mitocondrial evaluada por JC-1 tiene el máximo poder de diagnóstico⁵².

En la criopreservación del semen equino, otro aspecto importante es el daño que ocurre en las mitocondrias del espermatozoide. Al evaluar la morfología espermática después de la congelación y la descongelación, se encuentra un moderado hinchamiento de la pieza media que representa una distensión de las mitocondrias, sugiriendo que estas organelas son un sitio con un criodaño significativo⁵³. También se han reportado cambios similares a los que ocurren en la capacitación en los espermatozoides criopreservados, en un proceso denominado "criocapacitación"⁵⁴, que se puede generar por la pérdida de lípidos de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación, así como por la pérdida de factores descapacitantes por la remoción del plasma seminal⁵⁵.

Los protocolos de congelación rápida y ultrarrápida previenen la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de la célula, por su exposición a altas concentraciones de crioprotectores permeables (4 a 6 mol/L) y azúcares. La congelación rápida involucra un enfriamiento rápido por la exposición de las células a vapores de nitrógeno líquido, mientras la congelación ultrarrápida requiere sumergirlas directamente en nitrógeno líquido, para un enfriamiento ultrarrápido⁵⁶. La vitrificación corresponde a una técnica de criopreservación ultrarrápida, que desencadena la formación de un estado vítreo similar al cristal, sin presencia alguna de cristales de hielo intracelular y extracelular, disminuyendo así el daño de las

células^{57, 58}. Las ventajas de la vitrificación son grandes respecto a los métodos tradicionales de congelación, por sus menores costos en equipos, su sencillez, y la disminución del tiempo de exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, presenta como dificultades, los efectos nocivos del choque osmótico por el uso de soluciones hipertónicas, los efectos tóxicos causados por la naturaleza química y las altas concentraciones de crioprotectores, y las alteraciones celulares relacionadas con la exposición a bajas temperaturas⁵⁹. Nuevas técnicas de vitrificación de espermatozoides sin crioprotectores, realizadas mediante la exposición directa de estas células al nitrógeno líquido en soportes especiales, han logrado preservar su habilidad para la fertilización, con tasas de movilidad 2,87 veces mayores que en procesos de vitrificación convencional⁶⁰⁻⁶².

El incremento en la generación de ERO, causado por los procesos de congelación y descongelación del semen, es posiblemente el principal factor relacionado con la baja fertilidad del semen equino congelado. En el material germinal criopreservado el número de células con cambios asociados a la apoptosis aumenta en comparación con el semen fresco; dichas células generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, lo cual posee el potencial para desacoplar el metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides, conduciendo a que estos se vean sometidos a estrés oxidativo⁶³⁻⁶⁵.

No solo el incremento en la generación de ERO se ha asociado al estrés oxidativo del semen; también se sugiere que los procesos de congelación convencional conducen a la pérdida de la actividad de defensa antioxidante, principalmente a causa del daño estructural del citoesqueleto, y de la alteración de las enzimas antioxidantes. Por estas razones, se considera que la congelación y especialmente la descongelación del semen son intrínsecamente nocivas^{66, 67}. La remoción del plasma seminal durante la criopreservación favorece el estrés oxidativo del semen equino, toda vez que la mayoría de su capacidad antioxidante se encuentra allí⁶⁸, de manera que las técnicas estándar de criopreservación producen un descenso en las actividades de CAT y GPx. Otros investigadores evidenciaron que la congelación no afecta la actividad enzimática residual

en el diluyente, por lo cual se sugiere la adición de enzimas antioxidantes a las soluciones empleadas en la dilución del semen equino para su posterior congelación⁶⁹. Autores reportan una relación negativa entre la calidad del semen post-descongelación y la concentración de mieloperoxidasa, una enzima pro-oxidante que puede ser liberada por los neutrófilos presentes en el semen^{70, 71}.

Otro factor asociado con la pérdida de la movilidad, viabilidad, y capacidad para la fertilización de los espermatozoides es el incremento en la peroxidación de los lípidos después de la criopreservación⁷²⁻⁷⁴. Dicha alteración ocurre a nivel en las membranas: plasmática, acrosomal, mitocondrial y de la vaina del axonema, provocando una reducción en su fluidez e integridad.

Adicionalmente, el estrés oxidativo en los espermatozoides produce fragmentación de las cadenas de ADN, y el cambio de sus bases nitrogenadas⁷⁵⁻⁷⁸. En un estudio reciente, investigadores encontraron una correlación negativa entre la capacidad antioxidante total del plasma seminal, y la fragmentación del ADN de los espermatozoides equinos⁷⁹. Las ERO producen un incremento dosis-dependiente del daño del ADN⁸⁰. Durante la refrigeración y la congelación del semen equino también se ha observado un incremento en el daño del ADN.

El uso de antioxidantes en la criopreservación de semen equino

Son escasos los hallazgos prometedores sobre el mantenimiento de la fertilidad del semen equino con antioxidantes, principalmente cuando están involucrados procedimientos de refrigeración o congelación convencional. En una investigación de Ball et al.⁸¹ se utilizaron antioxidantes como α -tocoferol, Trolox®, ácido ascórbico, albúmina sérica bovina, y el antioxidante sintético Tempo, y no se encontraron resultados positivos en el mantenimiento de la movilidad durante la criopreservación, mientras que la utilización del Butilhidroxitolueno (BHT) redujo significativamente la movilidad progresiva. De acuerdo con Aurich et al.⁸² la adición de ácido ascórbico tiene un efecto positivo sobre la preservación de la integridad de la membrana en el semen equino congelado, lo cual no

contrasta con lo presentado por Ball et al.⁸³, dado que el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática no necesariamente está asociado con una mayor movilidad.

Respecto al uso de α -tocoferol en la refrigeración de semen equino a 5°C, investigadores concluyeron que tampoco reduce la peroxidación lipídica⁸⁴, confirmando la poca efectividad de esta molécula en la preservación de la integridad estructural de los espermatozoides equinos criopreservados. Baumber et al.⁸⁵ encontraron que la adición de antioxidantes como α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión reducido, o enzimas como CAT y SOD a los diluyentes para criopreservación, no mejora la movilidad espermática, la fragmentación del ADN, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides equinos descongelados, y confirman, para el caso del α -tocoferol y el ácido ascórbico, lo evidenciado por Ball et al.⁸⁶. Respecto a la CAT, Aurich et al.⁸⁷ encontraron que adicionalmente esta enzima disminuye la movilidad progresiva de los espermatozoides equinos, y en una investigación reciente se reporta que la adición de SOD a los diluyentes tiene un efecto positivo sobre la movilidad progresiva y, por lo tanto, mejora la calidad del semen equino congelado⁸⁸, lo cual, siendo contrario a lo reportado por Baumber et al.⁸⁹, podría estar explicado por la acción fundamental de esta enzima en la neutralización de la ERO con mayor presencia en el semen equino, el anión superóxido.

Conclusiones

Durante las últimas décadas los avances en el mejoramiento de la fertilidad del semen equino criopreservado han sido poco significativos. A pesar de la intensa investigación adelantada en este sentido, tan solo se ha logrado proteger parcialmente la integridad de los espermatozoides de los diferentes tipos de estrés involucrados en el proceso, lo cual se ha visto poco reflejado sobre el porcentaje de movilidad como el principal indicador de la fertilidad potencial. El estrés oxidativo ha demostrado ser altamente relevante en la generación de diversas alteraciones en las células espermáticas sometidas a la criopreservación. Sin embargo, persiste como vacío fundamental encontrar los suplementos o procedimientos que conduzcan

a la mitigación de dicho estrés, propiciando el logro de altos niveles de fertilidad potencial en el semen equino criopreservado.

Referencias bibliográficas

1. BAILEY, J.; BILODEAU, J. & CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. En: J. Androl. 2000. Vol. 21, N° 1, p. 1-7.
2. BALL, B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. En: Anim. Reprod. Sci. 2008. Vol. 107, N° 3-4, p. 257-267.
3. CHI, H., *et al.* Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. En: Hum. Reprod. 2008. Vol. 23, N° 5, p. 1023-1028.
4. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
5. MEMBRILLO, A.; *et al.* Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. INCI. 2003. Vol. 28, N° 12, p. 699-704.
6. SABEUR, K. & BALL, B. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. En: Am. J. Vet. Res. 2006. Vol. 67, N° 4, p. 701-706.
7. SABEUR, K. y BALL, B. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. En: Reproduction. 2007. Vol. 134, p. 263-270.
8. BAUMBER, J.; *et al.* The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. En: J. Androl. 2000. Vol. 21, N° 6, p. 895-902.
9. BURNAUGH, L.; SABEUR, K. & BALL, B. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. En: Theriogenology. 2007. Vol. 67, N° 3, p. 580-589.
10. AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. En: Anim. Reprod. Sci. 2005. Vol. 89, N° 1-4, p. 65-75.
11. MEMBRILLO, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 3.
12. AURICH, J.; *et al.* Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. En: Theriogenology. 1997. Vol. 48, N° 2, p. 185-192.
13. SANOCKA, D. & KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004. Vol. 2, p. 1-18.

14. AITKEN, R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. En: *Reprod. Fertil. Dev.* 1995. Vol. 7, N° 4, p. 659-668.
15. NEILD, D.; *et al.* Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. En: *Mol. Reprod. Dev.* 2005. Vol. 72, N° 2, p. 230-238.
16. BALL, B.; *et al.* Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. En: *Theriogenology.* 2001a. Vol. 56, N° 4, p. 577-589.
17. OGBUEWA, I.; *et al.* Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. En: *J. Vet. Sci.* 2010. Vol.3, N° 3, p.138-164.
18. BAUMBER, J.; *et al.* Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. En: *Theriogenology.* 2002. Vol. 57, p. 1025-1033.
19. BAKER, H.; *et al.* Protective effect of antioxidant on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. En: *Fertil. Steril.* 1996. Vol. 54, N° 2, p. 211-212.
20. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
21. MORTE, M.; *et al.* The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. En: *Reprod. Sci.* 2008. Vol.106, N°1-2, p. 36-47.
22. MEMBRILLO, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
23. KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B. & LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. En: *Vet. J.* 2008. Vol. 177, N° 2, p. 178-191.
24. BECKMAN, K. & AMES, B. The Free Radical Theory of Aging Matures. En: *Physiological Reviews.* 1998. Vol. 78, N° 2, p. 547-581.
25. ROJANO, B.; GAVIRIA, C. y SÁEZ, J. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. En: *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 2008b. Vol. 15, N° 2, p. 212-218.
26. BALL, B.; *et al.* Catalase activity in equine semen. En: *Am. J. Vet. Res.* 2000. Vol. 61, N°9, p. 1026-1030.
27. BAUMBER, J. & BALL, B. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. En: *Am. J. Vet. Res.* 2005. Vol. 66, N°8, p. 1415-1419.
28. BALL, B.; *et al.* *Op. cit.*, p. 7.
29. BALL, B.; VO, A. & BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. En: *Am. J. Vet. Res.* 2001b. Vol.62, N° 4, p. 508-515.
30. MEMBRILLO, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
31. KANKOFER, M.; *et al.* Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. En: *Theriogenology.* 2005. Vol. 63, N° 5, p. 1354-1365.
32. BAUMBER, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
33. CHI, H.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
34. BAUMBER, J.; *et al.* Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine Spermatozoa. En: *J. Androl.* 2003. Vol. 24, N° 4, p. 621-628.
35. RODRÍGUEZ, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 5.
36. ALMEIDA, J. & BALL, B. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. En: *Anim. Reprod. Sci.* 2005. Vol. 87, N° 3-4, p. 321-337.
37. AURICH, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 5.
38. BALL, B.; *et al.* *Op. cit.*, p. 7.
39. MEMBRILLO, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
40. CHENIER, T.; *et al.* Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. En: *AAEP Proceedings.* 1998. Vol. 44, p. 5-6.
41. MANTOVANI, R.; *et al.* Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. En: *Reprod. Nutr. Dev.* 2002. Vol. 42, N° 3, p. 217-226.
42. MEDEIROS, A.; *et al.* Cryopreservation of stallion sperm using different amides. En: *Theriogenology.* 2002. Vol. 58, p. 273-276.
43. PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. & FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. En: *Theriogenology.* 2004. Vol. 62, N° 8, p. 1498-1517.
44. SÁNCHEZ, R.; CARTAGENA, P. y BERLAND, O. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. En: *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2006. Vol. 17, N° 1, p. 1-7.
45. ÁLAMO, D.; *et al.* Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a

- viable alternative to liquid nitrogen. En: Theriogenology 2005. Vol. 63, N° 1, p. 72-82.
46. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
 47. DEVIREDDY, R.; *et al.* Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. En: Biol. Reprod. 2002. Vol. 66, N° 1, p. 222-231.
 48. BALL, B. & VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. En: J. Androl. 2001. Vol. 22, N° 6, p. 1061-1069.
 49. POMMER, A.; RUTLLANT, J. & MEYERS, S. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. En: Theriogenology. 2002. Vol. 58, N° 7, p.1373-1384.
 50. BURNAUGH, L.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
 51. BRUM, A.; SABEUR, K. y BALL, B. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. En: Theriogenology. 2008. Vol. 69, p. 1041-1055.
 52. ORTEGA-FERRUSOLA, C.; *et al.* Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. En: Anim. Reprod. Sci. 2009. Vol. 114, N° 4, p. 393-403.
 53. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
 54. THOMAS, A.; MEYERS, S. & BALL, B. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. En: Theriogenology. 2006. Vol. 65, N° 8, p. 1531-1550.
 55. BEGLEY, A. & QUINN, P. Decapacitation factors in semen. En: Clin. Reprod. Fétil. 1982. Vol. 1, p. 167-175.
 56. ALBARRACÍN, M. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in Vitro* [tesis de doctorado]. España: Facultad de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.
 57. BAILEY, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 2.
 58. ORIEF, Y.; *et al.* Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? En: Middle East Fertility Society Journal. 2005. Vol. 10, N° 3, p. 171-184.
 59. LOPERA, V.; *et al.* Vitrificación de oocitos bovinos inmaduros por el método de la pajilla abierta y estirada (Open pulled Straw - OPS). En: Rev. Col. Cienc. Pec. 2007. Vol. 20, p. 532-540.
 60. ISACHENKO, V.; *et al.* Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. En: Biol. Reprod. 2004a. Vol. 71, N° 4, p. 1167-1173.
 61. ISACHENKO, V.; *et al.* DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. En: Hum. Reprod. 2004b. Vol. 19, N° 4, p. 932-939.
 62. SAKI, G.; RAHIM, F. y ZERGANI, M. Vitrification of small volume of normal human sperms: use of open pulled straw carrier. En: J. Med. Sci. 2009. Vol. 9, N° 1, p. 30-35.
 63. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
 64. PEIROUVI, T.; *et al.* Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. En: Iranian J. Reprod. Med. 2007. Vol. 5, N° 3, p. 117-120.
 65. ANZAR, M.; *et al.* Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. En: Biol. Reprod. 2002. Vol. 66, N° 2, p. 354-360.
 66. ISACHENKO, V.; *et al.* 2004a; *Op. cit.*, p. 11.
 67. ISACHENKO, V.; *et al.* 2004b; *Op. cit.*, p. 11.
 68. BALL, B.; *Op. cit.*, p. 2.
 69. BUSTAMANTE, I.; *et al.* Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. En: Anim. Reprod. 2009. Vol. 6, N° 2, p. 392-399.
 70. LINFOR, J. & MEYERS, S. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. En: J. Androl. 2002. Vol. 23, N° 1, p. 107-113.
 71. PONTHER, J.; *et al.* Equine frozen semen parameters in relation with total myeloperoxidase concentration. En: Anim. Reprod. Sci. 2008. Vol. 107, N° 3, p. 341-342.
 72. AURICH, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 5.
 73. BAUMBER, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 8.
 74. ISACHENKO, V.; *et al.* 2004a; *Op. cit.*, p. 11.
 75. BALL, B.; *et al.* 2001b. *Op. cit.*, p. 7.
 76. BALL, B.; *et al.* 2001a. *Op. cit.*, p. 5.
 77. BAUMBER, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 4.
 78. BAUMBER, J.; *et al.* *Op. cit.*, p. 8.
 79. WNUK, M.; *et al.* Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude

- of DNA damage in sperm cells. En: Theriogenology. 2010. Vol. 74, N° 9, p.1677-1684.
80. BAUMBER, J.; *et al.* Op. cit., p. 8.
81. BALL, B.; Op. cit., p. 2.
82. AURICH, J.; *et al.* Op. cit., p. 5.
83. BALL, B.; Op. cit., p. 2.
84. BALL, B. & VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁-BODIPY581/591. En: J. Androl. 2002. Vol. 23, N° 2, p. 259-269.
85. BAUMBER, J; BALL, B & LINFOR, J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. En: Am. J. Vet. Res. 2005. Vol. 66, N° 5, p. 772-779.
86. BALL, B.; Op. cit., p. 2.
87. AURICH, J.; *et al.* Op. cit., p. 5.
88. COCCHIAA, N.; *et al.* Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. En: Theriogenology. 2011. Vol. 75, p. 1201-1210.
89. BAUMBER, J.; *et al.* Op. cit., p. 12.