



Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos[¶]

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Effect of centrifugation on plasma membrane and DNA of bovine spermatozoa

Efeito da centrifugação sobre a membrana plasmática e o DNA de espermatozóides bovinos

Rodrigo Urrego^{1,2*}, Zoot, MS; Andrea Ríos¹, Zoot; Martha Olivera Ángel³, MV, Dr. Sci. Agr; Omar Camargo^{1,3}, MVZ, MS.

¹Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

²Grupo INCA-CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES, Medellín, Colombia.

³Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(Recibido: 5 septiembre, 2007; aceptado: 21 febrero, 2008)

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar si la integridad de la membrana plasmática y el ADN de los espermatozoides pueden ser afectados por la centrifugación realizada en el proceso de lavado y selección. Los espermatozoides fueron sometidos a diferentes tiempos de centrifugación (10, 30 y 45 min); se utilizó un control negativo con espermatozoides no centrifugados y un control positivo con espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (200 µM). Para evaluar la integridad de la membrana se utilizó la prueba hipoosmótica (HOST) y para evaluar la fragmentación del ADN se utilizó el ensayo cometa. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Fisher. La centrifugación durante 10, 30 y 45 min, presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el daño en el ADN, respecto de los espermatozoides no centrifugados (p<0.05). Además, se observó diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los espermatozoides centrifugados a diferentes tiempos con respecto al control positivo realizado con H₂O₂ (200 µM). La comparación de medias no indicó diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados y los centrifugados por un periodo de 10 y 30 min (p>0.05) en la reacción positiva a la prueba HOST, lo cual sí sucedió (p<0.05) al comparar los no centrifugados y los centrifugados por 45 min. El control positivo realizado con H₂O₂ presentó diferencia significativa (p<0.05) con el resto de los tratamientos. En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que la centrifugación de los espermatozoides durante 10, 30 ó 45 min a 700 x g para la realización del gradiente diferencial de Percoll, tiene un efecto deletéreo sobre el ADN de los espermatozoides bovinos y que la centrifugación por 45 min además de causar daño en el ADN produce pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

Palabras clave: *espermatozoides bovinos, fragmentación de ADN, integridad de la membrana*

[¶] Para citar este artículo: Urrego R, Ríos A, Olivera Ángel M, Camargo O. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. Rev Colomb Cienc Pecu 2008; 21:19-26.

* Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de separatas: Grupo INCA-CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES, Medellín, Colombia. E-mail: rurrego@ces.edu.co

Summary

The aim of this study was to evaluate the effects of different times of centrifugation on plasma membrane integrity and DNA of bovine sperm cells, by means of the hyposmotic test (HOST) and the comet assay, respectively. The sperm cells were centrifuged at 700 x g for 10, 30 or 45 min. No-centrifuged thawed semen served as negative control whereas hydrogen peroxide (H_2O_2) (200 mM) treated sperm cells were used as a positive control. The results indicate that while the integrity of the plasma membrane was not affected by centrifugation, bovine sperm DNA was damaged independently of centrifugation times. Significant differences between negative control and treatments were found ($p < 0.05$) and in the same way, between treatments and positive control, where the damage for oxidative stress was greater. These results indicate that centrifugation could be detrimental for *in vitro* bovine embryo production. Additionally, some grade of DNA fragmentation in not centrifuged sperm cells (negative control) was registered, suggesting that DNA of bovine sperm cells could be affected by other factors, probably freezing procedure.

Key words: bovine spermatozoa, DNA fragmentation, membrane integrity

Resumo

O objetivo de este estudo foi determinar se a integridade da membrana plasmática e o DNA dos espermatozoides podem ser afetados pela centrifugação realizada no processo de lavado e seleção. Os espermatozoides foram submetidos a diferentes tempos de centrifugação (10, 30 e 45 min); foi utilizado um controle negativo com espermatozoides não centrifugados e um controle positivo com espermatozoides submetidos a estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (200 μ M). Para avaliar a integridade da membrana foi utilizado o teste hipoosmótica (HOST) e para avaliar a fragmentação do DNA foi utilizado o ensaio cometa. A análise estatística se realizou mediante o teste de Fisher. A centrifugação durante 10, 30 e 45 min, apresentou um efeito estatisticamente significativo sobre o dano no DNA, em relação aos espermatozoides não centrifugados ($p < 0.05$). Além disto, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os espermatozoides centrifugados a diferentes tempos em relação ao controle positivo realizado com H_2O_2 (200 μ M). A comparação de médias não detectou diferença estatisticamente significativa entre os espermatozoides não centrifugados e os centrifugados por um período de 10 e 30 min ($p > 0.05$) na reação positiva à prova HOST, o qual ocorreu ao comparar os não centrifugados e os centrifugados por 45 min ($p < 0,05$). O controle positivo realizado com H_2O_2 apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado contra os outros tratamentos. Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem que a centrifugação dos espermatozoides durante 10, 30 ou 45 min a 700 x g para realização do gradiente diferencial de percoll, têm um efeito deletério sobre o DNA dos espermatozoides bovinos e que a centrifugação por 45 min além de causar dano no DNA produz perda da integridade da membrana plasmática.

Palavras chave: espermatozoides bovinos, fragmentação do DNA, integridade da membrana

Introducción

En la fertilización *in vitro* (FIV) bovina generalmente se utiliza semen de alta calidad que ha sido previamente congelado, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en el que los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes y crioprotectores y de otras estructuras, por medio de técnicas como el “swim-up” y el gradiente de Percoll (12, 18, 28). Estas técnicas requieren como mínimo una centrifugación, paso fundamental en el lavado y selección de los espermatozoides, en el que se puede generar daño a la membrana plasmática de

los gametos masculinos (1, 30, 31) y aumentar la producción basal de especies reactivas de oxígeno (ROs, del inglés *Reactive oxygen species*) (1, 23, 39). Las ROs son especies químicas – moléculas o átomos, que contienen electrones desapareados en su orbital más externo lo que les confiere una reactividad química que los induce a interactuar rápidamente con otras moléculas (15, 16). Los mayores metabolitos del oxígeno producidos por la reducción de uno de sus electrones son: el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y la particular forma reducida del oxígeno, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Las ROs son capaces de reaccionar indiscriminadamente con cualquier molécula con la que tengan contacto, le

extraen electrones y generan nuevos radicales libres citotóxicos (5).

Las ROs tienen un efecto dual sobre las células espermáticas, ya que fisiológicamente son requeridas para los procesos de capacitación y reacción acrosómica (25), pero también, sus altas concentraciones inducen a una pérdida de la función espermática, entendida como la anulación de los cambios y funciones que son necesarias y suficientes para permitir la fertilización del oocito (9, 10). En la membrana plasmática de los espermatozoides, el radical hidroxilo inicia la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las cadenas laterales de las membranas en un proceso conocido como la peroxidación lipídica. Debido a que cada ácido graso que padece la peroxidación genera un radical con el potencial para producir peroxidación en otro ácido graso, este fenómeno considerado altamente deletéreo se traduce estructuralmente en una disminución de la fluidez de la membrana y funcionalmente en una reducción de la capacidad de la célula espermática para llevar a cabo la fertilización (6, 13, 19).

La prueba hipoosmótica –HOST, es una técnica desarrollada para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides; su principio consiste en que al someter los espermatozoides a condiciones hipo-osmóticas, los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener la dinámica del equilibrio entre los líquidos de su compartimiento interno y el entorno extracelular. Esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal de la membrana y la actividad funcional de la misma, requisito indispensable para que se de la reacción acrosómica durante el proceso de fertilización (8).

La integridad del ADN espermático también es afectada por la alta concentración de las ROs, las cuales de una manera dependiente de la dosis, pueden generar un aumento significativo en la fragmentación del ADN y una pérdida severa de la movilidad (13, 29, 33). El OH• juega un papel determinante en el daño infringido al ADN, ya que éste puede alterar la estructura de las purinas y

pirimidinas en las cadenas de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) y generar además quiebres en las cadenas de polinucleótidos, alterando de esta forma la información genética. Se conoce alrededor de veinte lesiones generadas por la reacción del OH• con el ADN (21).

La electroforesis en gel de una sola célula o “ensayo cometa” es una técnica rápida, simple, visual y sensible, para medir y analizar quiebres de ADN en células de mamífero (26, 27, 35); ha sido adaptada para medir quiebres en el ADN de las células espermáticas y aunque el procedimiento varía de laboratorio a laboratorio, este se ha basado principalmente en los siguientes pasos: la preparación de una solución espermática, la puesta en un gel, la lisis celular, la desnaturalización del ADN, la electroforesis, la neutralización, la tinción del ADN, y el análisis de las imágenes (34). Por su alta sensibilidad el ensayo cometa se ha venido utilizando ampliamente para evaluar la integridad del ADN de las células espermáticas sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si la integridad de la membrana plasmática y el ADN de los espermatozoides bovinos pueden ser afectados por el proceso de lavado y selección espermática.

Materiales y métodos

Preparación del semen

Para este trabajo se utilizaron pajillas de semen congelado de 0.5 ml provenientes de un sólo toro de la raza holstein. Las pajillas de semen fueron descongeladas a 35 °C/1 min. Después de descongelar, el semen fue sometido de inmediato a uno de los tres tratamientos: 1) espermatozoides lavados y seleccionados mediante un método que utiliza la centrifugación, 2) espermatozoides seleccionados y lavados mediante un método sin centrifugación, y 3) un control positivo, realizado con espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con H₂O₂ (200 µM).

Gradiente diferencial de Percoll (centrifugación)

En la técnica de Percoll, 200 µl de la muestra de semen previamente descongelado fueron puestos sobre el gradiente de Percoll que contenía

1 ml de Percoll con un gradiente de densidad de 45 y 90%. Se llevó a cabo la centrifugación a 700 x g/10 min/temperatura ambiente. Después de remover el sobrenadante, los espermatozoides fueron resuspendidos en medio FIV-TALP y la concentración celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/ml.

Método de swim up

Para el procedimiento de *jumping*, igualmente se tomaron 200 μ l de la muestra de semen descongelado y se depositó en el fondo de la copa la cual había sido llenada con 1 ml de medio Sperm-Talp previamente incubado por un periodo mínimo de 2 horas; la muestra fue incubada a 37 °C, 5% de CO₂ y 99% de humedad relativa/1 h. La parte superior del sobrenadante fue recuperada y resuspendida en medio FIV-TALP y llevada a una concentración de 1×10^6 células/ml. Una parte de la fragmentación espermática recuperada fue mezclada con H₂O₂ a una concentración final de 200 μ M como control positivo.

Ensayo cometa

Para evaluar el efecto de la centrifugación sobre el ADN de las células espermáticas mediante el ensayo cometa, se utilizó el protocolo propuesto por Shen y Ong (34): de cada tratamiento se utilizaron con 5×10^5 espermatozoides/ml suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (en PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) en portaobjetos pretratados con 100 μ l de agarosa de punto de fusión normal al 0.5% (en PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). Después de incubación 10 min/temperatura ambiente, los portaobjetos fueron colocados en solución de lisis I (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Triton X 100) a un pH = 10.0, a 4 °C/4 h; posteriormente, las placas fueron pasadas a solución de lisis II (2.5M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 200 μ g/ml de proteinasa K y 300 mM de DTT) a un pH = 7.4, a 37.5 °C/18 h. Terminada la lisis II, las placas fueron incubadas en tampón de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a un pH = 13.0 a 4 °C/10 min, en cuarto oscuro. Luego se realizó el corrido electroforético a 25 V y 100 mA/10 min. El siguiente paso fue lavar las láminas portaobjetos

con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCL; pH 7.5) y deshidratarlas con metanol puro; una vez secas se tiñeron con 40 μ l de Bromuro de etidio (20 μ g/ml). Finalmente, los portaobjetos fueron visualizados en un microscopio Axiolab-Zeiss provisto de un sistema de fluorescencia y equipado con una cámara CCD SONY (DSC-S85 de 4.1 mega pixeles), con un aumento de 200X. Las imágenes de 50 cometas seleccionados aleatoriamente fueron analizadas con un software analizador de imágenes (Comet Score) proporcionado gratuitamente en Internet por la empresa TriTek-Corp. La variable para cuantificar el daño en el ADN fue el “momento de Olive (OTM).

Prueba hipoosmótica

Para evaluar el efecto de la centrifugación sobre la membrana de las células espermáticas mediante la prueba HOST, se utilizó el protocolo propuesto por Correa y Zavos (8) para espermatozoides bovinos. Debido a que los azúcares y los electrolitos mantienen la integridad funcional de los espermatozoides, se preparó una solución compuestas por un azúcar (fructosa) y un electrolito (citrato de sodio) en agua pura (Milli Q-UF). La osmolaridad de la solución fue 100 mOsmol/l verificada con osmómetro. Se hizo una adición y mezcla de 100 μ l de la muestra que contenía los espermatozoides con 500 μ l de la solución hipoosmótica. La mezcla fue incubada a 38.5 °C/30 min. Posteriormente, se evaluó la reacción hipoosmótica espermática colocando una gota de la muestra bien mezclada sobre un portaobjetos, que fue cubierto con un cubreobjetos y observado bajo microscopio a 400X. Se contaron un total aproximado de 200 células espermáticas, considerando como positivos a la prueba HOST los espermatozoides que presentaran doblez o hinchazón en sus piezas medias o enrollamiento de sus piezas principales. El porcentaje de espermatozoides reaccionados se calculó con el número de células que reaccionaron al HOST sobre el número total de espermatozoides contados en la misma placa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se efectuó por análisis de varianza y las correspondientes pruebas de medias (Duncan). Las pruebas se realizaron

utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus, versión 4.1.

Resultados

En las figuras 1 y 2 se muestra el efecto de la centrifugación sobre el ADN de las células espermáticas. Entre los espermatozoides seleccionados con centrifugación y los seleccionados sin centrifugación no hubo diferencia estadística

significativa, pero entre estos dos tratamientos y el H₂O₂ si hubo diferencia estadística significativa (p<0.05). En la figura 3 se muestra el efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática de los espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos. Igualmente, se observa que no hubo diferencia estadística significativa (p>0.05) entre los espermatozoides centrifugados y los no centrifugados, pero sí la hubo cuando se compararon estos con el control positivo realizado con H₂O₂.

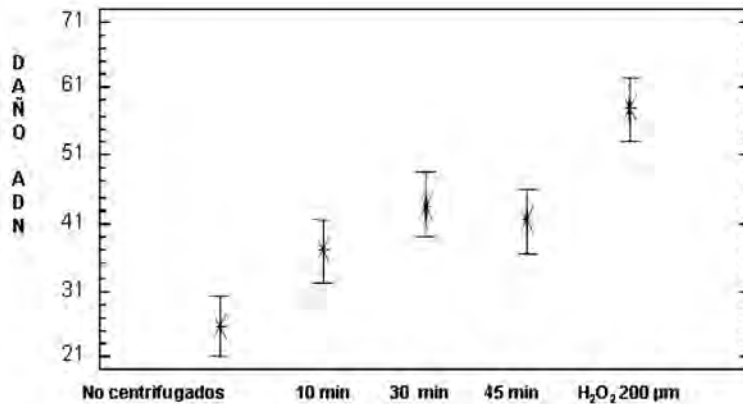


Figura 1. Efecto de la centrifugación sobre la fragmentación del ADN. Comparación de las medias para el momento de Olive. Se observó diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados con respecto a los que fueron centrifugados por 10, 30 y 45 min (p<0.05). Además, se observó diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los espermatozoides centrifugados a diferentes tiempos con respecto al control positivo realizado con H₂O₂ (200 µm).

Discusión

El factor masculino como causante de las pérdidas gestacionales tempranas, particularmente en los casos de muerte embrionaria, ha sido poco estudiado. Los recientes hallazgos en la biología de la reproducción han mejorado tanto la comprensión fisiológica del espermatozoide como

los mecanismos para llevar a cabo la fertilización y estos nuevos hallazgos han llevado a la elaboración de pruebas de fertilidad masculina basadas sobre la integridad del genoma y de la membrana celular espermática (19, 32). El mantenimiento de la integridad del ADN espermático es crucial para la salud de las nuevas generaciones (3, 14).



Figura 2. Resultados obtenidos mediante la técnica cometa. Microfotografía que muestra el patrón de migración del ADN de espermatozoides bovinos: A, espermatozoides que no fueron sometidos a centrifugación; B, espermatozoides sometidos a centrifugación; y C, espermatozoides sometidos a H₂O₂ (200 mM).

El ADN de los espermatozoides es seis veces más compacto y posee un volumen 40 veces menor al ADN de una célula somática (40). Esta compactación es el resultado de las uniones disulfuro entre el ADN y las protaminas, las cuales constituyen aproximadamente el 85% de las proteínas unidas al ADN, mientras que las proteínas histonas representan alrededor del 15% (38). Este empaquetamiento tiene diferentes funciones: 1) reducir el volumen de la célula espermática para facilitar su viaje por el tracto genital femenino, 2) minimizar el daño por agentes exógenos antes de la fertilización, y 3) conservar el genoma transcripcionalmente inactivo. Adicionalmente, los espermatozoides están inmersos en un líquido que contiene altos niveles de antioxidantes. Pero a pesar de estos mecanismos de protección el daño tanto en el ADN como en la membrana plasmática de las células espermáticas puede ocurrir en tres puntos críticos: en los procesos de formación, en los procesos de maduración espermática (34), o en los procedimientos de preparación espermática realizados en diversas biotecnologías de reproducción asistida. Una alta proporción de espermatozoides con daño en el ADN o en la membrana plasmática quizás pueda ser una causa de infertilidad (36).

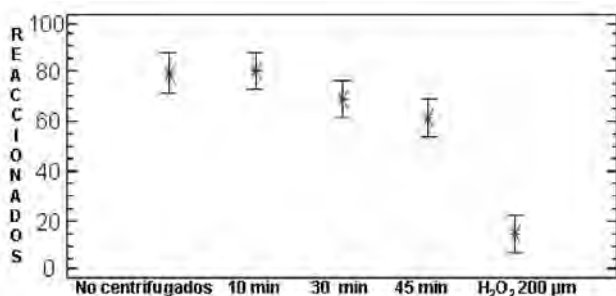


Figura 3. Efecto de la centrifugación sobre la integridad de la membrana plasmática. Comparación de medias para los espermatozoides que reaccionaron (positivos) a la prueba HOS. No se observó diferencia estadística significativa entre los espermatozoides no centrifugados y los centrifugados por un periodo de 10 y 30 min. ($p > 0.05$). Se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los no centrifugados y los centrifugados por un periodo de 45 min. El control positivo realizado con H_2O_2 presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con el resto de los tratamientos.

En el presente estudio se compararon dos técnicas para la preparación y selección de los espermatozoides: el convencional gradiente de Percoll, en el que se hace una centrifugación de los espermatozoides; y el *swim up*, en el que se

omite la centrifugación de los espermatozoides. La centrifugación en la preparación de los espermatozoides ha mostrado que puede causar daño a la célula espermática mediante mecanismos que están mediados por un potenciamiento en la producción de ROs, los cuales pueden generar daño tanto en el ADN como en la membrana plasmática (1). En los resultados arrojados por este estudio se muestra que hay diferencia estadística significativa en cuanto a daño en el ADN de células espermáticas evaluado por ensayo cometa entre los espermatozoides centrifugados a 10, 30 y 45 min y los no se centrifugados.

De otro lado, se halló diferencia estadística significativa en cuanto al daño en membrana plasmática evaluado por prueba HOST entre los espermatozoides centrifugados por 45 min con respecto a los no centrifugados, pero no hubo diferencia significativa entre los no centrifugados y los centrifugados por 10 y 30 min. El control positivo realizado con H_2O_2 a una concentración final de 200 µM causó daño significativo tanto al ADN como a la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos.

Los resultados de este estudio sugieren que las condiciones de centrifugación bajo la cual se hizo la selección de los espermatozoides tienen un efecto deletéreo sobre el ADN de las células espermáticas, lo que coincide con los reportes en donde se evidencia que las ROs pueden afectar la integridad del ADN de las células espermáticas. La generación de ROs inducida por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y xantina/xantina oxidasa o por adición directa de H_2O_2 a los espermatozoides puede causar un aumento significativo en la fragmentación del ADN espermático (2, 3, 20) como se observa en las figuras 1 y 2.

La membrana plasmática de los espermatozoides bovinos tiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales pueden padecer peroxidación lipídica iniciada por las ROs, particularmente el H_2O_2 . El daño por peroxidación lipídica conlleva a una pérdida de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (37) lo

cual se ve reflejado en la figura 3 cuando a las células espermáticas se someten a estrés oxidativo con H_2O_2 y a un extenso periodo de centrifugación de 45 min. Además, estudios recientes también muestran que los ROs pueden afectar la integridad del ADN de las células espermáticas (3, 4). La generación de ROs inducida por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y xanatina/xantina oxidasa o por adición directa a los espermatozoides, puede causar un aumento significativo en la fragmentación del ADN espermático como se observa en la figura 3, en donde la adición de H_2O_2 (200 mM) produjo una alta fragmentación de las células espermáticas. Aunque hubo diferencia estadística significativa en cuanto a daño en ADN entre los espermatozoides centrifugados y no centrifugados con respecto a los espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con H_2O_2 (véase Figura 1). Sin embargo, se observó en los espermatozoides no centrifugados una alta fragmentación (véase Figura 3). Quizás, esta alta fragmentación en el ADN de espermatozoides bovinos que no han sido sometidos a estrés oxidativo con H_2O_2 , sea debida a los procesos de criopreservación. La criopreservación está asociada al estrés oxidativo en espermatozoides de humano (4), de ratón (22) y de bovino (24). Además, el congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides bovinos aumenta la generación de ROs (7), que producen alteraciones en el citoesqueleto (17), inhiben de la fusión espermatoocito (2), afectan el axonema del espermatozoide,

lo cual está asociado con pérdida de movilidad (11) y producen daño en el ADN (20); todo ello concuerda con nuestro estudio como se puede evidenciar en la figura 2.

En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que la centrifugación de los espermatozoides a 700 x g por un tiempo de 10, 30 ó 45 min, para la realización del gradiente diferencial de Percoll, tiene un efecto deletéreo sobre el ADN de los espermatozoides bovinos y que la centrifugación por 45 min además de causar daño en el ADN produce pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Estos resultados también sugieren que la congelación de espermatozoides bovinos genera estrés oxidativo el cual produce daño en el ADN.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigaciones Medellín (DIME) por financiar este trabajo, además a los directores de los laboratorios de Biotecnología Animal y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y a la directora del laboratorio Singamia de la Universidad de Antioquia por prestar sus instalaciones. Los autores también agradecen a la planta de procesamiento de semen de la Universidad Nacional, y en su nombre al profesor Luis Emilio Trujillo, por proporcionar el material seminal.

Referencias

1. Aitken RJ, Clarkson S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-376.
2. Aitken JR, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41:183-197.
3. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg J, Milne P, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59:1037-146.
4. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13:232-241.
5. Barquinero J. Radicales libres: los enemigos más diminutos. En: *System glutation: el eje de la defensa antioxidante*. Excerpta Médica. Ámsterdam; 1992. p. 9-15.
6. Camargo O, Ramírez J, Olivera M. Radicales libres y desarrollo embrionario. *Rev Col Cienc Pec* 1999; 12:108-118.
7. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001; 59:451-458.
8. Correa JR, Zavos PM. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 1994; 42:361-370.
9. Crister JK, Noiles EE. Bioassays of sperm function. *Sem Reprod Endocrinol* 1993; 11:1-16.

10. Cummins JM, Yovich JM. Sperm motility enhancement in vitro. *Sem Reprod Endocrinol* 1993; 11:56-71.
11. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13:368-378.
12. Dode M, Rodovhalo NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci* 2002; 69:15-23.
13. Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74:1200-1207.
14. Evans HJ. Mutation and mutagenesis in inherited and acquired human disease. *Mutation Res* 1996; 351:89-103.
15. Falanga V, Martin TA, Takagi H. Low oxygen tension increases mRNA of alpha (i) procollagen in human dermal fibroblast. *J Cell Physiol* 1993; 157:408-412.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Cambridge: Clarendon; 1996. p.222-281.
17. Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, et al. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol* 1986; 123:454-464.
18. Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2003; 77:33-49.
19. Kuhn H, Astrid B. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:154-157.
20. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential use for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:896-900.
21. Mathews CK, Van Holde KE, Ahen KG. Biochemistry. 3rd ed. Madrid: Addison Wesley Longman; 2000. p.503-560.
22. Mazur P, Katkov I, Katkova N, Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*; 2000 40:187-209.
23. Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin of *in vitro* fertilization of cattle oocyte mature in culture. *Theriogenology* 1988; 30:733-741.
24. O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *J Androl* 1997; 29:269-275.
25. O'Flaherty CM, Beologui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999; 52:29-301.
26. Olive, PL, Banath JB, Durand RE. Detection of etoposide resistance by measuring ADN damage in individual Chinese hamster cells. *J Nat Cancer Inst* 1990; 2:779-783.
27. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced ADN damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Com* 1984; 123:291-298.
28. Parrish JJ, Krogeneas A, Susko-Parrish L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44:859-869.
29. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res* 1995; 447:249-256.
30. Risopatrón J, Sanchez R, Sepulveda N, Peña P, Villagran E, et al. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology* 1996; 46:65-73.
31. Sánchez R, Risopatrón J, Sepulveda G, Peña P, Miška W. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. *Theriogenology* 1995; 45:761-768.
32. Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. Intégrité de l'ADN des spermatozoides comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine (Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male). *Gynécol Obstét Fertil* 2005; 33:89-101.
33. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999; 20:718-723.
34. Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative ADN damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:529-536.
35. Singh PMT, McCoy RR, Tice E, Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of AND damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-191.
36. Singh N, Muller C, Berger R. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80:1420-1430.
37. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of liperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:203-214.
38. Tanphaichitr N, Sobborn P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978; 117:247-256.
39. Twigg J, Irvine D.S, Houston P, Foulton N, Michale L, et al. Iatrogenic ADN damage Induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:439-444.
40. Ward WS, Zalensky AO. The unique complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 1996; 6:139-147.