

ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA. Revisión

Ingrid Tortolero¹, Gabriela Arata-Bellabarba², Jesús Alfonso Osuna³, Roald Gómez³, Javier Regadera⁴.

¹Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia. ²Laboratorio de Neuroendocrinología y Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. ³Unidad de Endocrinología, Hospital Universitario de los Andes, Mérida-Venezuela. ⁴Departamento de Morfología de Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

El estrés oxidativo está determinado por el balance entre la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS - Reactives Species Oxigen) y la degradación de las mismas dentro de los tejidos. Las dos principales fuentes de generación de ROS en el tracto reproductivo masculino provienen de los espermatozoides inmaduros, inmóviles y/o morfológicamente anormales, de los leucocitos infiltrados en el semen y de los espermatozoides morfológicamente normales pero funcionalmente anormales. Uno de los efectos de los ROS es la alteración de la membrana celular por el proceso denominado peroxidación lipídica (PL), proceso fisiopatológico que tiene como resultado una cascada de profundos cambios degradativos que afectan la organización y función de la membrana del espermatozoide humano. Los espermatozoides son más susceptibles al daño peroxidativo de los ROS porque poseen altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados. Los efectos que las ROS ejercen sobre las células espermáticas son múltiples y muy controversiales, por lo que en este artículo se revisan algunos aspectos bioquímicos sobre la generación de ROS, métodos de diagnóstico y patologías asociadas.

Palabras claves: Estrés oxidativo, espermatozoides, antioxidantes, infertilidad masculina.

ABSTRAC

Oxidative stress is determined by the balance between the generation and degradation of reactive oxygen species (ROS) within the tissues. The ROS are produced by a variety of semen components, including immobile or morphologically abnormal spermatozoa, leukocytes, and morphologically normal but functionally abnormal spermatozoa. One the effects of excessive ROS production, is the cellular membrane alteration, due to lipid peroxidation (LPO) which is a very important pathophysiological process occurring in numerous diseases and stress conditions, and it usually results in a cascade of profound degradative processes, affecting the organization and function of biological membranes. The membranes of the human spermatozoon contain a high concentration of polyunsaturated fatty acids, therefore they are susceptible to the lipid peroxidation damage. ROS have a variety of affects on the spermatic cells. This is a very controversial subject, and it is one of the reasons for this article, reviewing some of the biochemical aspects related to ROS production, diagnostic methods, and associated pathologies to these compounds.

Key words: Oxidative stress, spermatozoa, antioxidants, infertility.

El estado de estrés oxidativo refleja un relativo balance entre las especies de oxígeno reactivas (ROS- Reactives Species Oxigen) generados y las ROS removidos. Por eso, una alteración entre la generación de ROS y los mecanismos antioxidantes puede resultar en daño celular. Todas las células vivas están en condiciones normales expuestas a un nivel de estrés oxidativo. En el caso del espermatozoide humano niveles adecuados de ROS son importantes para su funcionamiento normal ^{1,2}. El mismo sufre procesos controlados de oxido-reducción durante: la

hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica¹⁻³. Bajo circunstancias fisiológicas, la actividad redox de los espermatozoides, es mediada por el AMPc y la fosforilación de la tirosina, eventos bioquímicos que están asociados con la capacitación espermática¹⁻³. Además de este papel biológico, el espermatozoide humano también parece sufrir estrés oxidativo, con impacto sobre la normalidad de sus funciones y sobre la integridad de su DNA nuclear y mitocondrial²⁻⁴.

El espermatozoide fue una de las primeras células

Artículo recibido en: Mayo 2005. Aceptado para publicación en: Agosto 2005.

Dirigir correspondencia a: Ingrid Tortolero. ingridtortolero@hotmail.com.

en la cual se demostró la generación de especies reactivas de oxígeno¹. Esta actividad ha sido hasta ahora confirmada en espermatozoides de todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo la rata, el ratón, el conejo, el caballo, el toro y además en los espermatozoides humanos^{1,2}. Recientes estudios²⁻⁵ han contribuido a clarificar la base molecular de la intensa actividad de oxido-reducción observada por el espermatozoide humano defectuoso, la naturaleza de las estructuras subcelulares responsable de esta actividad y los posibles mecanismos por los cuales el estrés oxidativo afecta a estas células. Dada la importancia del efecto oxidativo sobre las células germinales que da origen a la infertilidad en el varón y a una alta tasa de abortos, este campo de la bioquímica espermática requiere especial atención de los especialistas en reproducción humana, a fin de mejorar los métodos para el diagnóstico y prevención de las diferentes patologías asociadas a la infertilidad masculina³⁻¹².

RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

Los ROS son agentes oxidantes altamente reactivos y forman parte de una clase de moléculas conocidas como radicales libres (RL). Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados, que son generados fisiológicamente por una transferencia de un electrón durante el metabolismo celular por ejemplo: en los procesos que generan energía en la mitocondria, donde estas reacciones solamente toman lugar en compartimientos especiales, o en el proceso oxidativo de los leucocitos polimorfonucleares durante el mecanismo de defensa fisiológica^{4,6}.

Los ROS, se producen continuamente en el organismo. Bajo ciertas condiciones, el oxígeno inerte puede inicialmente reaccionar con moléculas orgánicas a través de procesos bioquímicos dando lugar a la formación de ROS, entre los que se encuentran sus intermediarios que son altamente reactivos. Estos se producen durante el metabolismo celular normal y en algunas ocasiones, como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarrillo, hipoxia, exceso de ejercicio, reacción inflamatoria, e isquemia. Los ROS, reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones en cadena que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados. Cada radical libre (RL) formado en el organismo puede iniciar una serie de reacciones en cadena que continúan hasta que los RL sean

eliminados. Los RL tienen una vida media en el rango de nanosegundos a milisegundos y por lo tanto reaccionan con moléculas en su entorno más directo. Estos radicales son: el anión superóxido (O_2^-) radical hidroxilo (OH^\cdot) y el óxido nítrico⁵. Existen otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no son radicales libres pero que actúan fisiológicamente como tal; tienen una vida media más larga y pasan a través de la membrana y no están cargadas eléctricamente. El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los RL^{4,11}. Se conocen tres grupos de antioxidantes: **Antioxidantes Primarios:** que previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que convierte al O_2^- en peróxido de hidrógeno. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Y las proteínas de unión a metales (ej: la ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de Fe^{2+} necesaria para formar el radical OH^\cdot . **Antioxidantes Secundarios:** los cuales capturan los radicales libres, evitando las reacciones en cadena. Entre estos tenemos: la vitamina E (alpha-tocoferol), vitamina C (ascorbato), betacaroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina. **Antioxidantes Terciarios:** que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos tenemos las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa. Cualquier deficiencia en el sistema antioxidante provoca una pérdida de protección de los tejidos frente al ataque de los radicales libres.

ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPERMATOZOIDE

La importancia del estrés oxidativo en la etiología de la infertilidad masculina fue descrita en 1943 por el andrólogo John MacLeod, quién demostró que la adición de catalasa podía mejorar la movilidad del espermatozoide incubado bajo condiciones aeróbicas⁶. Numerosos estudios han demostrado la vulnerabilidad del espermatozoide humano a los RL, sin embargo, no está totalmente esclarecido como es inducido este fenómeno^{8,10,13,14}. Los RL son importantes tanto para explicar la función normal como la patofisiología del espermatozoide humano^{1,2}. El espermatozoide es vulnerable al daño peroxidativo de los RL porque poseen en su membrana plasmática un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados necesaria para mantener la fluidez necesaria en la fusión de membrana durante la

fertilización^{11,12,14}. Niveles altos de RL pueden aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, causando diversas anomalías en la morfología espermática alterando así la fertilidad masculina¹²⁻¹⁸. Un aumento en los niveles de RL sugiere un alto estrés oxidativo y puede inhibir la acción de reacciones enzimáticas reguladoras, tales como la conversión a través de la catalasa de estos RL a agua, o alternativamente una inherente disminución en la expresión de sistemas enzimáticos. En el espermatozoide, muy poco se conoce sobre los sistemas enzimáticos involucrados en la neutralización del estrés oxidativo. Sin embargo, se ha observado la presencia de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa/reductasa^{14,15}. Niveles altos de RL han sido observados entre 44 a 88 % de hombres infértiles¹⁶. Además, hombres con altos niveles de ROS tienen menos probabilidad de tener hijos cuando se compararon con hombres que tienen bajos niveles de ROS^{11,16}.

Los RL que afectan al espermatozoide provienen de dos fuentes: de los espermatozoides defectuosos y de los leucocitos seminales, comúnmente encontrados en pacientes con infecciones de las glándulas sexuales accesorias¹⁷. En teoría la falta de protección del sistema antioxidante contribuiría a hacer que las células sean más vulnerables a niveles normales de RL y/o la exposición a una producción excesiva de RL podría ser la responsable del estrés oxidativo en la línea germinal masculina. Por otra parte, los factores ambientales tales como el humo del cigarrillo y los metales pesados entre otros, inducen estrés oxidativo sistémico permitiendo una disminución de vitaminas antioxidantes del plasma seminal y la inducción de daño de DNA en el espermatozoide^{3,18,19,20}.

PRODUCCIÓN DE ROS POR LOS LEUCOCITOS EN SEMEN

Se ha demostrado que la activación de los leucocitos, fundamentalmente de los neutrófilos, es un paso importante para que ellos produzcan citoquinas y ROS. El H_2O_2 , el anión superóxido y los nitratos y nitritos son producidos por macrófagos y granulocitos activados y son altamente tóxicos para el espermatozoide^{20,21}. En el plasma seminal, los granulocitos pueden liberar grandes cantidades de ROS como respuesta a una infección y/o inflamación. El grado de daño espermático inducido por los ROS depende de la localización de la reacción inflamatoria, de la duración de la exposición del espermatozoide a estos productos y de la capacidad de la célula espermática para activar su sistema intrínseco de defensa inmunológica²¹. La presencia

de leucocitos en el semen y sus efectos sobre el espermatozoide continúa siendo motivo de discusión. Aitken formula poéticamente: “¿son ellos pasajeros, terroristas o buenos samaritanos?Ó²². Un número elevado de leucocitos en el plasma seminal (leucocitospermia) sugiere la presencia de una reacción inflamatoria en el tracto genito-urinario masculino²⁰⁻²³. En 1992 la Organización Mundial de la Salud²⁴ estableció que más de 1×10^6 leucocitos/ml de semen debe considerarse anormal. La incorporación del estudio de leucocitos en semen a través del método de la peroxidasa y la cuantificación de la elastasa en plasma seminal ha sido útil para el diagnóstico de procesos inflamatorios. La controversia que se presenta es acerca de cuál es la concentración de leucocitos que separa lo normal de lo patológico. La mayoría de los estudios comparan el número de leucocitos presentes en el semen de pacientes infértiles con controles fértiles^{23,25,26} y los resultados obtenidos han sido contradictorios. Numerosos estudios han reportado que el aumento de leucocitos en el plasma seminal afecta negativamente los parámetros seminales^{21,27,28}, lo que sugiere que la leucocitospermia puede reflejar, al menos en algunos casos, actividad en el tracto genitouretral asociada a una anormal espermatogénesis o pobre viabilidad espermática. Sin embargo, otros no han observado un efecto deletéreo de los leucocitos sobre los parámetros seminales^{21,29,30,31}.

PRODUCCIÓN DE ROS Y ANTIOXIDANTES

Los espermatozoides defectuosos, particularmente aquellos con excesivo residuo citoplasmático, producen altas cantidades de ROS³², sin embargo, los leucocitos producen 1000 veces más ROS. Los hombres con niveles altos de antioxidantes en semen pueden tolerar altos niveles de ROS, mientras que en aquellos sin una adecuada protección antioxidante los espermatozoides pueden sufrir daño aún cuando la presencia de leucocitos sea baja³³. Los hombres infértiles tienen niveles más bajos de antioxidantes que los hombres fértiles^{2,4,12,16}, lo cual ha sido atribuido a la ineficiencia del sistema antioxidante, el cual tendría un origen genético con expresión local (dentro del compartimiento reproductivo), manifiesta por la deficiencia de isoenzimas testiculares o su desregulación por la vía de promotores específicos de tejido^{20,34-36}. También es posible que el aumento de leucocitos sea inducida por el mismo espermatozoide. Un posible mecanismo por el cual el espermatozoide puede atraer neutrófilos es a través de la activación del complemento y esto puede ocurrir en presencia de

infecciones y/o inflamaciones, las cuales a su vez producen activación de los granulocitos y macrófagos. La generación controlada de ROS por parte del espermatozoide está asociada con funciones fisiológicas normales mientras que la excesiva producción, parece ser un factor importante a considerar en la infertilidad del varón^{3,35,36,37}

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (PL)

La peroxidación lipídica (PL) del espermatozoide humano es considerada uno de los mecanismos claves del daño espermático, con la consecuente infertilidad^{2,3,33}. La PL es un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, derivados de ácidos grasos polinsaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos. Entre estos se incluyen compuestos carbonilo, de los cuales el más abundante es el malondialdehído (MDA). Por esta razón, la cuantificación del MDA es ampliamente usada como indicador de peroxidación lipídica³⁷. Los niveles aumentados de lipoperóxidos han sido asociados con una variedad de enfermedades crónicas en el hombre. El MDA reacciona rápidamente con grupos amino o con proteínas y otras biomoléculas^{36,37}; también forma compuestos con bases de DNA que son mutagénicas y posiblemente carcinogénicas. Los tipos más comunes de peroxidación lipídica son: a) la PL no enzimática y b) la PL enzimática dependiente de NADPH y ADP.

El comienzo de la peroxidación lipídica en espermatozoides susceptibles permite la acumulación progresiva de hidroperóxidos lipídicos en la membrana plasmática del espermatozoide la cual lo descompone para formar MDA³. La producción de MDA como producto final de la PL inducida por promotores del ion ferroso ha sido reportada por Alvarez y cols.¹⁴. Estos autores calcularon que el nivel letal de peroxidación es de 100 pmoles de MDA por 1×10^6 de células espermáticas. La concentración de MDA ha sido correlacionada negativamente con el porcentaje de células móviles y positivamente con defectos morfológicos de la pieza intermedia en el espermatozoide humano³⁸⁻⁴⁰. Nosotros³⁹ estudiamos la concentración de MDA en el plasma seminal de 89 varones con leucocitospermia: 49 infértiles y 40 con varicocele, la concentración de MDA en plasma seminal del grupo de hombres con varicocele fue de $2,80 \pm 0,18 \text{ mM}$ y de $2,86 \pm 0,12 \text{ mM}$ en el grupo de hombres infértiles, siendo ambas significativamente más altas que la obtenida en el grupo de hombres fértiles (Fig 1). Estudios previos, en pacientes con leucocitospermia

y varicocele, han demostrado un significativo incremento en los niveles de anión superóxido y actividad de ROS, además de la producción de diferentes productos tóxicos potenciales e inestables⁴¹⁻⁴³.

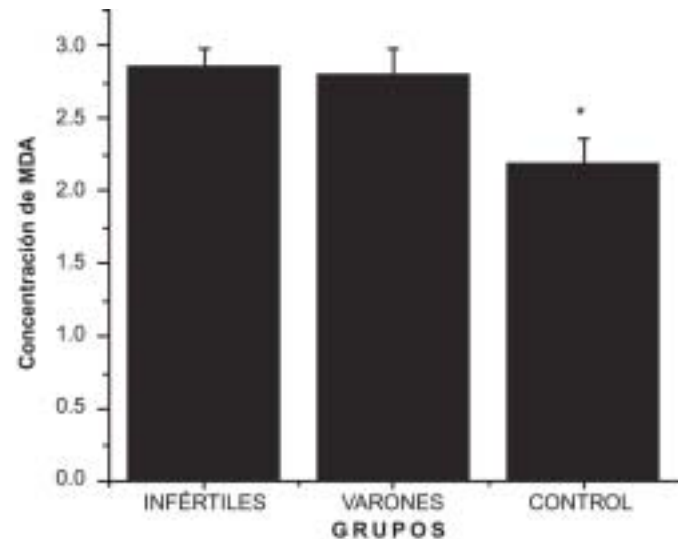


Figura 1. Concentración de malondialdehído (MDA, μM) en el plasma seminal de hombres infértiles, con varicocele y con fertilidad probada. * $p < 0,05$ al comparar control vs infértiles y varicocele³⁹.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ROS

Las ROS afectan la fertilidad masculina debido a las alteraciones que se producen en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo cual se traduce en alteraciones en la movilidad y morfología del espermatozoide; el H_2O_2 difunde a través de las membranas, entra a la célula e inhibe la actividad de algunas enzimas, tales como glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) permitiendo una disminución en la producción de NADPH y una concomitante acumulación de forma reducida y oxidada del glutatión (GSSG y GSH)^{2,3,33,34}. El espermatozoide humano, rico en ácidos grasos polinsaturados, es atacado por las ROS. La disminución de la movilidad está fundamentada en que la oxidación reduce el contenido de los ácidos grasos en la membrana plasmática del espermatozoide y en consecuencia se produce una alteración en la fluidez e integridad de la misma, con la consiguiente disminución o pérdida de la movilidad, capacitación, reacción acrosómica e interacción con el ovocito para su fertilización^{44,45}. El daño provocado por la peroxidación lipídica que explicaría la infertilidad estaría dado por la pérdida de casi la mitad de los ácidos grasos polinsaturados, fundamentalmente el ácido decosahexanoico (DHA);

in *vitro*, cuando la cascada de peroxidación lipídica ocurre por estimulación con un promotor como el ión ferroso, el 60% de estos ácidos grasos se pierden de la membrana⁴⁶. La pérdida del ácido decosahexanoico de la membrana probablemente sea el resultado de la descomposición de estos ácidos grasos, más que la escisión enzimática por la fosfolipasa A²². Otra acción deletérea de los RSO es la que se produce sobre el DNA^{3,45,47}. Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de ROS y la fragmentación del DNA en el espermatozoide de hombres infértiles,^{2,3,46,47}. Aitken y cols.⁷ observaron que la exposición directa del espermatozoide humano a ROS específicas, tales como H₂O₂, altera la competencia funcional de estas células, así como también, su integridad genómica⁷. Moustafa y cols.³ estudiaron varones infértiles y grupos control encontrando que el DNA fragmentado por agentes oxidantes tuvo una correlación negativa con la densidad espermática. Todo esto, aunado a una menor capacidad de reparación del DNA que se produce por una disminución en la actividad de la DNA polimerasa beta cuando aumenta la temperatura en el testículo, lo cual impide la correcta replicación del DNA, disminuyendo la mitosis celular, lo que también explica ampliamente la oligozoospermia que se observa en pacientes con varicocele^{33,43,47,48}. Armstrong y cols.⁴⁹ puntualizan que la generación de ROS por parte de los espermatozoides en condiciones determinadas, no solamente depende de la sensibilidad de la técnica utilizada para detectarlos y de la eliminación de leucocitos, sino de la capacidad funcional de la célula espermática. Si la calidad espermática es mala, pueden esperarse niveles altos de ROS.

Se conoce que la maduración de los espermatozoides ocurre en el epidídimo y que este evento es crucial para los cambios estructurales y funcionales de la célula espermática. Alteraciones en este proceso permitirían una falla en el sistema antioxidante y oxidativo del espermatozoide, lo cual determinaría el posterior potencial oxidativo de ese espermatozoide. Ollero y cols.⁹ encontraron una disminución en el contenido de ácido decosahexanoico en el espermatozoide humano durante la maduración epididimaria y sugirieron que este es uno de los pasos fundamentales de regulación genómica de la maduración espermática. Si este evento no ocurre, el espermatozoide podría presentar retención citoplasmática y una tasa alta de peroxidación lipídica^{27,28,33,40}. Una de las consecuencias importantes de la disminución del contenido de DHA durante la maduración espermática en el epidídimo, es la remoción de DHA

de la membrana espermática humana, disminuyendo así la susceptibilidad del espermatozoide al estrés oxidativo.

La asociación entre función espermática defectuosa y niveles altos de ROS en hombres infértiles, ha sido descrito en estudios independientes difíciles de ignorar.^{1,7,9,45,48,50,51,52,53}. Ellos han hipotetizado que la clave de esta actividad parece ser la retención de residuo citoplasmático por el espermatozoide inmaduro, el cual es liberado prematuramente del epitelio germinal^{50,52,54,55,56}. La presencia de este exceso de citoplasma favorece el aumento de la capacidad de estas células inmaduras para producir NADPH que sirve como un generador de electrones para la producción de ROS. Un aumento en la capacidad de las enzimas unidas a la membrana para generar ROS y, posiblemente, un fallo para elaborar inhibidores intrínsecos de actividad de óxido-reducción de la membrana plasmática,² podría contribuir al estrés oxidativo expresado por estas poblaciones de espermatozoides inmaduros. Pasqualotto y cols.⁵² investigaron la relación entre estrés oxidativo, características seminales y diagnóstico clínico en hombres infértiles. Ellos encontraron que los niveles de antioxidantes totales en pacientes con infertilidad idiopática, varicocele, vasectomía revertida e infección en pacientes con varicocele fue significativamente menor que los niveles encontrados en el grupo de hombres fértiles. Ellos concluyeron que la capacidad antioxidante total puede contribuir fuertemente a la fisiopatología de la infertilidad masculina.

VARICOCELE Y ROS

La relación entre ROS y varicocele ha sido documentada últimamente por varios investigadores, quienes han reportado que el varicocele está asociado con elevados niveles de ROS producidos por el espermatozoide y disminución de la capacidad antioxidante del plasma seminal^{41,42,43,47,48}. Barbieri y cols.⁵³ encuentran que los pacientes con varicocele presentan niveles disminuidos de las defensas antioxidantes a ambos niveles, tanto local (plasma seminal), como a nivel sistémico (plasma sanguíneo). Los niveles de ROS en los espermatozoides de los hombres con varicocele son también altos, independientemente de su estado de fertilidad, sugiriendo un potente efecto final de los mismos sobre la función espermática. Los espermatozoides de hombres fértiles e infértiles con varicocele presentan niveles de ROS más altos cuando son estimulados "in vitro" que los de los hombres fértiles sin varicocele en las mismas condiciones⁵³. En un estudio realizado por Kksal y cols.⁵⁴ se reportó que

aunque no hubo diferencias en los niveles de MDA en tejido testicular entre hombres infértiles con y sin varicocele, los pacientes con varicocele grado III tenían valores significativamente más altos que aquellos con grados menores, indicando esto que el aumento de MDA está asociado con grados mayores del varicocele. El efecto de la varicocelectomía sobre la fertilidad masculina es aún motivo de controversias, sin embargo, se ha reportado una mejoría en la calidad seminal en un 60-80% de los pacientes infértiles⁵⁵ Esto sugiere que la espermatogénesis mejora seguido a la reparación del varicocele, pero no se sabe si la reparación del varicocele mejora específicamente la eliminación del resto citoplasmático en el testículo y/o en el epidídimo. Villanueva y cols.⁵⁶ encontraron, en pacientes con varicocele, una mayor frecuencia de espermatozoides con alteraciones de pieza intermedia (retienen citoplasma en su pieza intermedia) asociada con producción de altas cantidades de ROS^{40,47}.

CONCLUSIONES

Las especies de oxígeno reactivas o ROS, conocidas como radicales libres (RL), son agentes oxidantes con alta capacidad reactiva. Los RL son producidos fisiológicamente por una transferencia de un electrón durante el metabolismo celular en los procesos que generan energía a nivel mitocondrial, o en el proceso oxidativo de los leucocitos polimorfonucleares durante el mecanismo de defensa fisiológica. Una vez formado el RL se inicia una serie de reacciones en cadena hasta que ellos son eliminados. En el organismo los ROS se producen continuamente y sus niveles tisulares están regulados por sistemas de protección denominados antioxidantes. Una producción excesiva de RL o la deficiencia de los sistemas antioxidantes son condiciones para que ocurran sus efectos deletéreos. Los ROS reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones que modifican la estructura de la membrana celular, lo cual está relacionado con su alto contenido de ácidos grasos polinsaturados. Tal es el caso de la membrana del espermatozoide. Tanto la producción de RL como la capacidad antioxidante tisular pueden ser cuantificadas. Muchas de las alteraciones estructurales y funcionales de los espermatozoides, están relacionadas con la producción excesiva de RL. Tal es el caso de la infertilidad sin causa específica, las oligozoospermias idiopáticas y las alteraciones provocadas por el varicocele.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aitken RJ. The human spermatozoon: a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115:1-7.
2. Fraczek M, Kurpysz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw* 2005;59:523-34.
3. Moustafa M, Sharma R, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez M, Thomas A, Agarwal A: Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturing in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod* 2004;19:129-138.
4. Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2005;6: 495-501.
5. Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: A mediator of sperm function. *J Androl* 2001; 22:349-356.
6. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943; 138:512-518.
7. Aitken RJ, Buckingham D, Harkis D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 97:441-450.
8. Kemal 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.
9. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez M, Sharma RK, Agarwal A, Lardson K, Evenson D, Thomas AJ JR, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1912-1921.
10. Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl* 2002; 25:191-194.
11. Sikka S: Role of Oxidative Stress and Antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004; 25:5 -18.
12. Oral O, Kutlu T, Aksoy E, Ficioglu C, Uslu H, Tugrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet* 2006;4:1-5.
13. De Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes: and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992;13:368-386.
14. Alvarez J, Touchs J, Blasco I, Storey B. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 1987;8:338-348.
15. Jeulin C, Soufir P, Weber D, Laval-Martin D, Calvayrac

- R. Catalasa activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gam Res* 1989;24:186-196.
16. Lewis S, Sterling S, Young I, Thompson W. Comparison of individual antioxidants and total antioxidant capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997;67:142-147.
 17. Potts J, Pasqualotto F. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia* 2003;35:304-308.
 18. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to DNA. *Mut Res* 1996;351:199-203.
 19. Comhaire F, Christophe A, Zalata A, Dhooze W, Mahmoud A, Depuydt C. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostg. Leuk* 2000;63:15-165.
 20. Sanocka D, Jedrzejczak P, Szumala-Kakol A, Fraczek M, Kurpisz M. Male genital tract inflammation: the role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 2003;24:448-455.
 21. Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F: Chronic prostatitis and male accessory gland infection: is there an impact on male infertility. *Andrologia* 2003;35:325-330.
 22. Aitken R, Baker H. Seminal leukocytes passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod* 1995; 10:1736-1739.
 23. Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarroel V, Molina C, Bellabarba C, Velazquez E. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 2000; 45:131-136.
 24. World Health Organization Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1992.
 25. Kung AW, Ho PC, Wang C. Seminal leukocyte subpopulations and sperm function in fertile and infertile Chinese men. *Int J Androl* 1993;16:189-194.
 26. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantification of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril* 1988;49:497-504.
 27. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G: Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum. Reprod* 2002; 17:2665-2672.
 28. Esfandiari A, Sharma R, Saleh R, Thomas Jr A, Agarwal A: Utility of the Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Seminal Leukocytes and Spermatozoa. *J Androl* 2003; 24:862-870.
 29. Aitken R J, West K D, Buckingham D. Leukocytic infiltration in the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1994;15:343-352.
 30. Tomlinson MC, Barrat LR, Cooks ID Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 1993;60:1069-1075.
 31. Barrat CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod* 1990;5:639-648.
 32. Aitken R J, Krauz C, Buckingham D. Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Develop* 1994;39:268-279.
 33. Saleh R, Agarwal A: Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *J Androl* 2002;23:737-752.
 34. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;29:67-69.
 35. Comhaire F, Garem E, Mahmoud A, Eeartmans F, Shoonjans F: Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl* 2005;7:257-262.
 36. Bernard D, Christophe A, Delanghe J, Langlois M, De Buyzere M, Comhaire F: The effect of supplementation with an antioxidant preparation on LDL-oxidation is determined by haptoglobin polymorphism. *Redox Rep* 2003;8:41-46.
 37. Browne S. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol.*1999; 9:147-163.
 38. Aitken R, Clarkson J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;81:459-469.
 39. Tortolero I, Duarte JM, Pamplona M, Alvarez E, Arata G, Regadera J, Galvis L. The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. *Arch Esp Urol* 2004;57: 921-928.
 40. Rao B, Soufir J, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gam Res* 1989;24:127-134.
 41. Hendin E, Kolettis P, Sharma R, Thomas A, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999;161:1831-1834.
 42. Weese D, Deaster M, Kyle K, Leach G, Lod P, Zimmer D. Stimulated reactive oxygen species generation by spermatozoa of infertile men. *J. Urol* 1993;149:64-67.
 43. Banks S, King S, Irvine D, Saunders P: Impact of a mild

- scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;129:505-514.
44. Jones R, Mann T, Sherin R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;31: 531-537.
 45. Zalata A, Ahmed A, Allamaneni S, Comhaire F, Agarwal A: Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 2004;6:313-318.
 46. Comhaire F, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Depuydt C, Dhooge W: Reactive oxygen species, antioxidants, and sperm phospholipids. *Andrologia*, 1999;31:295-296.
 47. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2005;16:35-41.
 48. Comhaire F, Mahmoud A, Cavallini G, Ferraretti A, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxiam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl* 2004;25:771-772.
 49. Armstrong JS, Bivalacqua TJ, Chamulitrat W, Sikka S, Hellstrom WJ. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. *Int J Androl* 2002;25:223-229.
 50. Aitken R, Gordom E, Harkiss D, Twigg J, Jennings Z, Irvine D. Relative impact oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59:1037-1046.
 51. Ambrosini A, Zolese G, Ambrosi S, Ragni L, Tiano L, Littarru G, Bertoli E, Mantero F, Boscaro M, Balercia G. Oleoylethanolamide Protects Human Sperm Cells from Oxidation Stress: Studies on Cases of Idiopathic Infertility. *Biol Reprod* 2005;14:21-25.
 52. Pasqualotto F, Sharma K., Nelson D, Thomas A, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73:459-464.
 53. Barbieri E, Hidalgo M, Venegas A, Smith R, Lissi E. Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J Androl* 1999;20:713-717.
 54. Koksai I, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S, Kadioglu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *Br J Urol* 2000;86:549-552.
 55. Mancini, Meucci E, Milardi D, Giacchi E, Bianchi A, Pantano A, Mordente A, Martorana G, De Marinis L: Seminal Antioxidant Capacity in Pre- and Postoperative Varicocele. *J Androl* 2004; 25:44-49.
 56. Villanueva C, Vega E, Díaz M, Echevarría M, Krachmer S. Subclinical sperm dysfunction infertile patients with varicocele and marginal semen analysis. *Andrologia* 1999; 31: 263-267.