



MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN RECURSOS CINEGÉTICOS

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudio del efecto del antioxidante cinnamtannina B-1
sobre los espermatozoides epididimarios descongelados de
ciervo

Francisca Sánchez Rubio

Director:

José Julián Garde López-Brea



**Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética
Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos**

**Máster Universitario en Investigación básica y aplicada en
Recursos Cinegéticos**

Don José Julián Garde López-Brea, Catedrático de la Universidad de Castilla-La Mancha,

Informa:

Que Dña. Francisca Sánchez Rubio ha realizado el trabajo de investigación del Master bajo su supervisión. Asimismo, indica que el referido trabajo aporta resultados interesantes sobre el estudio del efecto del antioxidante cinnamtannina B-1 en muestras espermáticas epididimarias de ciervo descongeladas.

Albacete, 30 de Noviembre de 2012

Fdo. José Julián Garde López-Brea

ÍNDICE

| | |
|--------------------|----|
| Resumen | 4 |
| <hr/> | |
| Introducción | 6 |
| <hr/> | |
| Material y métodos | 9 |
| <hr/> | |
| Resultados | 17 |
| <hr/> | |
| Discusión | 26 |
| <hr/> | |
| Conclusiones | 28 |
| <hr/> | |
| Bibliografía | 29 |
| <hr/> | |

Resumen

El objetivo principal de este trabajo es el de evaluar el efecto del antioxidante natural cinnamtannina B-1 en muestras espermáticas de ciervo descongeladas, mediante un experimento de dosis/respuesta. El experimento se realizó con un pool de espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo; en cada pool se combinaron dosis de 6 machos, y se replicaron al menos 6 veces. Inicialmente, las muestras espermáticas se descongelaron y evaluaron. Posteriormente, las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 30×10^6 espermatozoides/mL en un medio de BGM (bovine gamete medium). Una vez diluidas las muestras, se alicuotaron y se les añadió concentraciones crecientes de cinnamtannina B-1 (0, 0,1, 1, 10 y 100 μ M, respectivamente). Además, estas muestras se dividieron a su vez en dos, para poder someter a una de las alícuotas a estrés oxidativo (FeSO_4 y ascorbato de sodio). Las muestras se evaluaron tras 0, 2 y 4h de incubación (37°C). Se evaluó la motilidad (CASA); también, la viabilidad y apoptosis (YOPRO-1/IP), el estado mitocondrial (Mitotracker deep red), la peroxidación lipídica (C11-BODIPY 581/591) y la producción de radicales libres (CM- H_2 DCFDA), todo ello mediante citometría de flujo. Además, también se evaluó la integridad del ADN mediante SCSA[®] (Sperm Chromatin Stability Assay). Nuestros resultados muestran que la cinnamtannina B-1, en una situación de estrés oxidativo exógeno, con el paso del tiempo, a pesar de producir una leve disminución en la viabilidad, es capaz de mejorar la movilidad, así como los parámetros cinemáticos de los espermatozoides vivos, haciéndolos más rápidos y progresivos. Además, inhibe que se produzca la reacción acrosómica, aumentando el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto. Finalmente, la cinnamtannina B-1 (100 μ M), tras 4h de incubación, es capaz de disminuir la producción de radicales libres como consecuencia de un estrés oxidativo exógeno, así como de evitar el daño producido por dicho estrés a nivel de peroxidación lipídica. No hemos observado efecto de este antioxidante en el ADN espermático. Dicho antioxidante podría ser candidato para la mejora de los medios de manipulación de los espermatozoides, tanto a la precongelación como a la descongelación.

Palabras clave: ciervo, cinnamtannina B-1, espermatozoide, estrés oxidativo, citometría de flujo.

Introducción

El estrés oxidativo se ha convertido en una de las principales amenazas frente a la funcionalidad de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro*. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) desempeñan un papel fundamental en la fisiología del espermatozoide (Aitken et al., 2004; O'Flaherty et al., 2006; de Lamirande y O'Flaherty, 2008), pero su exceso también puede dañar los espermatozoides (Shen y Ong, 2000; Aitken & Baker, 2002; Agarwal y Saleh, 2002; Agarwal et al., 2003). Entre las especies reactivas de oxígeno, destacan fundamentalmente el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Nogushi y Niki, 1990; Halliwell, 1997). Los espermatozoides producen pequeñas cantidades de ROS, las cuales son requeridas para la hiperactivación, capacitación, reacción acrosómica y fertilización (Sikka, 1996; Argawal et al., 2002, 2004b), sin embargo niveles altos pueden producir daños a los fosfolípidos de las membranas y al ADN por estrés oxidativo (Twigg et al., 1998; Duruu et al., 2000; Agarwal et al., 2004) ocasionando, inhibición de la reacción acrosómica, pérdida de la motilidad e incluso infertilidad (Gopalakrishnam et al., 1998; Tramer et al., 1998; Christova et al., 2004; Brouwers et al., 2005).

La congelación y manipulación de los espermatozoides son una fuente de estrés oxidativo (Domínguez-Rebolledo et al., 2011), cuyos efectos negativos habría que evitar al máximo.

Los antioxidantes pueden mejorar los medios de conservación del esperma, extendiéndose a la viabilidad de los espermatozoides y a la protección de su ADN (Domínguez-Rebolledo et al., 2011). El daño producido por el estrés oxidativo puede ser aún mayor en semen descongelado y sobretodo en espermatozoides del epidídimo, debido a la falta de plasma seminal, que es una fuente reconocida de antioxidantes (Chen et al., 2003). Los antioxidantes tienen un papel importante en el mantenimiento de la motilidad y la integridad genética de las células del esperma en contra de los daños que pueden sufrir por oxidación (Hughes et al., 1998). Anteriormente, Fernández-Santos et al. (2007) demostraron que algunos antioxidantes

(catalasa y superóxido dismutasa) mejoran la criopreservación de los espermatozoides epididimarios del ciervo (Fernández-Santos et al., 2007). Además, también se ha demostrado el efecto positivo de diferentes antioxidantes (melatonina, ácido lipoico, crocina y trolox) frente al estrés oxidativo ocasionado por la manipulación en el laboratorio tras la descongelación (centrifugación y lavado) (Domínguez-Rebolledo et al., 2010). Por otro lado, Fernández-Santos et al. (2009b) demostraron que la vitamina C podía ejercer el mismo efecto protector que el epidídimo, permitiendo el mantenimiento de las muestras espermáticas a 5°C previamente a la congelación (Fernández-Santos et al., 2009b).

Por lo tanto, existe un gran interés en la protección de los espermatozoides de ROS durante la manipulación y la criopreservación. Para ello, los investigadores suelen utilizar fuentes externas de ROS para estudiar el estrés oxidativo en espermatozoides. Por ejemplo, y como veremos en nuestro caso, el ion ferroso/ascorbato genera radicales hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss o la reacción de Fenton (Buettner y Jurkiewicz, 1996).

Un determinado número de estudios han informado sobre los efectos celulares que produce cinnamtannina B-1, que son en su mayoría mediados por su actividad antioxidante. La cinnamtannina B-1 es un proantocianidina natural de tipo A que consta de tres unidades monoméricas de flavan-3-ol ((-)-epicatequina) (epicatequina-(4 β \rightarrow 8, 2 β \rightarrow O \rightarrow 7)-epicatequina-(4 α \rightarrow 8)-epicatequina) que fue aislada inicialmente de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (árbol de la canela). La cinnamtannina B-1 también se ha encontrado en un número limitado de plantas, incluyendo *Linderae umbellatae* (Ezaki et al., 1985) y *Laurus nobilis* (Ben Amor et al., 2007) (familias del laurel), y *Vaccinium vitis-idaea* (arándano rojo) (Ho et al., 1999).

El compuesto cinnamtannina B-1 modula varios procesos biológicos tales como cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico libre, generación endógena de especies reactivas de oxígeno, fosforilación de la proteína tirosina y agregación plaquetaria. A las proantocianidinas, tales como la cinnamtannina B-1, se las ha caracterizado porque ejercen actividad antitumoral mediada por

una acción selectiva proapoptótica en un número de líneas de células tumorales asociadas con la actividad antiapoptótica en células normales. Teniendo en cuenta el gran número de efectos celulares de cinnamtannina B-1 el desarrollo de nuevos usos para este potente antioxidante merece de estudios adicionales.

Por todo ello, el objetivo general de este trabajo es el de evaluar el efecto del poder antioxidante de la cinnamtannina B-1 a diferentes concentraciones en muestras espermáticas epididimarias de ciervo descongeladas e incubadas; por un lado, sin haber añadido oxidantes a la muestra, y por otro, habiendo sometido a las muestras espermáticas a un estrés oxidativo exógeno (FeSO_4 /Ascorbato de sodio). Como herramienta para nuestro estudio utilizaremos la citometría de flujo que nos permitirá evaluar la viabilidad y apoptosis (YOPRO-1/IP), el estado mitocondrial (Mitotracker deep red), la peroxidación lipídica (C11-BODIPY 581/591) y la producción de radicales libres (CM- H_2DCFDA). Además, también evaluaremos la integridad del ADN mediante SCSA[®]. Para completar el estudio, analizaremos la motilidad espermática utilizando un sistema CASA.

Material y métodos

1.- Recogida de las gónadas

Para el presente estudio se utilizó un pool de espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo ibérico. En cada pool se combinaron dosis de 6 machos adultos. La recogida seminal y todos los procedimientos con animales se realizaron de conformidad con el RD 1201/2005 Reglamento Español de Protección Animal, que se ajusta al Reglamento de la Unión Europea 86/609.

Para la obtención de los testículos, en el campo, se recogió el genital masculino entero. Inmediatamente tras la recogida, los testículos fueron transportados al laboratorio en bolsas de plástico a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en unas 2 horas tras la recogida. Las muestras fueron procesadas tan pronto llegaron al laboratorio. Para la recogida de espermatozoides epididimarios, los testículos y epidídimos fueron retirados del saco escrotal. La cola del epidídimo, incluyendo aproximadamente entre 5 y 10 cm del conducto deferente, fueron separados y transferidos a una placa petri de 35 mm (Nunc Glasstrup, Denmark).

2.- Procesado y criopreservación de semen

Los espermatozoides se recogieron de la porción distal del epidídimo mediante diversas incisiones con una hoja de bisturí sobre la cola del epidídimo en 0.5 mL del diluyente de congelación (fracción A). Se determinó el volumen espermático, así como su concentración, Se determinó también, el porcentaje de motilidad individual y calidad de movimiento utilizando una escala de 0, más bajo, a 5, más alto. Solo las muestras con una motilidad inicial a 60-65% se utilizaron para la congelación.

Las muestras espermáticas se diluyeron a temperatura ambiente con la fracción A del medio Tris-citrato-fructosa (TCF: Tris 36.1 g/L, ácido cítrico 18.6g/L, fructosa 13.3 g/L y 20% de yema de huevo clarificada). Después, se

diluyeron V:V en la fracción B del diluyente (igual a la fracción A con un 12%, v/v de glicerol) (Fernández-Santos et al., 2006) con 6% de concentración final glicerol hasta una concentración de $\sim 400 \times 10^6$ espermatozoides/mL y atemperadas a temperatura ambiente.

La suspensión celular diluida fue puesta en un baño con 75 mL de agua a 5°C y trasladada hasta una nevera a 5°C. La refrigeración tuvo lugar rápidamente, llegando a los 5°C en 10 min. Después se llevó a cabo la equilibración durante 2 horas a 5°C (Fernández-Santos et al., 2006) para luego envasar el semen en pajuelas de 0,25 mL (400×10^6 espermatozoides/mL). Las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno a 4,5 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos para luego pasar directamente al nitrógeno líquido y permanecer almacenadas hasta su utilización.

3.- Descongelación y dilución

Las 6 muestras espermáticas fueron descongeladas mediante inmersión de las pajuelas en baño térmico a 37°C durante 30 segundos.

Se comprobaron las movilidades del pool y se descartaron las que eran demasiado bajas (<50% o calidad <2). Se añadieron, lentamente, 2 mL de BGM (bovine gamete medium: NaCl 87 mM, KCl 3,1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 0,4 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, HEPES 40 mM, lactato de sodio 21,6 mM, piruvato de sodio 1 mM, kanamicina 50 µg/mL, rojo fenol 10 µg/mL y BSA 6mg/mL (pH 7,5)) y se centrifugó a 600xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se diluyó de nuevo lentamente con 2 mL de BGM y se estimó la concentración. Añadimos BGM hasta alcanzar una concentración final de 30×10^6 espermatozoides/mL, siguiendo el protocolo desarrollado por Domínguez-Rebolledo et al. (2011).

4. Diseño experimental

Las muestras fueron alicuotadas (250 μ L) para poder añadir posteriormente las diferentes concentraciones de cinnamtannina B-1 (Enzo ALX-350-365-M005). En primer lugar preparamos diluciones seriadas de cinnamtannina B-1, a partir de una solución stock de 10 mM, preparada en etanol absoluto, para obtener soluciones de concentraciones 1 mM, 100 μ M y 10 μ M. De estas soluciones pondremos 2,5 μ L al tubo que corresponda para obtener las concentraciones finales de cinnamtannina B-1 deseadas (0, 0,1, 1, 10 y 100 μ M, respectivamente), así como dividir a su vez estas alícuotas para someter o no a estrés oxidativo.

A las muestras control se les añadió la misma cantidad de etanol que a la cinnamtannina B-1. A las muestras sometidas a estrés oxidativo se les añadió la solución oxidante: 200 μ L de Fe^{2+} 10 mM/ascorbato 50 mM (28 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma F8048) y 99 mg de ascorbato de sodio).

Todas las muestras se analizaron tanto a la descongelación (0h) como tras dos horas (2h) y tras cuatro horas (4h) de incubación (37°C).

5. Evaluación de la integridad del acrosoma.

El acrosoma es una estructura situada en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide en cuyo interior se encuentran almacenadas enzimas hidrolíticas que son imprescindibles para que las células espermáticas atraviesen las distintas envolturas del ovocito (Millette, 1999). Esta estructura está rodeada por una membrana acrosomal cuya cara externa está en estrecha relación con la membrana plasmática. Por ello, el acrosoma es una parte del espermatozoide que es susceptible de ser dañada durante la congelación.

La integridad morfológica del acrosoma puede ser evaluada de diferentes maneras. La técnica que utilizamos y la más sencilla consiste en fijar las muestras espermáticas en una solución de glutaraldehído o formaldehído y observarlas mediante microscopía de contraste de fases (Pursel y Jonson, 1974; Shams-Borham y Harrison, 1981; Pontbriand et al., 1989).

La integridad acrosomal se evaluó tras diluir 1:10 las muestras en 2% glutaraldehído en 0,165 M tampón cacodilato/HCl (pH 7,3). Se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos (%NAR) mediante microscopía de contraste de fases a X400 (Fernández-Santos et al., 2006).

6. Evaluación espermática

6.1. Evaluación de la motilidad

Se evaluó la motilidad espermática (%) utilizando un sistema automático de análisis de imagen (CASA) para el estudio objetivo de la motilidad espermática. El CASA utilizado fue el Sperm Class Analyzer[®] (Microptic S.L.; Barcelona, España) y una cámara digital Basler A302fs (Basler VisionTechnologies; Ahrensburg, Alemania). El programa nos ofrece información sobre los siguientes parámetros espermáticos: motilidad total (MT;%), motilidad progresiva (PM;%), velocidad media (VAP;µm/s), velocidad curvilínea (VCL;µm/s), velocidad respecto a la trayectoria recta (VSL;µm/s), linealidad (LIN;%), rectitud (STR;%), “wobbling” o índice de oscilación (WOB;%), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH; µm) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF;Hz). La tasa de adquisición de imágenes fue de 25 fotogramas/s, y el tiempo de adquisición fue de 0,8 s.

6.2. Evaluación mediante citometría de flujo

Un citómetro de flujo es un método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada. Dependiendo de las sondas fluorescentes con las que se haya cargado la muestra podemos obtener la información que necesitemos. Un citómetro es capaz de analizar 300 células/s, analizando generalmente una media de 5000 a 10.000 células por muestra lo que da una potencia estadística muy superior a la de un microscopio de fluorescencia convencional. Las muestras de este

trabajo fueron analizadas en un Cytomics FC500 (Beckman Coulter) el cual tiene capacidad para discernir hasta 5 colores. La fluorescencia verde se midió en el fotodetector FL-1 (filtro 525/28BP), la fluorescencia naranja se midió en el fotodetector FL-2 (filtro 575BP), la fluorescencia roja se midió en el fotodetector FL-3 (filtro 620SP), la fluorescencia en rojo lejano se midió en FL-5 (755BP).

6.2.1. Evaluación de viabilidad/apoptosis (YOPRO-1/IP)

Para evaluar el estado de la membrana plasmática las muestras fueron diluidas a una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL en medio BGM con $0,1 \mu\text{M}$ de YOPRO-1 (Invitrogen Y3603) y $2 \mu\text{M}$ de ioduro de propidio (IP) (Sigma P4170), e incubadas durante 20 minutos en la oscuridad. El ioduro de propidio es un colorante que solo es capaz de teñir el núcleo celular cuando la integridad de su membrana plasmática está seriamente comprometida (necrosis). El YOPRO-1 es capaz de teñir la célula cuando los daños en la membrana son más leves. Algunos autores han asociado este daño leve a procesos apoptóticos (Martínez-Pastor, 2008). Tanto el IP como el YOPRO-1 son incapaces de atravesar la membrana plasmática cuando ésta es fisiológicamente competente. Las células YOPRO-/IP- se consideraron células viables, las células YOPRO+/IP- se consideraron apoptóticas y las células YOPRO+/IP+ se consideraron muertas. En nuestro estudio trabajaremos con la población de viables YOPRO-/IP-.

6.2.2. Evaluación del estado mitocondrial (MT)

Para evaluar el estado mitocondrial de las muestras diluidas se utilizó la sonda fluorescente Mitotracker Deep Red 633 (Invitrogen M22426) a una concentración de $0,1 \mu\text{M}$ (MT). Las mitocondrias activas son teñidas por el Mitotracker Deep Red, de tal manera que la población MT+ define la población de espermatozoides con la mitocondria activa. Las muestras teñidas son incubadas 30 minutos en oscuridad antes de ser analizadas en el citómetro.

6.2.3. Estudio de peroxidación lipídica (C11-BODIPY 581/591)

El nivel de peroxidación lipídica se midió mediante la sonda fluorescente C11-BODIPY 581/591 siguiendo el protocolo descrito por Domínguez-Rebolledo et al. (2010) para espermatozoides de ciervo. Esta tinción se basa en la capacidad de la molécula de C11-BODIPY 581/591 en introducirse en la membrana plasmática y cambiar de color cuando es peroxidada, así nos informa del grado de peroxidación que sufre la membrana. Una alícuota de cada muestra se separó del resto y se incubaron durante 30 minutos con una concentración 2 μ M de C11-BODIPY 581/591. Después se lavó la muestra seguida de una centrifugación suave (600xg/5min) y se diluyó en BGM. Las muestras tratadas se incubaron a 37°C durante 2 horas y se analizó el grado de peroxidación inicial y final mediante citometría de flujo.

6.2.4. Evaluación de producción de radicales libres (CM-H₂DCFDA)

Para comparar la producción de radicales libres se realizó una tinción en paralelo con fluoresceína (CM-H₂DCFDA) 500 μ M en DMSO y se mantuvo a 37°C en un termobloque. El CM-H₂DCFDA es capaz de atravesar la membrana plasmática y una vez dentro del citosol ser procesado por las esterasas endógenas que dificultan su salida. Cuando la sonda es oxidada por radicales libres citoplasmáticos emite un intenso color verde. Analizamos una alícuota diluida en BGM mediante citometría de flujo para ver el aumento de dicha fluorescencia.

6.2.5. Evaluación de la integridad del ADN

El daño en la cromatina se caracterizó mediante las técnica SCSA[®] (Sperm Chromatin Stability Assay).

Esta técnica evalúa la estabilidad de la cromatina utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina. Se utiliza la tinción con naranja de acridina (AO) para detectar el grado de desnaturalización del ADN del núcleo espermático. Se somete a las células a medio ácido y se cuantifica el grado de desnaturalización en función de la fluorescencia observada (el AO emite fluorescencia verde si se encuentra unido a ADN monocatenario y fluorescencia roja si está unido a ADN de cadena doble).

Inicialmente se diluyeron las muestras en 0,5 mL de medio tamponado TNE hasta una concentración final de 2×10^6 espermatozoides/mL. Una vez diluido, se congelaron en criotubos 500 μ L por inmersión directa en nitrógeno líquido y allí se conservaron a -80°C hasta su posterior tinción y análisis. Para llevar a cabo el análisis se descongeló el criotubo y se depositaron 200 μ L del contenido en un tubo de citometría. Una vez que el semen estaba completamente descongelado se le añadieron 400 μ L de medio detergente ácido (pH=1,2) y a los 30 segundos, se añadieron 1200 μ L de una solución de tinción tamponada de naranja de acridina (6 mg/L).

Pasados los dos minutos de tinción, la muestra se colocó en el citómetro a una velocidad de flujo baja y se ajustaron los parámetros para una velocidad de 200-250 células/segundo. A los 3 minutos de tinción empezamos a guardar los datos. Se analizaron 10.000 células por muestra. Todos los reactivos y los tubos de citometría se encontraban en hielo a 4°C antes de empezar el análisis. Mediante esta técnica se determinó el índice de fragmentación espermática (DFI;%) así como los espermatozoides con cromatina inmadura o anormalmente condensada (HDS;%).

6.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico R (<http://www.r-project.org>).

Las variables que no eran normales se transformaron mediante el arco seno (para variables porcentuales) o mediante logaritmos (para el resto).

Para analizar los efectos del tiempo, procesamiento (concentración de cinnamtannina B-1) y la suplementación (con y sin oxidante) sobre los parámetros espermáticos se analizaron utilizando modelos lineales de efectos mixtos. Lo que hemos evaluado es el efecto de las dosis de cinnamtannina B-1 dentro de cada combinación de tiempo y oxidante. Se trata de un modelo con efecto de la concentración por cada muestreo (tiempo y oxidante). El control es cinnamtannina 0. Además del estudio de la concentración como factor (efecto por cada concentración), hemos evaluado también la concentración como variable continua (regresión) para poder ver el efecto general simplificando y asumiendo que hay una relación lineal entre cada variable y la concentración.

A menos de que se indique lo contrario, los resultados son presentados como media \pm SEM, aceptando significación estadística cuando $P < 0,05$.

Resultados

Se tuvieron en cuenta diferentes variables a la hora de expresar los resultados sobre la calidad individual de las muestras espermáticas descongeladas: el tiempo de incubación, el efecto del oxidante Fe/ascorbato, el efecto del antioxidante cinnamtannina B-1 y la dosis de dicho antioxidante dentro de cada combinación de tiempo y oxidante. Hay que tener en cuenta que a las 0 horas solamente se evaluaron los controles. Para la mayoría de los parámetros evaluados se observaron diferencias significativas.

Respecto al tiempo de incubación en las muestras control no sometidas a estrés oxidativo, observamos como a medida que pasa el tiempo tiene un efecto negativo sobre los parámetros estudiados por el CASA, y por lo tanto, afecta de forma negativa a la calidad del semen. Además, observamos cierto aumento en la producción de ROS y mayor peroxidación lipídica a medida que el tiempo de incubación es mayor ($P < 0,0001$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas sobre el ADN ($P > 0,05$).

En cuanto a la presencia del oxidante Fe/As, si comparamos respecto al control y tenemos en cuenta el paso del tiempo, hay diferencias significativas entre la muestra espermática que lo incorpora y la que no. De este modo, la presencia del Fe/As afecta negativamente a la motilidad, al estado y % de mitocondrias activas, a la viabilidad y a la peroxidación lipídica. Sin embargo, por lo que respecta al ADN, la oxidación no tiene efecto observable en su integridad.

Por último analizamos en nuestras muestras la presencia del antioxidante cinnamtannina B-1.

1. Muestras sin oxidante

Inicialmente, en la evaluación de la motilidad mediante el sistema SCA[®], ésta mostró diferencias significativas para diversos parámetros. Así, tras 4 horas de incubación, se observó un efecto positivo de diferentes concentraciones de cinnamtannina B-1 en la motilidad total (MT) con respecto

al control. [Control (31,53±3,65), 1 µM (45,32±3,65), 10 µM (44,20±3,65) y 100 µM (39,80±3,65) (P < 0,01)]. Respecto a la motilidad progresiva (MP), tras 4h de incubación se observó un efecto positivo de las concentraciones de cinnamtannina B-1 1 µM (18,57±1,96; P= 0,02) y 10 µM (19,01±1,96; P = 0,01) **(Figura 1)**.

En cuanto a los parámetros cinemáticos ofrecidos por el CASA, tras 4h de incubación, se observaron efectos positivos para las muestras incubadas con cinnamtannina B-1 100 µM para parámetros como la VCL (65,06±6,21; P=0,0407), mientras que para parámetros como la ALH, se observaron diferencias significativas con respecto al control a las 2h de incubación para las concentraciones de cinnamtannina B-1 10 µM y 100 µM, P=0,0427 y P=0,0165, respectivamente.

En cuanto a la viabilidad de las células resultó que no había protección del antioxidante a medida que aumentaba el tiempo de incubación **(Tabla 1)**.

Nuestros resultados muestran un efecto positivo de la cinnamtannina B-1 a una concentración de 100 µM, tanto tras 2h como tras 4h de incubación, disminuyendo la peroxidación lipídica (P <0,001) **(Figura 2)**. Sin embargo, en la evaluación de las muestras sin oxidante, no hubo efecto en la producción de radicales libres (ROS) **(Figura 3)**.

Tras la evaluación del estado mitocondrial, pudimos observar que la concentración más alta (cinnamtannina B-1 100 µM) tenía un efecto negativo sobre el porcentaje de mitocondrias activas tanto tras 2h (22,95±5,28) como tras 4h (22,96±5,39) (P <0,01) de incubación, con respecto del control (36,25±5,28 y 30,45±5,39, respectivamente).

Referente a los daños en el ADN, observamos diferencias significativas (p=0.04) en tDFI 4 horas, a una concentración de cinnamtannina B-1 100 µM **(Tabla 1)**.

| | CTL/Et | 0,1 μ M | 1 μ M | 10 μ M | 100 μ M | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| 0h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 62,0 \pm 3,54 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | |
| Viabilidad (%) | 55,96 \pm 9,65 | | | | | |
| Mitocondrias (%) | 34,71 \pm 5,94 | | | | | |
| ADN | HDS (%) | 9,38 \pm 3,88 | | | | |
| | tDFI (%) | 3,33 \pm 1,39 | | | | |
| 2h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 42,83 \pm 3,05 | 43,4 \pm 3,34 | 39,2 \pm 3,34 | 44,2 \pm 3,34 | 45,2 \pm 3,34 | |
| Viabilidad (%) | 50,16 \pm 7,68 | 48,6 \pm 7,68 | 48,51 \pm 7,68 | 49,66 \pm 7,68 | 48,07 \pm 7,68 | |
| Mitocondrias (%) | 36,25 \pm 5,28 | 34,06 \pm 5,28 | 35,52 \pm 5,28 | 34,95 \pm 5,28 | 22,94 \pm 5,28* | |
| ADN | HDS (%) | 7,11 \pm 2,64 | 6,92 \pm 2,64 | 5,02 \pm 2,64 | 6,22 \pm 2,64 | 3,29 \pm 2,64 |
| | tDFI (%) | 2,29 \pm 1,98 | 1,94 \pm 1,98 | 2,13 \pm 1,98 | 2,16 \pm 1,98 | 9,53 \pm 1,98 |
| 4h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 31,67 \pm 2,20 | 32,6 \pm 2,41 | 33,4 \pm 2,41 | 33,8 \pm 2,41 | 32,4 \pm 2,41 | |
| Viabilidad (%) | 43,43 \pm 7,98 | 41,34 \pm 7,98 | 41,83 \pm 7,98 | 42,92 \pm 7,98 | 44,08 \pm 7,98* | |
| Mitocondrias (%) | 30,45 \pm 5,39 | 31,37 \pm 5,39 | 32,3 \pm 5,39 | 31,78 \pm 5,39 | 22,96 \pm 5,39* | |
| ADN | HDS (%) | 6,91 \pm 1,52 | 6,55 \pm 1,52 | 4,31 \pm 1,52 | 4,88 \pm 1,52 | 1,67 \pm 1,52 |
| | tDFI (%) | 1,26 \pm 2,26 | 5,92 \pm 2,26 | 1,18 \pm 2,26 | 1,19 \pm 2,26 | 7,39 \pm 2,26* |

* Indica que existen diferencias significativas respecto al control (P <0,05)

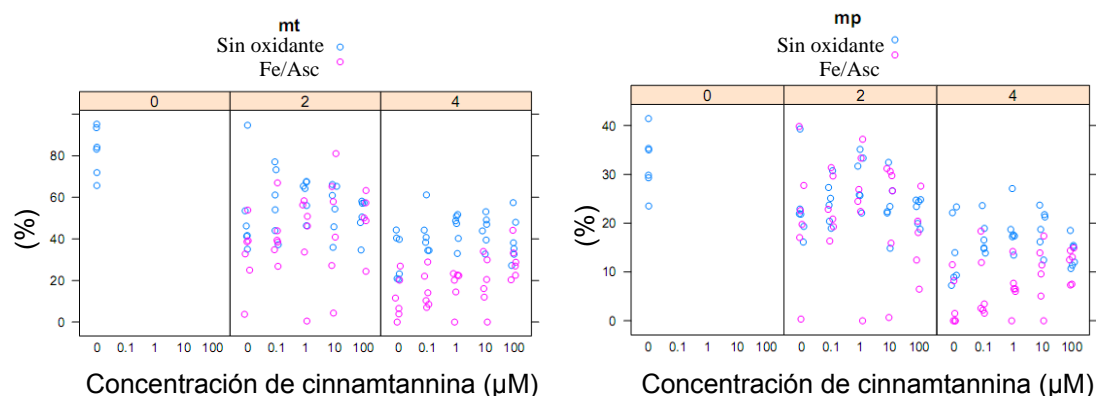
Tabla 1. Muestras sin oxidante. Valores (Media \pm ESM) proporcionados por el citómetro de flujo. % vivos con acrosoma intacto: espermatozoides PNA-/IP-; % vivos: espermatozoides YOPRO-1-/IP-; % mitocondrias activas: espermatozoides MT+; % HDS y % tDFI (SCSA): índice de fragmentación espermática.

2. Muestras tratadas con oxidante (Fe/Ascorbato)

Al igual que en el apartado anterior, en los parámetros que evaluamos con el CASA sí que existieron diferencias significativas (ver **Figura 1**). Para MT se observaron efectos positivos respecto al control a las 4 horas [Control ($13,82 \pm 4,00$); $100 \mu\text{M}$ ($29,32 \pm 3,65$) ($P=0,0082$)], observándose un aumento de la motilidad total. En cuanto a MP, también aumenta tras 4 horas de incubación para concentraciones de cinnamtannina B-1 $10 \mu\text{M}$ ($11,46 \pm 2,15$; $P=0,0476$) y $100 \mu\text{M}$ ($11,61 \pm 1,97$; $P=0,0081$).

Respecto a los parámetros cinemáticos, destacar que existieron diferencias significativas en el aumento de VCL a las 4 horas de incubación para concentraciones de cinnamtannina B-1 $1 \mu\text{M}$ ($P=0,0001$), $10 \mu\text{M}$ ($p=0,0124$) y $100 \mu\text{M}$ ($P < 0,001$). También aumentó la linealidad (LIN) casi un 20%, tras 4 horas y a unas concentraciones de $10 \mu\text{M}$ y de $100 \mu\text{M}$, ($59,2 \pm 3,27$; $P=0,0089$) y ($51,81 \pm 2,98$; $P=0,0017$), respectivamente. De este modo, la cinnamtannina B-1 a altas concentraciones provoca un aumento en la velocidad espermática así como un aumento en la linealidad. (**Figura 1**).

La rectitud (STR) mejoró, siendo $P=0,0433$, $P=0,0055$ y $P=0,0050$ a las 4 horas de incubación para concentraciones $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$, respectivamente. Por último, respecto a ALH, también hubo efectos positivos respecto al control a las 4 horas de incubación [Control ($1,27 \pm 0,14$), $10 \mu\text{M}$ ($1,6 \pm 0,14$; $P=0,0032$) y $100 \mu\text{M}$ ($2,03 \pm 0,13$; $P < 0,001$)], observándose un mayor desplazamiento lateral de la cabeza a medida que aumenta la concentración de cinnamtannina B-1.



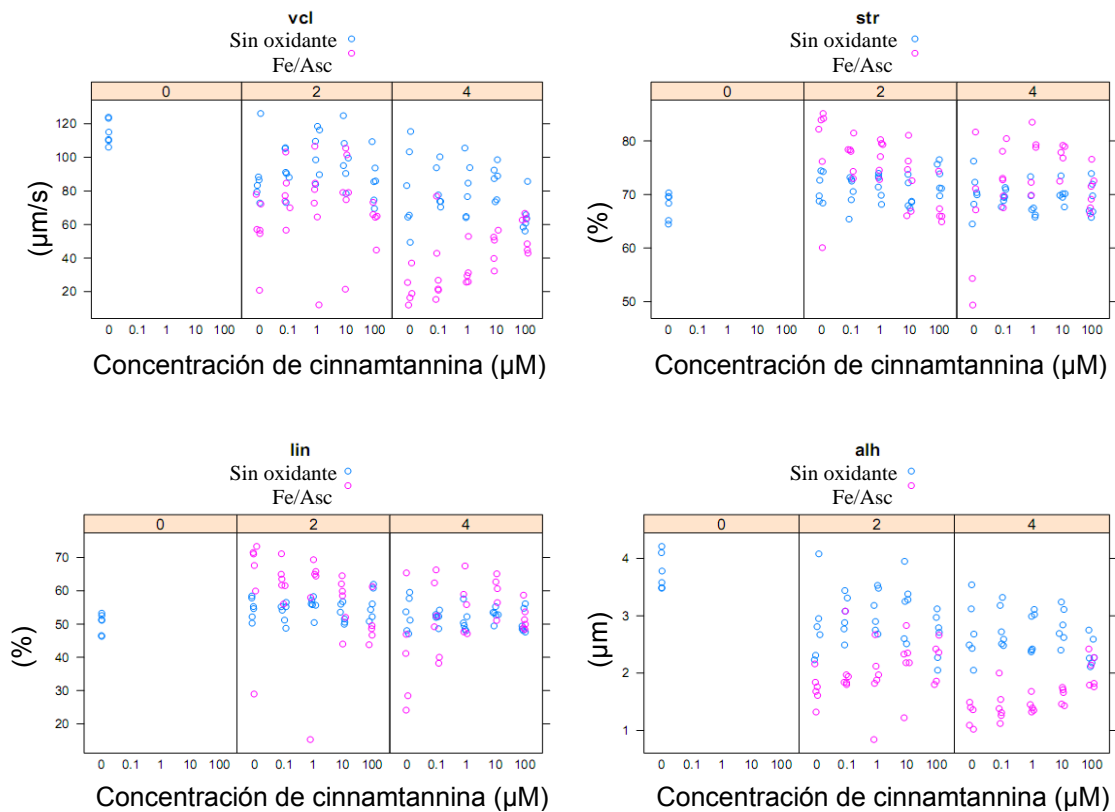


Figura 1. Relación entre los parámetros de motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidad respecto a la trayectoria real (VCL), rectitud (STR), linealidad (LIN) y desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) analizadas mediante el sistema automático de análisis de imágenes CASA; a las 0, 2 y 4 horas de incubación en presencia o ausencia de Fe/Ascorbato.

En la **Figura 2** se muestran los resultados en cuanto a peroxidación lipídica observándose un efecto significativo de la cinnamtannina B-1. Así, se observa como la cinnamtannina B-1 contrarresta dicha peroxidación para concentraciones de 10 y 100 μM a las 2 horas, ($p < 0,03$) y a las 4 horas ($p < 0,04$), respectivamente, de tal modo que la cinnamtannina B-1 a estas concentraciones es capaz de contrarrestar los efectos negativos del tratamiento oxidante.

C11-BODIPY 581/591

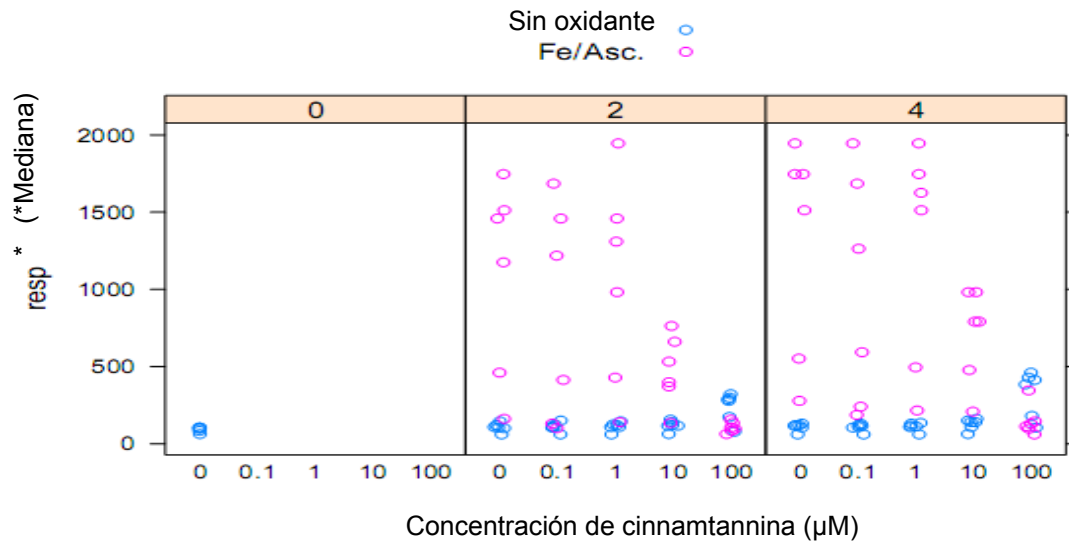


Figura 2. Relación entre el número de espermatozoides vivos no peroxidados medido por citometría de flujo (BODIPY); a las 0, 2 y 4 horas de incubación en presencia o ausencia de Fe/Ascorbato.

Asimismo, en la evaluación de la producción de radicales libres, una concentración de 100 µM de CIN B-1 es capaz de inhibir los efectos deletéreos de la oxidación disminuyendo la producción de los mismos. Así para una concentración de 100 µM, tras 2 horas ($35,13 \pm 40,84$; $P < 0,0001$) y tras 4 horas ($49,28 \pm 36,96$; $P < 0,0001$), cinnamtannina B-1 proporciona protección frente a ROS. Ver **Figura 3**.

CM-H₂DCFDA

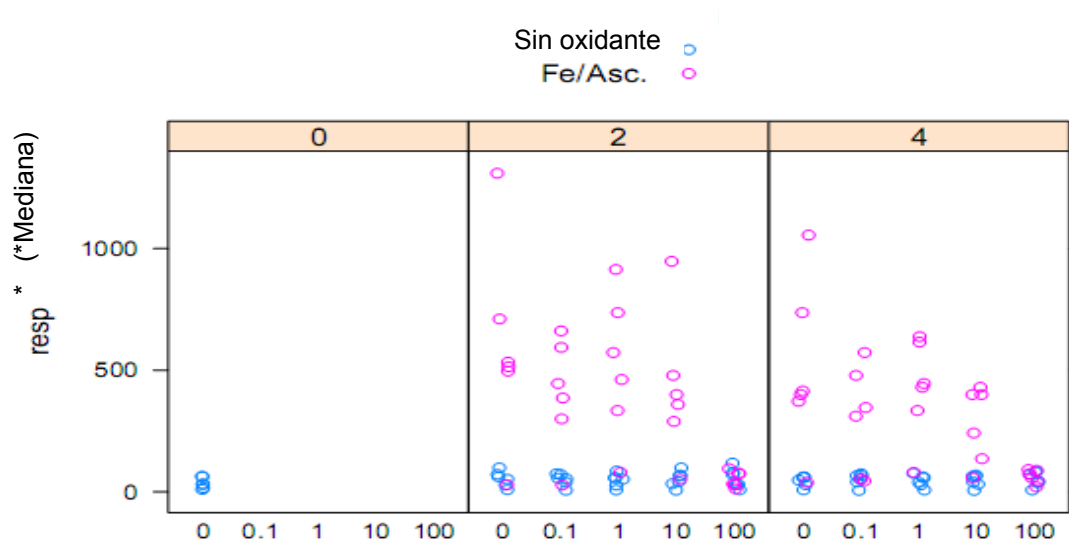


Figura 3. Relación entre la producción de radicales libres (ROS) medida por citometría de flujo con la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA; a las 0, 2 y 4 horas de incubación en presencia o ausencia de Fe/Ascorbato.

Cabe destacar también que existen diferencias significativas respecto al control en el porcentaje de acrosomas intactos (NAR) tanto a las 2h de incubación como a las 4 horas de incubación [Control (35,4±3,34) y (28,60±2,41); 100 μM (52,8±3,34; P=0,0002) y (43,0±2,41; P=0,0004)], respectivamente, observándose protección del acrosoma. Ver **Tabla 2**.

A pesar de los efectos positivos observados por la cinnamtannina B-1, se detectó una disminución en la viabilidad (YOPRO-1/IP) para concentraciones elevadas de este antioxidante (100 μM: 34,81±7,98) a las 4h con respecto al control (44,96±7,98 P=0,0021) (**Tabla 2**). No se encontraron diferencias significativas respecto al control para el porcentaje de mitocondrias activas a ningún tiempo de incubación. Por lo tanto, no se observó efecto beneficioso alguno del antioxidante para este parámetro.

En cuanto a los daños en el ADN, tampoco hubo diferencias significativas ni en HDS ni en tDFI (SCSA). **Tabla 2**.

| | CTL/Et | 0,1 μ M | 1 μ M | 10 μ M | 100 μ M | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|
| 0h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | 61,40 \pm 3,88 | |
| Viabilidad (%) | 55,96 \pm 9,65 | | | | | |
| Mitocondrias (%) | 34,71 \pm 5,94 | | | | | |
| ADN | HDS (%) | 9,38 \pm 3,88 | | | | |
| | tDFI (%) | 3,33 \pm 1,39 | | | | |
| 2h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 35,40 \pm 3,34 | 34,6 \pm 3,34 | 38,4 \pm 3,34 | 38,6 \pm 3,34 | 52,8 \pm 3,34* | |
| Viabilidad (%) | 43,66 \pm 7,68 | 39,96 \pm 7,68 | 44,25 \pm 7,68 | 44,02 \pm 7,68 | 40,5 \pm 7,68 | |
| Mitocondrias (%) | 24,19 \pm 5,28 | 26,10 \pm 5,28 | 23,03 \pm 5,28 | 31,88 \pm 5,28 | 22,13 \pm 5,28 | |
| ADN | HDS (%) | 5,30 \pm 2,64 | 6,02 \pm 2,64 | 5,31 \pm 2,64 | 4,27 \pm 2,64 | 4,64 \pm 2,90 |
| | tDFI (%) | 6,33 \pm 1,98 | 3,93 \pm 1,98 | 2,97 \pm 1,98 | 3,78 \pm 1,98 | 3,50 \pm 2,17 |
| 4h | | | | | | |
| Acrosoma (NAR,%) | 28,60 \pm 2,41 | 28,0 \pm 2,41 | 28,4 \pm 2,41 | 28,8 \pm 2,41 | 43,0 \pm 2,41* | |
| Viabilidad (%) | 44,96 \pm 7,98 | 37,31 \pm 7,98 | 42,74 \pm 7,98 | 42,65 \pm 7,98 | 34,81 \pm 7,98* | |
| Mitocondrias (%) | 16,73 \pm 5,39 | 16,11 \pm 5,39 | 19,77 \pm 5,39 | 20,31 \pm 5,39 | 14,3 \pm 5,39 | |
| ADN | HDS (%) | 4,72 \pm 1,52 | 4,71 \pm 1,52 | 4,69 \pm 1,52 | 3,71 \pm 1,52 | 4,02 \pm 1,52 |
| | tDFI (%) | 5,23 \pm 2,26 | 2,79 \pm 2,26 | 3,50 \pm 2,26 | 1,89 \pm 2,26 | 2,18 \pm 2,26 |

* Indica que existen diferencias significativas respecto al control (P <0,05)

Tabla 2. Muestras tratadas con oxidante (Fe/Ascorbato). Valores (Media \pm ESM) proporcionados por el citómetro de flujo. % vivos con acrosoma intacto: espermatozoides PNA-/IP-; % vivos: espermatozoides YOPRO-1-/IP-; % mitocondrias activas: espermatozoides MT+; % HDS y % tDFI (SCSA): índice de fragmentación espermática.

En definitiva con el paso del tiempo todos los parámetros del CASA mejoran. Además podemos observar un efecto positivo de la cinnamtannina B-1 respecto al control sobretodo cuando sometemos a los espermatozoides de forma intencionada a estrés oxidativo exógeno (Fe/Ascorbato). En esta situación la concentración más alta (100 μ M) del antioxidante, parece ser la que es capaz de evitar una producción masiva de ROS que podrían dañar al espermatozoide así como evitar un daño a nivel de membrana (peroxidación lipídica) que también podrían dañarlos. Del mismo modo, dicha dosis de antioxidante mantiene intacto el estado de los acrosomas pese a que disminuya levemente la viabilidad de los espermatozoides.

Discusión

En este trabajo hemos estudiado el poder del efecto antioxidante de cinnamtannina B-1 en muestras espermáticas epididimarias de ciervo descongeladas.

De esta manera, es la primera vez que se hace un estudio con la cinnamtannina B-1 en espermatozoides como objetivo principal, ya que hasta el momento solamente se habían evaluado sus efectos positivos como inhibidor de la agregación plaquetaria y regulador de la homeostasia (López et al., 2008). Recordemos que este antioxidante es una proantocianidina natural que modulaba varios procesos biológicos tales como cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre, generación endógena de especies reactivas de oxígeno, fosforilación de la proteína tirosina y agregación plaquetaria.

Nuestros resultados reportan los beneficios de cinnamtannina B-1 sobre los parámetros de motilidad estudiados por el CASA, cuyos valores mejoran todos respecto al control. En cuanto a la viabilidad no podemos afirmar que la adición del antioxidante prolongue la vida del espermatozoide, pero sí que preserva el estado intacto de los acrosomas con el paso del tiempo. De este modo es una antioxidante que a partir de ahora se puede tener en cuenta a la hora de querer conservar dichos parámetros espermáticos, al igual que ocurre con otros antioxidantes ya estudiados como melatonina, ácido lipoico, trolox, crocina, catalasa y superóxido dismutasa. (Fernández-Santos et al., 2007; Domínguez-Rebolledo et al., 2010).

Destacar también como la cinnamtannina B-1 ejerce un efecto protector a nivel de membrana del espermatozoide con el fin de evitar la peroxidación lipídica. Este antioxidante se puede sumar por tanto a la lista de otros antioxidantes que también ejercen dicho efecto: trolox, crocina (Domínguez-Rebolledo et al., 2010).

La adición de cinnamtannina B-1 al medio puede neutralizar también los radicales libres que podrían ser los responsables de bajas tasas de

fertilidad de muestras espermáticas descongeladas. Nuestro antioxidante es capaz de reducir la producción de ROS exógeno y esto es de gran importancia ya que una acumulación excesiva de ROS, tales como los radicales superóxido o peróxido de hidrógeno pueden causar daño a la membrana plasmática y al ADN del espermatozoide (Bennetts y Aitken, 2005). En este sentido, en diferentes trabajos previos se propone la adición de antioxidantes al medio de dilución o congelación para solventar los efectos deletéreos producidos por los ROS (Griveau et al., 1994; Piranaud et al., 1997; Hughes et al., 1998) y la descongelación (Askari et al., 1994; O'Flaherty et al., 1997; Baumber et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2007b) para bloquear o proteger a los espermatozoides del daño oxidativo. Hasta el momento, se han probado gran variedad de antioxidantes que pueden destruir directamente a los ROS o disminuir la toxicidad de éstos sobre el semen de una gran variedad de especies de mamíferos y de aves. Ejemplos de ellos son: la vitamina E (Brigelius-Flohe y Traber, 1999), la vitamina C (Wai-sum et al., 2006; Fernández-Santos et al. 2007a), BHT (Donoghue y Donoghue, 1997), catalasa (Roca et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2007b) y superóxido dismutasa (Berlinguer et al., 2003; Roca et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2007b).

Por último y para concluir, diremos que las dosis más altas de cinnamtannina B-1 mejoran la calidad espermática. En la mayoría de los casos el efecto se potencia en presencia de oxidante, aunque hay muchos casos en los que también hay diferencias significativas en las que no lo tienen. En general, el efecto más significativo corresponde a la concentración de cinnamtannina 100 μ M., De este modo, parece obvio que la adición de cinnamtannina B-1 al medio de congelación podría mejorar los parámetros cinemáticos espermáticos, así como evitar problemas a nivel de peroxidación lipídica que disminuye la producción de radicales libres de oxígeno. En consecuencia, podría mejorarse la capacidad fertilizante de los espermatozoides descongelados de ciervo.

Conclusiones

La cinnamtannina B-1, en general, mejora la calidad de las muestras espermáticas descongeladas de ciervo ibérico.

La cinnamtannina B-1, sin estrés oxidativo exógeno, mejora los parámetros de motilidad objetivos y previene de la peroxidación lipídica de las muestras espermáticas descongeladas de ciervo ibérico.

La cinnamtannina B-1, en condiciones de estrés oxidativo exógeno, mejora los parámetros de motilidad objetivos, protege frente a la reacción acrosómica y la peroxidación lipídica, y previene la producción de radicales libres de muestras espermáticas descongeladas de ciervo ibérico.

La cinnamtannina B-1 tiene escaso efecto o nulo sobre la viabilidad espermática, la actividad mitocondrial y la integridad del ADN.

Bibliografía

Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: Rationale, Significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29:817-827.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003; 79:829-843.

Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2004b; 9:338-347.

Agarwal A, Nallella KP, Allamameni SR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004c; 8:616-627.

Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16, 581-588.

Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl* 2002; 25:191-194.

Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 1994; 33:11-15.

Baumber J, Ball BA, Gravance C, Medina V, Davies-Morel M. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Int J Androl* 2005; 21:895-902.

Ben Amor N, Bouaziz A., Romera-Castillo C, Salido S, Linares-Palomino PJ, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA. Characterization of the intracellular mechanisms involved in the antiaggregant properties of cinnamtannin B-1 from bay wood in human platelets. *J Med Chem* 50. 2007; 16:3937-3944.

Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in

mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71(1):77-87.

Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Superoxide dismutase affects the viability of thawed european mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmatic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:19-25.

Brigelius-Flohé and M.G. Traber. Vitamin E: function and metabolism, *FASEB J* 1999; 13:1145-1155.

Brouwers JF, Silva PF, Gadella BM. New assay for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology* 2005; 63:458-469.

Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Rad Res* 1996; 145:53-541.

Chen H, Chow P, Cheng S, Cheung A, Cheng L. Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J Androl* 2003; 24:704-711.

Christova Y, James PS, Jones R. Lipid Diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Mol Reprod Dev* 2004; 68:365-372.

De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784(1):106-15.

Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos M, Del Olmo E, Bisbal AF, Ros-Santaella J, Garde JJ. Comparison of the C(11) Probes for Assessing Lipid Peroxidation in TBARS Assay and BODIPY Red Deer Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2010; 45(6):e360-e368.

Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR. Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing

Concentrations of Hydrogen Peroxide, and Importance of Individual Male Variability. *Reprod Dom Anim* 2011; 46:393-403.

Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci* 1997; 76:1440-1445.

Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74:1200-1207.

Ezaki N, Kato M, Takizawa N, Morimoto S, Nonaka G, Nishioka I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus, IV. Effects of condensed tannin related compound on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Medica* 1985; 51(1):34-38.

Fernández-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 2006; 66:1931-1942.

Fernandez-Santos MR, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L & Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2007a; 67 738-753.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J Androl* 2007b; 28:294-305.

Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo, AE, Estes MC, Garde JJ, Martínez-Pastor F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa

abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int J Androl* 2009a; 32:353-359.

Fernández-Santos,M., Domínguez-Rebolledo,A., Esteso,M., Garde, J., Martínez-Pastor, F. Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin C supplementation. *Reprod Domest Anim* 2009b; 44: 212-220.

Gopalakrishnan B, Shaha C. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Letters* 1998; 422:296-300.

Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int J Androl* 1994; 17:225-231.

Halliwell B. Antioxidants: The basics-what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 1997; 38:3-20.

Ho KY, Huang JS, Tsai CC, Lin TC, Hsu YF, Lin CC. Antioxidant activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51(9):1075-1078.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13:1240-1247.

Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, del Olmo E, Domínguez-Rebolledo AE, Esteso MC, Montoro V, Garde JJ. Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20(5):547-56.

Millette CF. Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). Academic Press 1999; pp 586-596.

Noguchi N, Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Papas AM (Eds), Antioxidant status, diet, nutrition and health. CRC Press, Boca Raton, Florida 1999; 3-20.

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Rad Biol Med* 2006; 41:528-540.

Parinaud J, Le Lannou D, Vieitez G, Griveau JF, Milhet P, Richoilley G. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. *Hum Reprod* 1997; 12:2434-2436.

Pontbriand D, Howard J, Schiewe M, Stuart L, Wildt D. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1989; 26:341-354.

Pursel V, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1974; 1:63-68.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, García EM, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl* 2005; 26:15-24.

Shams-Borham G, Harrison R. Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gam Res* 1981; 4:407-432.

Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:529-536.

Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1:78-86.

Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59:753-758.

Twigg J, Fulton N, Gómez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13:1429-1436.

Wai-Sum O, Chen H, Chow PH. Male genital tract antioxidant enzymes-Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250:80-83.