

Biología de la Reproducción

Influencia de los factores ambientales en la generación de especies reactivas de oxígeno. Papel en la infertilidad humana

Influence of environmental factors in the reactive oxygen species generation. Role in the human infertility

Cuquerella M.D¹, Peinado I¹, Ruíz I¹, Mohand W¹, Mayoral S², Romeu A¹

¹Servicio Ginecología, Reproducción Humana. Hospital Universitario La Fe, Valencia.

²Departamento Economía de la Empresa, Universidad Carlos III, Madrid.

Resumen

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides es un proceso fisiológico natural. A concentraciones bajas estas moléculas tienen un papel fisiológico, pero en exceso provocan daño celular que puede afectar a la fertilidad humana. Esta concentración en exceso de ROS puede ser debida a causas endógenas (excesiva producción o deficiente funcionamiento de los sistemas antioxidantes) o/y exógenas (factores ambientales).

Objetivo: analizar en la producción de ROS la influencia de los factores ambientales y de los métodos de capacitación utilizados en reproducción asistida.

Material y métodos: se analizaron, en el Hospital Universitario La Fe, muestras normozoospermicas o levemente oligo/astenozoospermicas de 23 voluntarios, 5 de ellos con fertilidad probada. Las muestras fueron procesadas mediante dos métodos de capacitación (swim up y gradientes de densidad).

Resultados: apuntan valores de ROS elevados en las muestras que no consiguen gestación, influencia del factor droga en los niveles ROS y por último muestran una correlación significativa y positiva entre los métodos de capacitación, pero no diferencias significativas entre los dos tipos de selección de espermatozoides.

Conclusiones: el consumo de drogas aumenta la generación de ROS y dificulta la consecución del embarazo.

Palabras clave: ROS. Antioxidantes. Esterilidad. Factores ambientales. Drogasq

Correspondencia: Dra. M^a Dolores Cuquerella Fdez-Vázquez
Avd/ Campanar 21
46009 Valencia

Summary

Reactive oxygen species (ROS) production is a natural process in spermatozoa. These molecules have a physiological role at low concentrations but may cause cellular damage affecting human fertility when they are in excess. This ROS excessive concentration may be due to both endogenous causes (defective function of antioxidant systems or excessive production) and exogenous causes (environmental factors).

Objective: To analyze the influence of environmental factors and capacitation procedures in ROS generation.

Material and methods: Samples of 23 volunteers (5 of them, of probed fertility) were analysed at La Fe University Hospital. They were all normo or moderate oligo/asthenozoospermic. Samples were processed by two capacitation methods (swim up and density gradients).

Results: High ROS levels were found in the samples of the volunteers who can not achieve pregnancy, influence of drug consum in ROS levels and a significative, positive correlation but not significative differences between the capacitation methods.

Conclusions: Drug consum enhances ROS generation and affects negatively to the achievement of pregnancy.

Key Words: ROS. Antioxidant. Infertility. Environmental factors. Drugs.

INTRODUCCIÓN

La producción de ROS es el resultado natural del metabolismo normal de las células aerobias. Como consecuencia de la cadena respiratoria (en la que se consume oxígeno) se generan una serie de moléculas reactivas (conocidas como especies reactivas de oxígeno o ROS) que pueden ser -en exceso- responsables de una situación conocida como “estrés oxidativo”.

Las ROS son compuestos químicos altamente inestables derivados del oxígeno que tienen tendencia a reaccionar con otras moléculas de su entorno a las que modifican oxidativamente primero, para inducir la pérdida de su función biológica después. Entre las ROS son de especial interés los radicales libres: moléculas que presentan un electrón desapareado que genera una gran inestabilidad: entre ellos destacan el anión superóxido ($O_2\cdot^-$), radicales peróxido ($ROO\cdot$) y el anión hidroxilo ($\cdot OH$). Además de los radicales libres existen otras especies reactivas de oxígeno no radicalarias entre las que destaca el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La producción controlada de especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides tiene un papel fisiológico: intervienen en la capacitación, hiperactivación, reacción acrosómica, unión del espermatozoide a la zona pelúcida y fusión con el ovocito (1-3). Sin embargo, cuando hay una producción excesiva de ROS o no funcionan adecuadamente los mecanismos antioxidantes aparece una situación de estrés oxidativo. Estudios recientes proponen que este estrés oxidativo en los espermatozoides puede ser causa de infer-

tilidad (4, 5). Varios estudios han descrito que un 25-40% de los varones con infertilidad idiopática tienen niveles elevados de ROS (6, 7). Además, un estudio prospectivo demostró que varones con altos niveles de ROS tenían 7 veces menos probabilidad de iniciar una gestación que aquellos que tenían niveles bajos (8).

Los espermatozoides humanos son muy sensibles a este estrés oxidativo viéndose afectados a varios niveles:

- **Membrana plasmática:** La membrana plasmática de los espermatozoides es muy rica en ácidos grasos insaturados particularmente ácido docosohexanoico, con 6 dobles enlaces por molécula. Estos ácidos grasos insaturados son esenciales ya que dotan a la membrana la fluidez necesaria para que se produzca la fusión ovocito-espermatozoide. Las ROS atacan estos dobles enlaces provocando una reacción en cadena de peroxidación lipídica que finalmente provoca una pérdida de fluidez de membrana. Esto se traduce en bajas tasas de fecundación. Esta cascada de peroxidación está catalizada por metales como el hierro y el cobre (9).

- **DNA:** Las ROS también atacan al DNA provocando fragmentación. Varios estudios demuestran que altos niveles de ROS son los responsables de la fragmentación del DNA comúnmente observada en espermatozoides de hombres infértiles (10, 11). Este es un aspecto a tener en cuenta a la hora de usar esos espermatozoides para técnicas de reproducción asistida: cuando se realiza una inseminación intrauterina (IA) o una fecundación in vitro (FIV) clásica los daños peroxidativos colaterales en la membrana espermática podrían afectar a la fecundación, pero cuando se rea-

liza una microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) estamos saltando esta barrera natural y espermatozoides con DNA fragmentado pueden ser introducidos en el ovocito afectando al proceso de fecundación o dando lugar a embriones no viables.

- **Apoptosis:** La apoptosis ocurre de forma normal en espermatogonias, espermatocitos y espermátides como mecanismo regulador de la espermatogénesis. Sin embargo, se ha observado que la apoptosis en espermatozoides maduros está relacionada con los niveles de ROS (1). Se encuentra una correlación positiva entre los niveles de caspasa 3 y caspasa 9 (genes que codifican proteasas que intervienen en la muerte celular programada) y los niveles de ROS. Esto ocurre porque altas concentraciones de ROS rompen la membrana mitocondrial interna y externa provocando la salida de citocromo C desde la mitocondria, el cual activa las caspasas. También se ha visto que el gen inhibidor de la muerte celular programada Bcl-2 protege a la célula de la apoptosis por mecanismos que reducen la producción de ROS (12). Esta inducción de la apoptosis se manifiesta en un descenso en el nú-

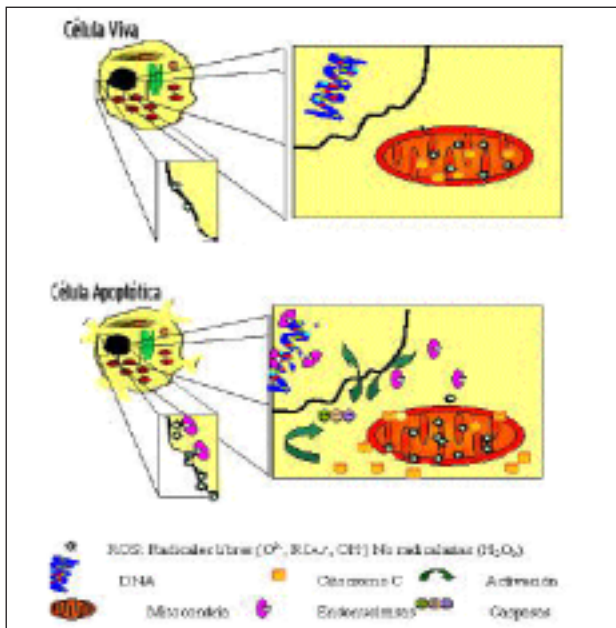


Figura 1

A) *Célula Viva;* Las ROS generadas son insuficientes para provocar el inicio de la reacción en cadena que conduce a la apoptosis. B) *Célula Apoptótica;* se inicia la fase de degradación celular, ya que el aumento de las ROS genera la rotura de la membrana mitocondrial externa e interna, permitiendo la liberación del citocromo C. Este último activa en el citoplasma la cascada de las caspasas que a su vez provocan la ruptura de la membrana plasmática y la degradación del DNA, mediante la activación de las endonucleasas.

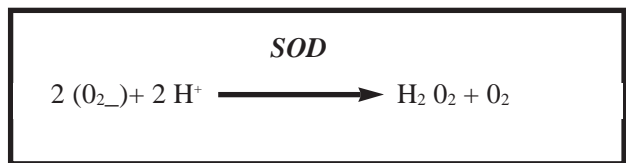
mero de espermatozoides del eyaculado y/o una reducción de la motilidad (Figura 1).

- **Proteínas:** Las ROS provocan además un descenso en la fosforilación de proteínas del axonema que conducen a una disminución de la motilidad (1), inactivación de enzimas glicolíticos (13), descenso del ATP intracelular, aumento de defectos morfológicos de la pieza intermedia y, en definitiva, una pérdida de viabilidad (14)

El plasma seminal contiene una variedad de sustancias antioxidantes para “neutralizar” las especies reactivas producidas por los espermatozoides, de forma que compensan la deficiencia de enzimas citoplasmáticos del espermatozoide. Estos antioxidantes pueden ser enzimáticos, no enzimáticos o coadyuvantes:

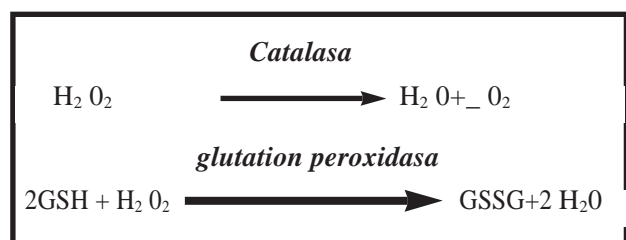
a) **No enzimáticos;** pequeñas moléculas como vitamina C, alfa-tocoferol (vitamina E), tirosina, hipotaurina y ácido úrico.

b) **Enzimas;** como la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) producidas en la cabeza y la cola del epidídimo respectivamente, junto con la catalasa. La SOD transforma el O_2^- en H_2O_2 (menos

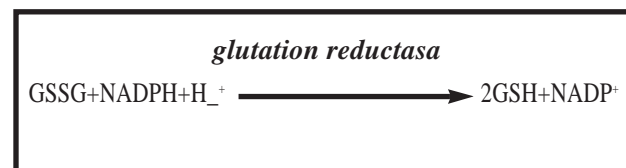


tóxico que el O_2^-), mientras que la glutatión peroxidasa y la catalasa eliminan el H_2O_2 . (14).

El H_2O_2 producido como residuo de la SOD, es eliminado por la catalasa y la glutatión peroxidasa (14). La glutatión peroxidasa elimina el H_2O_2 por medio del glutatión (GSH), ya que lo utiliza como dador de elec-



trones, aunque también es capaz de eliminar otros radicales peróxido (ROO^-) de varios peróxidos.



Para mantener el equilibrio debe actuar el enzima glutatión reductasa de forma que regenere el glutatión.

c) Coadyuvantes o secundarios; su función es servir de apoyo a los anteriores, bien mediante el suministro de sustratos a los sistemas enzimáticos o bien mediante los sistemas de transporte o reparación de estructuras, previamente dañados oxidativamente, como el DNA, proteínas, etc. Entre ellos se encuentra la glutatión reductasa y la glucosa 6-P-deshidrogenasa.

Este mecanismo es de gran importancia pues se ha observado que la actividad antioxidante tiene relación con la fertilidad (15-17) y que los niveles de antioxidantes en el plasma seminal de varones infértiles son significativamente más bajos que los de varones control (18).

Las especies reactivas de oxígeno presentes en el semen son producidas fundamentalmente por dos tipos de células:

a) espermatozoides: Los espermatozoides pueden generar ROS de dos formas (1):

- 1.- El sistema NADPH-oxidasa a nivel de la membrana plasmática, que genera anión superóxido (O₂⁻)
- 2.- La oxido-reductasa NADPH-dependiente a nivel de las mitocondrias.

b) leucocitos: Los leucocitos están presentes en el tracto reproductivo masculino y se encuentran en mayor o menor cantidad en casi todos los eyaculados. Los leucocitos son la mayor fuente de ROS en el semen. Cuando son activados en respuesta a una infección o inflamación producen una gran cantidad de ROS como mecanismo de destrucción de microorganismos. Estas ROS tienen importancia si la concentración de leucocitos es anormalmente alta (leucocitospermia) o cuando se elimina el plasma seminal durante el procesamiento del semen para técnicas de reproducción asistida (pues se eliminan los antioxidantes del plasma).

Además podemos encontrar fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno exógenas. Entre estas fuentes podemos destacar la biotransformación de drogas, el humo del tabaco y otros contaminantes ambientales (18, 19).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es analizar la influencia de varios factores ambientales (consumo de tabaco, alcohol, drogas (cannabis, anfetaminas y alucinógenos), sedentarismo y actividad laboral) sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y su rela-

ción con la esterilidad masculina, partiendo de la hipótesis de que ciertas sustancias afectan al funcionamiento de los sistemas de generación y/o eliminación de ROS en los espermatozoides creando estrés oxidativo (14), que como hemos expuesto tiene efectos deletéreos sobre los espermatozoides. También pretendemos valorar la influencia del método de selección espermática o capacitación "in vitro" sobre los niveles de ROS, generados por los espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) del Hospital Universitario La Fe de Valencia, utilizando muestras seminales -en las que no se identificaron leucocitos- procedentes de 23 varones voluntarios con edades comprendidas entre 18 y 34 años. Los voluntarios fueron divididos en dos grupos: Grupo A (GA): formado por 5 voluntarios de fertilidad probada: con gestaciones espontáneas en curso o a término menores de 1 año. Grupo B (GB): integrado por 2 varones que llevaban más de un año sin lograr gestación (GB1) y 16 voluntarios que todavía no habían intentado conseguir gestación (GB2).

Todos los voluntarios rellenaron un cuestionario en relación a su estilo de vida con respecto a los siguientes factores ambientales (nº cigarrillos tabaco/semana, consumo alcohol (5 niveles), consumo drogas (5 niveles), ejercicio físico (5 niveles) y actividad laboral (3 niveles)). Los factores con 5 niveles se correspondían con: N1 nunca; N2 ocasionalmente; N3 a menudo; N4 habitualmente y N5 alto grado. Mientras que en el caso de la actividad laboral N1 movimiento nulo; N2 variable; N3 movimiento continuo.

Las muestras fueron analizadas según los parámetros convencionales de la OMS de 1999 (valoración macroscópica: volumen, pH, licuefacción, viscosidad y valoración microscópica: recuento, motilidad, morfología, viabilidad, MAR test, test azul anilina, test progresión) teniendo todas ellas valores dentro de los estándares de referencia de la OMS o levemente oligo/astenozoospermicos. Posteriormente, cada muestra se procesó siguiendo 2 métodos de selección: swim-up y gradiente discontinuo de densidad de dos fases (90% y 45%) recuperándose en este último caso los espermatozoides de la fracción 90% (G90) y la suspensión espermática obtenida de la interfase entre la fracción de 45% y la de 90% (G45). Las suspensiones de espermatozoides así obtenidas fueron ajustadas a una concentración final de 1 millón de espermatozoides por mililitro.

La generación de ROS fue valorada mediante quimioluminiscencia utilizando un luminómetro Berthold LB9505C (versión 4.08), espectrofotómetro altamente sensible capaz de detectar la emisión de pequeñas cantidades de fotones. Esta técnica se basa en la capacidad de las ROS de emitir luz al reaccionar con luminol (amino-2,3- dihidro-1,4-phthalazinedione). A cada alícuota de muestra se le añadió luminol y peroxidasa exógena de rábano (HPO), que amplifica la señal quimioluminiscente. Tras esto, se monitorizó la quimioluminiscencia generada durante 5 minutos aproximadamente hasta que se estabilizó la señal (área). En este punto se añadió PMA (Phorbol 12-myristate-13-acetate) que induce la formación masiva de ROS por los espermatozoides y se valoró la cota más alta de luminiscencia generada tras su adición (pico). Los resultados fueron expresados en cuentas por minuto (cpm). FIGURA 2.

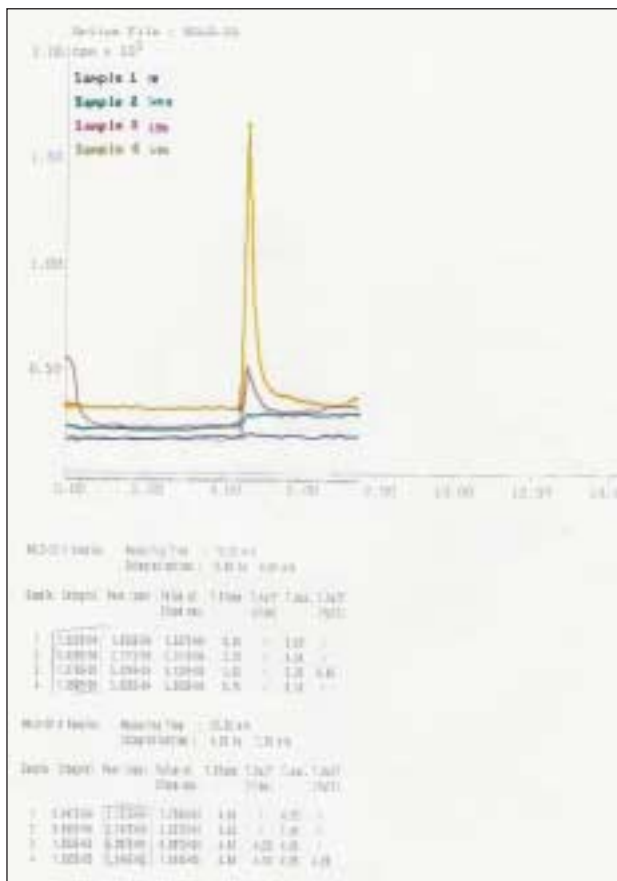


Figura 2

Valoración ROS de una de las muestras estudiadas obtenida del luminómetro Berthold LB9505C (versión 4.08). Se obtiene representación gráfica azul (FM-control), Verde (Swim up), Rojo (gradiente 90%) y Amarillo (gradiente 45%). Facilita también los valores de quimioluminiscencia generada sin inducción (área) y tras la inducción masiva de ROS al añadir PMA (pico)

ción (pico). Los resultados fueron expresados en cuentas por minuto (cpm). FIGURA 2.

RESULTADOS

Tras comprobar a través del test de homogeneidad la igualdad entre el grupo A (GA) y el grupo B (GB) con respecto a las características seminales, no se observó diferencias significativas entre ellos con respecto a la técnica de capacitación utilizada. Sin embargo, se observó mediante una representación gráfica de los valores de ambos grupos que una de las muestras se alejaba de las demás tanto en el área como en el pico que determinaba la fracción del gradiente 45% (G45). Figura 3.

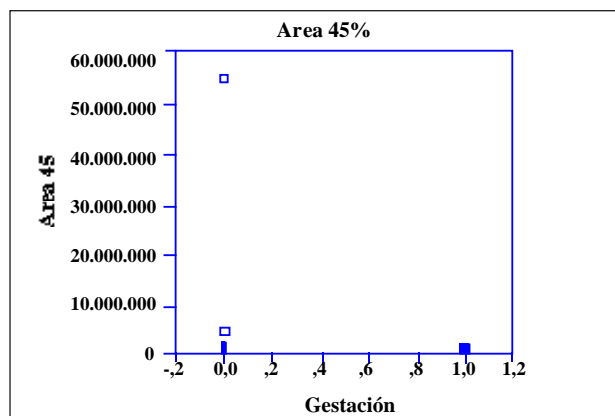


Figura 3

Representación gráfica de los valores en el gradiente de 45% del Grupo A (gestación, valor "1") y Grupo B (no gestación, valor "0"). Se aprecia la existencia de un alejamiento muy marcado de uno de los valores perteneciente al GB, concretamente al GB1 (no logra gestar).

Mediante el estudio de correlaciones se valoró la generación de ROS en cada uno de los métodos de capacitación empleados, observándose una correlación significativa y positiva entre ellos. En el caso del área vimos una correlación positiva entre área gradiente 90% (G90) con área Swim up (SUP) y también una correlación positiva entre área gradiente 45% (G45) con área gradiente 90% (G90). En el caso de los picos existía una correlación significativa y positiva entre el pico del gradiente 45% (G45) con el gradiente 90% (G90).

Con respecto a la capacitación mediante la técnica de gradientes de densidad se encontró que existía diferencias significativas entre todos los picos y tendencias entre las áreas del gradiente 45% y gradiente 90%. Haciendo un Contraste T para la diferencia en-

tre las variables área gradiente 45% y gradiente 90% podemos comprobar como al 95% la diferencia es significativa (p-valor = 0,043). En el caso de los picos la diferencia es significativa, incluso se puede encontrar una relación lineal al 90%, a pesar que el R-cuadrado es bajo (probablemente debido al bajo número de casos).

Aplicando el mismo procedimiento (Test T a la diferencia) no se pudo encontrar diferencias significativas entre áreas y pico del gradiente 90% con el capacitado del Swim up.

Estudiando la relación del área y pico con respecto a los factores ambientales valorados (tabaco, alcohol, drogas, deporte, actividad laboral) y los métodos de capacitación utilizados, se pudo comprobar como únicamente en el caso de las drogas existe una correlación positiva y significativa (siendo no lineal la variación entre las varianzas) entre dicho factor con el área gradiente 45% y área swim up. En el caso de los picos solamente existe correlación significativa, positiva y lineal (nivel de significatividad) con el gradiente de 45%.

CONCLUSIONES

La homogeneidad de los grupos estudiados (GA y GB) con respecto a las características seminales nos valida los resultados obtenidos, ya que ningún parámetro seminal influye en el resultado final. La valoración estadística de los datos no muestra diferencias significativas en los niveles de ROS entre el grupo A y el grupo B. Por ello, nuestros resultados sugieren que, respecto a este test, los varones del grupo B tienen una función reproductora normal. Cabe destacar el hecho de que ninguna muestra del GA tiene valores altos de ROS; y sin embargo, en algunas muestras del grupo GB se observó valores ligeramente elevados de ROS, destacando entre ellas una que presentó valores de ROS extremadamente altos. Entre este grupo de valores altos de ROS (superiores a 1×10^5 cpm), nos encontramos con los dos varones del grupo B1 (varones que llevaba más de un año intentando gestación sin conseguirlo). Por tanto, se refuerza la idea que niveles elevados de ROS pueden ser la causa de esterilidad, como reflejan varios estudios (6, 7).

Uno de los objetivos del trabajo es estudiar la producción de ROS según el método de capacitación utilizado (gradiente de densidad o swim-up). Diversos estudios muestran que el proceso "in vitro" de capacitación incrementa su generación debido a la centrifugación, encontrando valores de 20 a 50 veces mayores de ROS (6). A este respecto, parece que la

duración de la centrifugación es más importante que la fuerza (1). Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en los niveles de ROS entre los dos métodos. Sin embargo, algunos estudios apuntan que el método de gradientes discontinuos de densidad genera menor cantidad de ROS (20), provocando menor fragmentación del DNA en los espermatozoides (21). Probablemente, nuestros resultados se compensen pues con el swim up centrifugamos a más fuerza centrífuga pero durante menos tiempo (500g 8 minutos) que con los gradientes de densidad (300g 20 minutos).

Al realizar un gradiente de densidad de PureSperm los resultados muestran unos niveles de ROS significativamente mayores en la suspensión espermática obtenida de la interfase entre la fracción de 45% y la de 90% (G45) en comparación con los que se observan en la fracción de 90% (G90) (20). Es en esta interfase (G45) donde, debido a la técnica, se acumulan los espermatozoides de menor densidad, es decir, que en esta fracción el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales es menor que en la fracción G90. Uno de los principales defectos morfológicos que se observan en la fracción G45 es la presencia de gotas citoplasmáticas en la pieza intermedia. Nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios previos en los que se observó tras realizar un gradiente de densidad una mayor producción de ROS en la fracción donde se acumulan los espermatozoides inmaduros con anomalías morfológicas de cabeza y retención citoplasmática (13, 22). La generación excesiva de ROS por estos espermatozoides con gota citoplasmática puede reflejar un defecto en la función de las células de Sertoli que no completan adecuadamente la eliminación de citoplasma de los espermatozoides antes de la espermiación, por lo que se liberan del epitelio germinal espermatozoides con citoplasma residual. La presencia de este citoplasma residual potencia la generación de ROS vía mecanismos que parecen estar mediados por el enzima citosólico glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Una cantidad excesiva de este enzima por no eliminación del citoplasma provoca la generación de NADPH, el cual potencia la producción de ROS por una NADPH oxidasa (23). En humanos la prevalecía en el semen de espermatozoides inmaduros con morfología anormal de cabeza y gota citoplasmática es mayor que en otras especies animales. Esto es debido a un control de calidad menos riguroso de la espermiogénesis (13). Sin embargo, el porcentaje de estos espermatozoides en muestras procedentes de donantes es significativamente menor que el encontrado en muestras con parámetros seminales anormales. Esto sugiere

que en estos varones el control de la espermiogénesis es aún menos eficiente, lo que provoca la liberación de cantidades significativamente mayores de espermatozoides inmaduros con retención citoplasmática a los túbulos seminíferos (13). Estos espermatozoides morfológicamente anormales altos productores de ROS causan además un daño oxidativo a los espermatozoides maduros debido a la co-existencia de ambos en los túbulos seminíferos y en el epidídimo. Este daño es el que provoca la pérdida de motilidad y la fragmentación del DNA observadas en los espermatozoides maduros de muestras con altos niveles de ROS (13).

Existen estudios que relacionan la esterilidad con valores altos de ROS debido a factores ambientales (18, 19, 21). Los parámetros ambientales estudiados (consumo de alcohol, tabaco, actividad laboral y deporte) no muestran influencia en los valores de ROS, probablemente debido a que estaban levemente expuestos (niveles bajos, nunca más del N3). Sin embargo, la relación de ROS con las drogas es positiva, pese a no ser consumida en exceso. Los dos varones que llevan más de un año intentando gestación sin conseguirlo tienen un consumo moderado de drogas y presentan niveles de ROS elevados. Este aumento en la generación de ROS probablemente causado por el consumo de drogas puede ser explicado por dos hipótesis, no excluyentes: 1°.- metabolización de estas sustancias en las células, generando radicales libres (8); o 2°.- al presentar receptores sensibles a los cannabinoides como el tetraidrocannabinol (THC), que estimulan directamente a los espermatozoides, provocándoles una hiperactivación a destiempo que eleva los niveles de ROS, de forma que los espermatozoides quedan inviables para la fecundación (19).

Los datos obtenidos en este estudio al valorar las ROS en las 23 muestras estudiadas, nos han aportado información valiosa a cerca de la posible causa de infertilidad de 2 de los voluntarios. Por ello, nos gustaría resaltar la importancia de la realización de este test en pacientes estériles que presenten parámetros seminales normales, ya que el problema puede ser debido a deterioro en el DNA, proteínas, etc. producidos por las ROS. En los casos en los que estos pacientes sean consumidores habituales de drogas, la realización de este estudio estará incluso más justificado.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.:** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
2. **Fernández PJ, Calamera J, Doncel G, Acosta AA.:** Reactive oxygen species (ROS) generation and acrosome Reaction (AR) in human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Assisted Reprod and Genetics*. 1995, 12 (3): 128S.
3. **Fernandez PJ, Doncel GF, Acosta AA, Romeu A.:** Role of reactive oxygen species (ROS) on human sperm acrosome reaction. *Human Sperm Acrosome Reaction*. 1995, 236: 421.
4. **Sharma RK, Agarwal A.:** Role of reactive oxygen species in male infertility (review). *Urology*. 1996; 48:835-50.
5. **Fernández PJ, Romeu A.:** Efecto deletéreo de las especies reactivas de oxígeno sobre el espermatozoide humano: tendencias actuales en el estudio de la infertilidad masculina. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 1993, X (4): 277-286.
6. **Iwasaki A, Gagnon C.:** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.
7. **Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Kohn S, Lynne CM Thomas AJ Jr., et al.:** Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67:1115-20.
8. **Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC.:** Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as a criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 542-551.
9. **Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW.:** Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 1993; 35: 302-315.
10. **Barroso G, Morshedi M, Oehninger S.:** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reprod* 2000; 15: 1338-1344.
11. **Irvine DS, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P and Aitken RJ.:** DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology* 2000; 21: 33-44.
12. **Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al.:** Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262:1274-1277.
13. **Gil-Guzman E., Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr., Agarwal A.:** Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reprod* 2001; 16: 1922-1930.
14. **Sikka S.C.:** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1,e 78-86.
15. **Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J and Lissi**

- E.: Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction* 1996; 11: 1655-1660.
16. **Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R. and Lissi EA.:** Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *Journal of Andrology* 1999; 20: 713-717
 17. **Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr. and Agarwal A.:** Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *Journal of Urology* 1999; 161: 1831-1834.
 18. **Saez G., Oliva M., Muñiz P., Valls V., Iradi A., Ramos M. y Climent J.:** Naranja y Salud Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. Generalitat Valenciana (Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación). 1998, 71-80
 19. **Burkman L.:** Universidad estatal NY, Búffalo. Conferencia Anual de la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva, San Antonio (Texas) Oct.2003.
 20. **Fernández PJ, Luna C, Blanes R, Navarro I, Molina I, Diéguez L.:** Uso razonado de técnicas de selección espermática empleadas en reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*.1998, XV(1): 13-28.
 21. **Mortimer D.:** Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod. Fertil Dev.* 1994; 6(1):25-31.
 22. **Fernández PJ, Doncel GG, Morshedi M, Pleban P. Acosta AA.:** Basal and induced Reactive oxygen species (ROS) generation in different subpopulations of human semen samples". *Fertil Steril* , 1994 (P-222): S190-S191.
 23. **Aitken RJ, Krausz C, Buckingham DW.:** Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation and the presence of leucocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev*, 1994; 39: 268-279.