

Figura 1: Posible ruta de generación de EROs en el espermatozoide.

## ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y SEMEN

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son agentes del tipo de los radicales libres que son creados como residuos por el metabolismo del oxígeno en células que viven en condiciones aerobias. Las EROs proceden de la reducción del oxígeno hasta agua, reacción en la cual los estadios intermedios de esta reducción son altamente reactivos por su estructura electrónica inestabilizada. Este es el motivo por el cual reaccionan con las moléculas del medio, como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, para estabilizarse, produciendo alteraciones de la estructura química y funcional de las moléculas afectadas. Estas especies tan reactivas derivadas del oxígeno incluyen los radicales hidroxilo y superóxido, y el peróxido de hidrógeno.

En el semen humano, son los leucocitos y los espermatozoides los principales productores de estas moléculas. La fuente principal de EROs en el eyaculado son los leucocitos, particularmente los neutrófilos. Esta producción, serviría, en principio,

para combatir los agentes microbianos extraños, aunque también son liberadas al medio como consecuencia de procesos de exocitosis y/o rotura celular. En el espermatozoide, el lugar principal de producción son las mitocondrias, en el metabolismo del adenosín trifosfato (ATP) en el proceso de la respiración. Otra de las fuentes principales de EROs es el enzima NADPH oxidasa, que tiene la misión de oxidar el NADPH a NADP<sup>+</sup> para que las células que lo poseen (espermatozoide y linfocito) dispongan de este cofactor oxidado para poder continuar obteniendo energía a partir del metabolismo de la glucosa. Este enzima genera como metabolitos secundarios EROs y además consume NADPH que sirve a su vez para regenerar el glutatión reducido que es utilizado por la glutatión peroxidasa para detoxificar las EROs (Figura 1). Por lo tanto, este enzima además de generar EROs consume el cofactor enzimático necesario para la detoxificación de las mismas produciendo con ello una mayor concentración de EROs y con ello, el citado estrés (Griveau & Le Lannou, 1997).

Por contra, en las células y secretado en el medio existen sistemas de eliminación de estos agentes dañinos, conocidos como sistemas de detoxificación. Coexiste un gran número de estos mecanismos debido al elevado efecto citotóxico de las EROs. Entre ellos tenemos las sustancias como la  $\alpha$ -tocoferol (vit E),  $\beta$ -Caroteno (vit. A), Ubiquinol, Glutación, Ácido Ascórbico (vit. C), taurina e hipotaurina, epinefrina, lactato y piruvato que son capaces de captar o ceder electrones a estos metabolitos y llevarlos hasta oxígeno o agua (eliminando su citotoxicidad) a costa de un consumo de los mismos cofactores. Y por otro lado tenemos los mecanismos enzimáticos, que serían los dispositivos proteicos de eliminación activa de las citadas EROs. Los enzimas mejor conocidos son: superóxido dismutasa que acelera la disminución del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, la catalasa que continúa la degradación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y el sistema glutatión reductasa/glutatión peroxidasa que catalizan la degradación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos utilizando y regenerando glutatión.

Normalmente existe un equilibrio adecuado entre la presencia de estas moléculas y los antioxidantes que se encargan de eliminarlas (**Figura 2**). Equilibrio que es necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular y el adecuado desarrollo de ciertas actividades fisiológicas. Cuando este equilibrio se rompe, y existe una presencia elevadamente anormal de especies reactivas del oxígeno, nos encontramos en una situación celular de estrés oxidativo. Aunque, bien es cierto que si existiese en el eyaculado un exceso de antioxidantes producirían un déficit de EROs que tampoco sería fisiológico, ya que una cierta cantidad de estas moléculas produce lipoperoxidación de los lípidos de membrana ayudando en la fusión con la zona pelúcida. También se ha visto que la adición de una pequeña cantidad de ROS cuando se iba a capacitar una muestra de semen, mejoraba el proceso de recuperación de

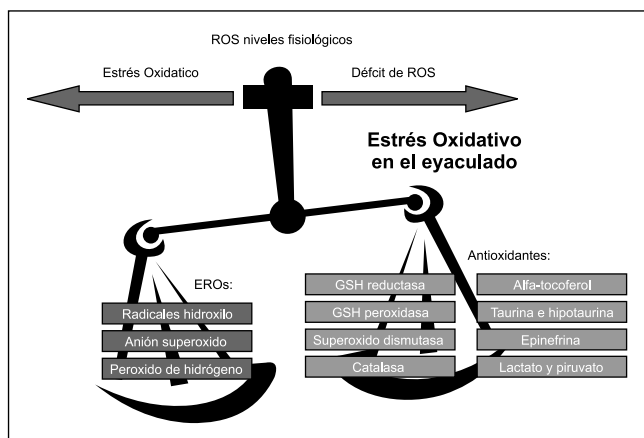
espermatozoides móviles y los ratios de fusión con el ovocito, además de mejorar la reacción acrosómica. Aunque los mecanismos de acción no están esclarecidos (Griveau & Le Lannou, 1997).

### BALANCE EN EL ESPERMATOZOIDE

En el espermatozoide en concreto, diversos grupos han planteado ensayos en los que pretendían estudiar la presencia de estas moléculas y su correlación con los distintos parámetros seminales para determinar como afectan en la calidad del eyaculado. Aunque la controversia está servida, hay trabajos que concluyen que efectivamente es posible establecer que las muestras con una elevada producción de EROs también poseen un porcentaje menor de movilidad. Aunque no encuentran resultados con diferencias significativas cuando estudian la correlación con la concentración de espermatozoides entre diversos grupos de pacientes y donantes, si lo ven para el conjunto de muestras, concluyendo que también está afectada.

En el caso de la morfología los resultados son semejantes a los anteriores en cuanto a significatividad y a correlación negativa, es decir, a mayor EROs menor cantidad de formas normales en la población de espermatozoides en el eyaculado. Dichas anomalías se traducen como un incremento del índice de deformación de los espermatozoides. Las anomalías correlacionadas en este estudio fueron: deformidades nucleares, daño acrosómico, formas borderline, defectos en la pieza media y en la cola y sobre todo se ha encontrado correlación con la presencia de gotas de citoplasma residual en los espermatozoides (Aziz et al, 2004).

Con este estudio, se ha planteado si existe la necesidad de añadir en los análisis clínicos, valoraciones de las EROs, y puesto que la correlación con la morfología es tan fuerte, en principio no sería necesario porque una observación es reflejo de otra y por lo tanto redundante. El valor que refleja mejor la cantidad de EROs en una muestra es el índice de teratozoos o índice de deformación por espermatozoide, que es la media de anomalías por espermatozoide y sirve como indicador. Aunque todavía se deben de esclarecer los mecanismos de causa y efecto para cada anomalía, es decir si las EROs son consecuencia de las formas anormales o viceversa. En el caso de las muestras con espermatozoides con restos citoplasmáticos, debidos a anomalías en la espermiogénesis, se cree que la mayor cantidad de EROs es por la presencia misma de citoplasma. En este citoplasma residual estaría el enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que produciría NADPH que a su vez estimularía el funcionamiento de la NADPH oxidasa y con ello la producción de EROs residuo, tal y como veíamos antes. O por el contrario



**Figura 2:** Balance oxidativo en el espermatozoide.

que fuesen los radicales libres los que alterasen los parámetros de normalidad de estas células, dañando el ADN, o el acrosoma o las membranas.

Debido a que en estas células se produce un estrés oxidativo, es necesario un sistema de detoxificación que asegure el equilibrio fisiológico para que el espermatozoide cumpla con su función reproductiva. En el trabajo de Garrido et al (2004) han estudiado las enzimas que utilizan el glutatión (GSH) como cofactor de detoxificación, y las enzimas encargadas del reestablecimiento del estado redox del mismo. Estos enzimas son: glutatión peroxidasa 1 y 4 (GPx-1 y GPx-4) y glutatión reductasa (GR), así como los niveles del cofactor. Con los datos concluyen que existe una correlación positiva entre porcentaje de formas normales y GPx-4, pero no con el resto de enzimas implicadas en la detoxificación. Tampoco se correlacionaba ningún otro parámetro seminal básico (ni concentración, ni movilidad) con el contenido celular de estas enzimas. Además, la actividad de estas enzimas también es consecuente con la significatividad encontrada para su cantidad, es decir, en muestras con mayor porcentaje de espermatozoides normales también la actividad era mayor. Datos que a su vez están en relación con los del trabajo anterior que encontraban mayor cantidad de EROs.

No sorprenden los resultados obtenidos con la enzima GPx-4 ya que esta es la fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa, que se encuentra en todo el tejido testicular (Foresta et al, 2002). Por otra parte, la actividad de la GR es mucho más baja que la de las GPx que sugeriría que el GSH procedería del plasma seminal.

Sorprende también que para muestras con una reducida proporción (<5%) de espermatozoides de morfología normal, el GSH esté reducido. Se podría considerar que estas muestras al no tener la suficiente capacidad para evitar el estrés oxidativo, perderían la morfología óptima por efecto mismo de las EROs (lipoperoxidación, daño nuclear, etc.). O por el contrario, que los mismos defectos que han sido originados durante la espermiogénesis, sean los responsables de la baja capacidad de almacenar GSH para la detoxificación. O incluso que el GSH sufre una gran demanda para combatir el alto estrés que sufren estas células anormales, y fruto de este consumo, no se encuentren reservas en la célula (Garrido et al, 2004b). Como conclusión podemos decir que el factor masculino está afectado por causa del desequilibrio oxidativo aquí planteado. Ahora nos queda hacer un repaso a la patofisiología de las EROs en cuanto a fertilidad y capacidad de supervivencia tras descongelación.

### **PAPEL EN INFERTILIDAD**

En los últimos años, está habiendo una preocupación creciente con respecto a la declinación progresiva de la

fertilidad masculina. Diversos estudios, basados sobre todo en el análisis microscópico de las muestras del semen, según lo dictado en las pautas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), apoyan esta hipótesis.

Sin embargo, estas afirmaciones son muy polémicas, y hay una carencia de consenso que mantiene la discusión abierta. También es cierto que existe un porcentaje relevante de varones que parecen seminalmente normales, pero que no puede fecundar a una mujer, incluso cuando la mujer no tiene aparentemente ningún problema.

Diversos marcadores moleculares están siendo evaluados para poder comprender los acontecimientos moleculares que participan de la fertilidad y que pueden conducir a un estado subfertilidad por un desajuste de los mismos. Si los comprendiésemos podríamos esgrimir un diagnóstico y hacer diseños más exactos de los protocolos terapéuticos. Entre estos marcadores, el estudio del estado oxidativo en el semen ha emergido como campo prometedor (Agarwal et al, 2003).

Centrándonos ya en el campo de la fertilidad, la mayor parte de esfuerzos están dedicados a esclarecer las causas en materia de factor femenino. Aunque ha aumentado mucho la literatura científica en cuanto a factor masculino, todavía está relegado a un segundo plano. Los estudios de infertilidad en los que se han estudiado la posible implicación de las EROs con las causas de ese problema son numerosos.

Así por ejemplo, en el caso del varicocele se han descrito niveles elevados de producción de EROs que podrían estar dañando las paredes de los túbulos, causando atrofia testicular progresiva y reduciendo así la producción de gametos masculinos, por lo que estos radicales acabarían causando infertilidad en pacientes con varicocele (Weese et al, 1993). En pacientes con infecciones en el algún tramo de las vías urogenitales también está aumentado el nivel de EROs y por consiguiente afectado.

Otro ejemplo típico donde se produce dificultad en la capacidad de gestación es en el caso de las leucospermias. Esta patología se define como la situación o circunstancia en las que la población de células blancas sanguíneas presentes en el plasma seminal supera la concentración de referencia, según la Organización Mundial de la Salud, de un millón de células por mililitro de semen. En varones con esta patología también se han detectado niveles elevados de EROs, no viendo diferencias significativas entre donantes sanos y pacientes sin leucospermia, pero si cuando se analizan las muestras de los pacientes con leucospermia y se comparan con los dos grupos anteriores (Aziz et al, 2004). En estos casos las EROs son producidas por los espermatozoides como en tantos otros casos, pero con el factor añadido de que el anormalmente elevado número de leucocitos

estará también incrementando considerablemente la concentración de las mismas, y por lo tanto dañando el potencial fértil de los gametos, con la consiguiente reducción de la capacidad fecundante.

El factor masculino, en general, está alterado cuando en el semen se da el fenómeno de estrés oxidativo, ya que elevados niveles de EROs están asociados con la inhibición de la función espermática y la viabilidad. El motivo de esa merma en la capacidad de fecundación de los espermatozoides es debido a la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de membrana. Esto trae consigo pérdidas de fluidez que es necesaria para la adhesión del espermatozoide al óvulo. De hecho, se ha reportado que el 40% de los hombres infértiles presentan niveles elevados de EROs. Además, las tasas de fecundación por fecundación *in vitro*, están correlacionadas negativamente con la concentración de radicales libres procedentes del oxígeno. Se ha descrito que estos pacientes inician hasta cinco veces menos gestaciones que pacientes infértiles pero con niveles fisiológicos de EROs (Aziz et al, 2004).

Otro de los temas que ocupan a una parte de los investigadores es la de esclarecer las causas de esterilidad de origen desconocido que afectan al 20% de las parejas que no consiguen un embarazo a término. Si en los análisis clínicos de semen se efectuasen rutinariamente las medidas oportunas de estas moléculas, podría llegar a determinarse si estos pacientes aparentemente normales tienen alterado este parámetro, y con ello se conseguiría reducir ese porcentaje de desinformación. Aunque claro está que esto no es más que una hipótesis y para ello se debe seguir estudiando en este campo. Por otra parte, las moléculas y enzimas implicadas en detoxificación también han sido estudiadas para ver su relación con problemas de esterilidad. Así pues, nuestro grupo también ha estudiado el estatus de fertilidad en términos de GPx-1, GPx-4 y GR en lisados de células seminales, tanto a nivel de ARNm como de niveles de actividad enzimática. Para este fin, nosotros comparamos muestras procedentes de 50 pacientes procedentes de parejas con esterilidad de origen desconocido, es decir, varones con los parámetros seminales aparentemente normales según la OMS, y fueron comparados frente a un grupo control formado por muestras de donantes sanos con fertilidad probada. Los resultados encontrados fueron diferencias significativas en cuanto a cantidad de GPx-4 entre donantes y pacientes estériles (Garrido et al, 2004), siendo ampliamente superiores en personas con mayor proporción de espermatozoides con morfología normal. Información confirmada en otros estudios que hablaban de diferentes isoformas de este enzima y su relación con infertilidad en casos

particulares. Pero, en el caso del mensajero ninguna diferencia fue observada (Garrido et al, 2004b). Esto sugiere un control post-transcripcional de la GPx-4 por parte de moduladores desconocidos.

Por otro lado, deficiencias en selenio también han sido relacionadas con infertilidad en ratas, y ello es porque este oligoelemento es utilizado por la GPx-4 y esto implica una potencial relevancia del papel de la GPx-4 y de otras enzimas que utilizan el selenio. Además, la GPx-4 ha sido descrita como una peroxidasa muy activa en células espermatogénicas, protegiendo del estrés generado por las EROs la rápida división celular, las estructuras proteicas y las mitocondrias (Behne et al, 1996).

Otro dato que apoya todo esto es el que dice que la actividad de la GPx-4 es diez veces menor en pacientes infértiles, sufriendo mayor estrés oxidativo sus gametos (Garrido et al, 2004a; Garrido et al, 2004b). Siendo excesivamente baja en pacientes con menos de un 5% de formas normales en sus eyaculados. La GR también mostraba reducida su actividad.

Además de la GPx-4, en otro estudio se ha demostrado que la superóxido dismutasa, catalasa, GPx y los grupos sulfhidrilo son significativamente más bajos en pacientes infértiles que en los controles y esto implica una relación directa con la fertilidad masculina humana (Nakamura et al, 2002). La 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) y los peróxidos lipídicos se utilizan como marcadores para cuantificar el estrés oxidativo. También han sido comparados en el plasma y en los espermatozoides en hombres subfértiles y fértiles. Los resultados obtenidos fueron que las concentraciones de 8-OHdG y de los peróxidos lipídicos en el plasma seminal del grupo subfértiles eran significativamente más elevados que en los del grupo fértil. Sin embargo, no había diferencias significativas entre los niveles de pacientes con normozoospermia y en pacientes con astenozoospermia. En las cuatro fracciones obtenidas por el capacitación mediante gradientes de Percoll, los niveles de los peróxidos lipídicos en los espermatozoides recuperados de varones subfértiles eran perceptiblemente más altos que los de los controles fértiles.

En otra tentativa por arrojar algo más de luz en esta área, se evaluó el cociente entre los EROs y la CAT (capacidad antioxidante total) en diversas muestras de semen. Los pacientes estériles por factor masculino o con diagnóstico idiopático mostraron niveles perceptiblemente más bajos que los controles, y los hombres diagnosticados de factor masculino pero que iniciaban eventualmente un embarazo a término tenían significativamente más alta la relación EROs-CAT que los que no obtuvieron concepción (Sharma et al, 1999).

Además de todo esto el ambiente y estilo de vida también

participan de la fertilidad y de la producción de EROs, y por lo tanto algo tendrán que decir al respecto.

### **SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA TRAS DESCONGELACIÓN**

La idea de estudiar factores que puedan ser predictivos de las tasas de supervivencia celular en las muestras de semen tras congelación/descongelación, es por la necesidad de solventar problemas clínicos asociados a este hecho. La importancia de una descongelación efectiva de espermatozoides viables es porque en la práctica clínica acuden pacientes con un factor masculino muy severo, y en muchas ocasiones se encuentran con que al ir a empezar un ciclo no disponen de suficientes espermatozoides con movilidad. Aunque la inyección intracitoplasmática puede remediar dicho factor severo y obviar pobres resultados de recuperación espermática, si tuviésemos marcadores moleculares predictivos se podría gestionar mejor el banco y los donantes de semen.

Hasta la fecha, según la bibliografía consultada, hay una carencia de marcadores moleculares para el pronóstico de la calidad de las muestras del semen después de un ciclo de congelación-descongelación. Por otra parte, no hay parámetros espermáticos o características bioquímicas que nos proporcionen un valor predictivo fiable del número de espermatozoides que superarán los ciclos congelación-descongelación. La meta de la actual revisión es la de resumir los conocimientos actuales acerca de la relación existente entre el estado oxidativo de las muestras de semen y la capacidad de recuperación de las muestras tras un ciclo congelación-descongelación y su relación con el balance oxidativo de las células, en términos de los niveles de EROs y de factores de detoxificación (GSH y GPx). Estudios que en muchos casos van encaminados a mejorar los protocolos del almacenamiento en nitrógeno líquido de los espermatozoides. Evidentemente, estos datos siempre pueden servir como indicadores de la calidad de las muestras de esperma cuando descongelemos.

La congelación y descongelación llevada a cabo en las técnicas de reproducción asistida es un proceso físicamente estresante para los espermatozoides. Este proceso genera una considerable y a la vez no predictiva reducción en el número final de células vivas. Las EROs por su parte provocan daños en membrana que pensamos que afectan de forma negativa a estos ciclos de cambio de estado ya que las membranas quedan afectada por lipoperoxidación en pacientes con elevados niveles de EROs.

Se sabe según diversos estudios que han sido referenciados por Schuffner et al, 2001, que los ciclos de congelación-descongelación terminan por afectar al espermatozoide en cuanto a alteraciones estructurales y funcionales. Entre estas alteraciones

está la viabilidad, motilidad y la capacidad de fertilización y todo ello por alteraciones en la integridad de la bicapa lipídica, así como en los lípidos de membrana (Schuffner et al, 2001).

De otro lado, nuestro grupo ha estudiado el efecto de los sistemas de detoxificación y su relación con la capacidad de supervivencia de las muestras. Para ello hemos determinado la expresión y la actividad de los enzimas GPx-1, GPx-4 y GR y el cofactor GSH. Con resultados bastante curiosos; entre ellos tenemos que la actividad de las enzimas GPx-1 y GPx-4 si estaba significativamente en concordancia con la expresión de mensajero y el ratio de recuperación de viables. Además existe una correlación negativa entre los recuperados y el GSH, pero no entre la actividad de GR y la tasa de recuperación. De hecho este enzima presenta una actividad muy reducida en el espermatozoide comparado con los otros enzimas del estudio. En este estudio llegamos a la conclusión de que los niveles de ARNm de la GPx-4 y la actividad de la GPx-1 son predictivos de la tasa de recuperación, pero no con GR con lo que hemos pensado que esta actividad no es realmente importante (Meseguer et al, 2004).

Con esto podríamos pensar que las actividades de las peroxidadas del glutatión ayudan a la supervivencia, en tanto en cuanto eliminan del medio los radicales libres que alteran la membrana, y por lo tanto teniendo unas membranas más intactas, es más probable la supervivencia, aunque la explicación del papel de la GPx-4 resulta más compleja, ya que cuando se está produciendo la espermatogénesis si actúa protegiendo la rápida división celular contra el estrés oxidativo, pero la reducida actividad no explica que evite el estrés en el espermatozoide eyaculado. Esto es porque carece del substrato reductor principal, el GSH. Pérdida que se ha atribuido a los procesos que ocurren durante la maduración final de los espermatozoides (Foresta et al, 2002).

Las concentraciones de GSH se correlacionan inversamente con el ratio de recuperación de espermatozoides vivos, que podría estar correlacionado con la función de la GPx; es decir, una actividad muy baja de GPx aumenta las reservas de GSH, y una actividad muy alta de GPx reduce niveles de GSH. Así pues, en el metabolismo espermático, el GSH de por sí, no inactivaría radicales libres (como ocurre durante metabolismo celular), requiere la mediación de GPx para reducir los componentes oxidativos presentes en los espermatozoides.

La aplicación final de todo esto sería añadir a la muestra de semen la molécula que ayudase en la descongelación. Y aunque el sistema antioxidante si se ha visto relacionado con esta capacidad de

supervivencia, también es cierto que aunque se añadan antioxidantes, como el GSH, no tienen efecto por ellos mismos y no mejora el ratio. Se siguen necesitando los enzimas del sistema, que serían los realmente efectivos.

## CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, está aumentando el interés en todos los factores potencialmente que afectan la fertilidad masculina, puesto que varios estudios parecen apuntar a una disminución progresiva en la fertilidad en las últimas décadas.

Sin embargo, es innegable que hay una considerable carencia del conocimiento de los acontecimientos moleculares que conducen la producción de un semen subfértil.

La identificación de los marcadores moleculares adecuados para diagnosticar una muestra del semen, conjuntamente con el diseño de estrategias terapéuticas apropiadas para combatir defectos y deficiencias, es decisiva para solventar los problemas de factor masculino. Entre ellos, los marcadores del estrés oxidativo son factores relevantes en la fertilidad masculina, puesto que desempeñan un papel significativo en la fisiología del espermatozoide. Una determinación del equilibrio entre estas moléculas y los antioxidantes podría establecer la capacidad reproductiva.

Aunque se están haciendo los esfuerzos necesarios para aumentar nuestro entendimiento en estos sistemas en fertilidad, todavía no tenemos suficientes datos para proporcionar soluciones definitivas a las diversas patologías masculinas del factor y la investigación tradicional sigue siendo necesaria.

De igual modo, en el caso de marcadores predictivos de ratios de descongelación, no existe la forma absoluta de conocer el resultado tras la descongelación, y por ello los científicos debemos continuar con nuestros esfuerzos. El fin último como ya comentábamos anteriormente es tener más criterios de selección de donantes óptimos y mejorar las técnicas de congelación de semen a fin evitar en la medida de lo posibles tratamientos más caros y traumáticos como pueda ser la inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

## RESUMEN

El estudio del semen, a pesar de sufrir un estancamiento a partir del desarrollo de las técnicas de microinyección, sigue avanzando en varios frentes de aplicación. En la actualidad, con la disponibilidad de nuevas técnicas para realizar estudios moleculares, se ha abierto un abanico de posibilidades. Como ejemplo, el balance oxidativo de las células ha sido analizado por diversos grupos

con resultados, en ocasiones, discrepantes. Este equilibrio que depende tanto de las especies reactivas del oxígeno como de los sistemas de detoxificación ha sido ampliamente investigado y han servido para intentar dilucidar su posible implicación en la capacidad de reproducción del hombre. Además, otro tipo de aplicación para el que se ha tratado de ver su influencia, es el que está relacionado con la capacidad de supervivencia espermática en las muestras de semen que tienen que congelarse y descongelarse.

## REFERENCIAS

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79:829-43.
2. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*. (2004) 81(2):349-5.
3. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil* 1996; 106:291-7.
4. Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod*. 2002;67:967-971.
5. Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril*. (2004b) 82(3):1059-66.
6. Garrido N, Meseguer M, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* (2004a) 6(1):59-65.
7. Griveau JF and Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. (1997) 20(2):61-9.
8. Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A and Remohí J. Concentration of Glutathione and Expression of Glutathione Peroxidases 1 and 4 in Fresh Sperm Provide a Forecast of the Outcome of Cryopreservation of Human Spermatozoa. *J Androl* (2004) 25(5):773-80.
9. Nakamura H, Kimura T, Nakajima A, Shimoya K, Takemura M, Hashimoto K, et al. Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105: 155-60.
10. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 1999; 14: 2801-7.
11. Weese DL, Peaster ML, Himsel KK, Leach GE, Lad PM, Zimmern PE. Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol* 1993; 149:64-7.
12. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect of membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod*. 2001;16:2148-2153.