

Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática

Edith Arenas-Ríos¹, Ahiezer Rodríguez-Tobón¹, Blanca P. López Trinidad¹, Fabiola M. Retana Sandoval¹, Ernesto Rodríguez Tobón¹, Javier E. Jimenez-Salazar¹, Miguel A. León-Galván²

Departamento de Biología de la Reproducción¹, Departamento de Biología²
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
México D.F.

[editharenas2000, ahiezerrod]@yahoo.com.mx, blanca.trinidad22@gmail.com, [fby_retana, rotoern, bioquimicajejs]@hotmail.com, leon@xanum.uam.mx

Abstract— Once formed sperm in the testis and they progress through the various stages of sperm differentiation, maturation and capacitation; are carried out several changes in metabolism and energy consumption, which will generate a lot of reactive oxygen species (ROS), same which are inevitably produced during physiological processes that involve oxygen consumption. In the sperm cells has been mentioned that excessive ROS generation is correlated with problems in sperm function; however, if ROS are produced in adequate amounts, is related to aspects of cell signaling. The aim of this work is review the processes in which ROS are involved in sperm physiology that allow the fertilizing capacity of sperm.

Keyword— *Spermatozoa, Oxygen, Reactive oxygen species, Free radicals.*

Resumen— Una vez formados los espermatozoides en el testículo, estos progresan por las diferentes etapas de diferenciación espermática, maduración y capacitación, mismas que se llevan a cabo por diversos cambios en el metabolismo y consumo de energía, que generan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son producidas durante los procesos fisiológicos que involucran el consumo de oxígeno. En los espermatozoides se ha mencionado que una generación excesiva de ERO, se correlacionan con problemas en la funcionalidad espermática, sin embargo, producidas en cantidades adecuadas, se vinculan con aspectos de señalización celular. El presente escrito pretende revisar los procesos en los cuales se involucran las ERO en la fisiología espermática, permitiendo que los espermatozoides adquieran la capacidad fertilizante.

Palabras claves— *Espermatozoides, Oxígeno, Especies reactivas de oxígeno, Radicales libres.*

I. INTRODUCCIÓN

Los átomos y las moléculas están constituidos de partículas subatómicas, que son las responsables de las propiedades químicas de las mismas. En el núcleo del átomo, encontramos a los protones con carga positiva y a los neutrones sin carga, en torno a los cuales encontramos los electrones, con carga negativa y “girando” en torno al núcleo a través de “orbitales”, siempre en pares, siempre neutralizando uno el campo magnético del otro mediante sus giros (spin) opuestos, dándole estabilidad a los átomos y/o a las moléculas. Cuando esto sucede, se suele decir que los electrones están apareados, pero hay que aclarar, que nunca habrá más de 2 electrones en un mismo orbital, así, los átomos más pesados, serán la suma de muchos orbitales semejantes (fig. 1).

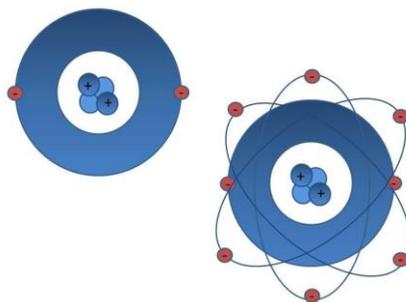


Fig. 1. Estructura del átomo. Protones y neutrones en el núcleo y electrones girando en torno núcleo.

Cuando sucede que un electrón no está siendo neutralizado por otro electrón, ya sea porque hay un solo electrón en un orbital, o porque sucede que no tienen giros opuestos, se dice que se encuentran desapareados, y en este caso, los átomos y/o las moléculas, reciben el nombre de: radicales libres (fig. 2).

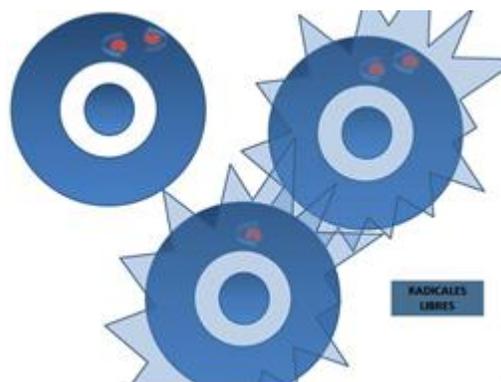


Fig. 2. Estructura del átomo. Los protones y neutrones en el núcleo; los electrones girando en torno al núcleo.

Los radicales libres suelen ser muy inestables, pues estos átomos o moléculas que poseen electrones desapareados buscarán con avidez completar el par electrónico que anule su campo magnético, favoreciendo así la colisión entre las moléculas y su aproximación con ellas. Esta es la razón de que las reacciones en las que intervienen suelen ser muy rápidas, tanto, que el tiempo de vida, en algunos casos, es del orden de milisegundos (1ms) a nanosegundos (1ns) [1, 2]. Sin embargo, pueden reaccionar con otros radicales, caso en el que ambas especies anulan entre sí su campo magnético provocando que ambos radicales dejen de serlo, o puede suceder que la reacción solo involucre un radical libre que robará electrones de moléculas vecinas formando nuevos radicales libres [1].

Una molécula esencial para todos los organismos aeróbicos es el oxígeno, dado que es el principal recurso de energía adquirido del metabolismo oxidativo. Sin embargo el consumo de oxígeno genera diversos derivados, formas activas de metabolitos del oxígeno y moléculas peroxidadas, todas ellas conocidas como especies reactivas de oxígeno [3]. El oxígeno molecular (O_2) es un biradical, teniendo dos electrones desapareados de spin paralelo, y como ya se mencionó anteriormente, las moléculas que no son radicales poseen pares de electrones con spins opuestos, y así, ambos electrones pueden ser aceptados. En el caso particular del oxígeno esto es posible pero poco común, pues las reacciones que involucran al oxígeno son regularmente univalentes, aceptando un solo electrón. Generalmente, las ERO

resultan de la excitación de O_2 para la formación de oxígeno singlete o para la transferencia de 1, 2 o 3 electrones al O_2 para formar el anión superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y al radical hidroxilo ($\cdot OH$) respectivamente [3, 4] (fig. 3).

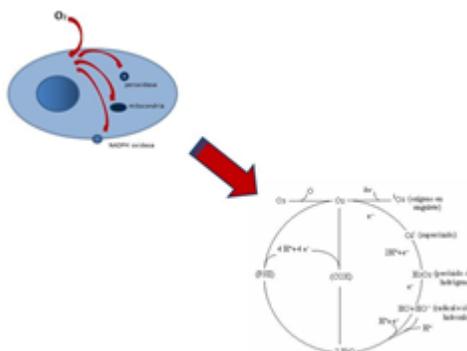


Fig. 3. Producción de Especies de Oxígeno Reactivas por diferentes fuentes fisiológicas

En principio se consideraba que la producción de ERO era perjudicial para los espermatozoides, pues se pensaba que las ERO podían causar oxidación sin restricciones de varios componentes celulares, propiciando la destrucción de la células a través de los radicales libres. Posteriormente, se logró determinar que las ERO no son necesariamente tóxicas para la célula, pues su toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen [2]. Adicionalmente, el estrés ambiental puede causar un incremento en la producción de ERO ocasionando estrés oxidativo. Sin embargo, estas moléculas participan de una manera más controlada en la temprana vía de señalización, de la respuesta fisiológica de la célula [3], y es a partir de los noventas que, se demostró que las ERO son fundamentales para la fisiología espermática en procesos como la maduración y capacitación del espermatozoide [2, 3, 5-9], ahora sabemos, que a concentraciones controladas participan en los mecanismos de transducción celular [2, 10]. Es por estas razones que esta revisión pretende mostrar un panorama general de los procesos en los que se involucran las ERO para que el espermatozoide alcance su potencial de fertilización.

II. PRODUCCIÓN DE ERO POR ESPERMATOZOIDES

Las especies de oxígeno reactivas, como su nombre lo dice, reaccionarán rápidamente con una gran variedad de moléculas, pues el tiempo de vida de cada una de ellas es muy corto (tabla 1). Sin embargo, hace más de cincuenta y cinco años, que se demostró que los espermatozoides de toro, verraco y carnero pueden producir H_2O_2 . Posteriormente se probó que los espermatozoides de conejo son capaces de producirlo por dismutación de O_2 resultado de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) [11-13].

Tabla I. Tiempo de vida y potencial de reducción de las ERO. Datos tomados de Halliwell y Gutteridge [1].

| Tiempo de vida de las ERO | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| Sustancia | Símbolo | Tiempo de vida en seg. a 37°C | Potencial de reducción estándar (V) | |
| Oxígeno | O ₂ | 2 | -0.46 | (-)oxidante (+)oxidante |
| Peróxido de Hidrógeno | H ₂ O ₂ | ----- | 0.32 | |
| Superóxido | ·- | -6 | 0.94 | |
| Hidroxiilo | ·OH | 1 X 10 ⁻⁹ | 2.31 | |

Como fuentes principales para la formación de ERO por espermatozoides, se han propuesto 2 principales: la mitocondria y la NADPH oxidasa. Sin embargo, se ha determinado que la NADPH oxidasa alcanza su actividad máxima en espermatozoides testiculares, pero disminuye gradualmente conforme avanza la maduración del espermatozoide en el epidídimo, pues al parecer uno de los componentes indispensables para la actividad de la NADPH oxidasa, aparentemente, se encuentra ausente en espermatozoides epididimarios [14]. La confirmación del patrón de actividad de la NADPH oxidasa en las diferentes fases de maduración espermática, resulta de gran importancia, ya que de acuerdo con el trabajo de Shukla y col. [14], la participación de las ERO en espermatozoides, producto de la actividad de ésta oxidasa, es inversamente proporcional a su estado de maduración (fig. 4).

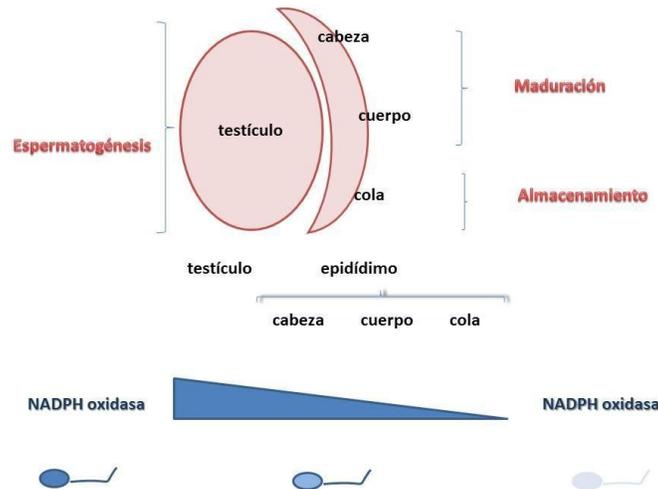


Fig. 4. Producción de ERO por NADPH oxidasa durante su tránsito desde testículo hasta región caudal del epidídimo.

Así, la producción de H₂O₂ por espermatozoides, no solo es resultado de la actividad de la NADPH oxidasa, pues se ha confirmado que depende también en gran medida de la actividad mitocondrial [15], e incluso, se ha demostrado que lo reportado para espermatozoides epididimarios de rata, donde sugieren la actividad de la NADPH oxidasa como fuente primordial de ERO, es en realidad, producto de la actividad de la citocromo-B5 reductasa localizada en células epiteliales, que pudieran haber contaminado la suspensión espermática [9, 16]. Esto acaba con la mayoría de las evidencias sobre la producción de las ERO dada por la actividad de la NADPH oxidasa en espermatozoides epididimarios de roedores, y centraría la atención en la mitocondria como fuente principal de ERO en éstas especies (fig. 5).

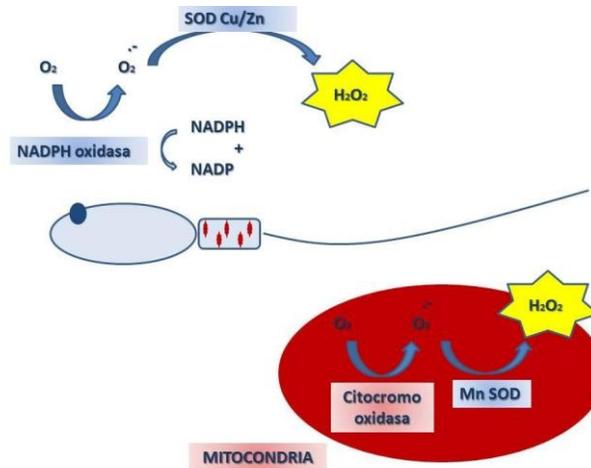


Fig. 5. Fuentes de formación de ERO por espermatozoides. Parte superior: NADPH oxidasa; inferior: Mitocondria.

III. PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN LA FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA

A. Daño por las ERO a los espermatozoides

Cuando las ERO exceden a los sistemas de defensa, se provoca un estado que se denomina estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que puede resultar o en la adaptación o en el daño celular. En el primero de los casos, se obtiene la regulación de los elementos que forman parte del sistema de defensa antioxidante, esto, en un intento por restaurar el balance oxidante/antioxidante de la célula. Sin embargo en el segundo de los casos, el estrés oxidativo puede provocar daños o incluso la muerte celular.

Algunos autores han mencionado que la estabilización de la estructura espermática durante el paso a través del epidídimo, es completada principalmente por la oxidación de los grupos tioles [17, 18]. Sin embargo, durante la maduración, el almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo y hasta el inicio de la fertilización, el daño oxidativo es una amenaza, más que para cualquier otra célula [3]. Puesto que el gran contenido de ácido grasos en la membrana plasmática de los espermatozoides, provoca que sean particularmente susceptibles a ERO [3]. A pesar de lo anterior, las concentraciones fisiológicas de ERO han sido propuestas para que el espermatozoide maduro sea capaz de fecundar al ovocito [15, 19]. Las ERO pueden reaccionar con un amplio rango de moléculas biológicas entre las que se encuentran: los ácidos grasos insaturados de las membranas, los sulfhidrilos de las proteínas y los ácidos nucleicos [1]. Por tal motivo, las ERO están involucradas en una gran cantidad de enfermedades entre las que se encuentra la infertilidad masculina [20].

La exposición de espermatozoides humanos a ERO induce la pérdida de su movilidad, evento que se correlaciona directamente con la lipoperoxidación [21], debido probablemente a los cambios en la fluidez e integridad de membrana y sucesivamente a los problemas para mantener el movimiento flagelar, sumado a esto, la lipoperoxidación desestabiliza otras funciones espermáticas dependientes de la integridad de la membrana, entre las que se encuentran: la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión del espermatozoide con el ovocito [22, 23]. Se ha observado en espermatozoides de humano y hámster, que el efecto provocado por las ERO al ADN incluye: daño oxidativo en sus bases nitrogenadas (modificación y/o supresión), ruptura de la cadena de ADN y re-arreglo cromosómico. Estos daños se han observado, en ambos tipos de ADN: nuclear y mitocondrial [24] (fig. 6).

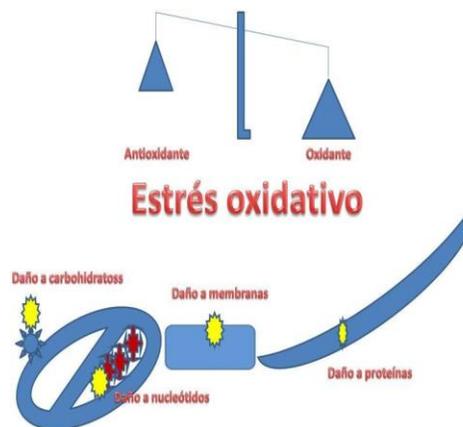


Fig. 6. Principales daños a biomoléculas del espermatozoide por ERO en estado de estrés oxidativo.

B. Efecto positivo de las ERO

Si las ERO son tan peligrosas para los espermatozoides, ¿por qué los mismos espermatozoides son capaces de generar estas moléculas? Se ha determinado que cuando los espermatozoides son liberados del testículo no tienen aún la capacidad de fertilizar al ovocito, es decir, estas células todavía tendrán que sufrir cambios que le permitirán adquirir su capacidad fertilizante, ya sea en el epidídimo, o posteriormente de la eyaculación, en el tracto reproductor femenino. Sin embargo, los espermatozoides son incapaces de llevar a cabo transducción o síntesis de proteínas [25], entonces, ¿de qué manera los espermatozoides podrán llevar a cabo los cambios que le permitirán adquirir su capacidad para fertilizar al ovocito?

Se ha propuesto que las ERO están involucradas en la iniciación de la movilidad del espermatozoide, al incrementar la síntesis de AMPc y la fosforilación de proteínas [5, 15, 19, 26-28]. Se ha sugerido que en algunos tipos celulares, el aumento en la fosforilación de tirosina es resultado de la oxidación y directa activación de las proteínas cinasas [29, 30]. Sin embargo se ha observado que el centro activo de las fosfatasas contiene una gran cantidad de residuos de cisteína, esencial para su actividad [31, 32], de este modo, los efectos inhibitorios del H_2O_2 en la actividad de las fosfatasas, se ha considerado el mecanismo más probable, e indirectamente responsable de la fosforilación de tirosinas [17, 32-34]. El mecanismo preciso en el cual las ERO desencadenan la cascada de señalización es aún incierto. Sin embargo, al adicionar H_2O_2 a espermatozoides de hámster, humanos o bovinos conduce a la fosforilación de tirosina y a la maduración del espermatozoide, la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide con el ovocito [6, 8, 28, 35, 36] (fig. 7).

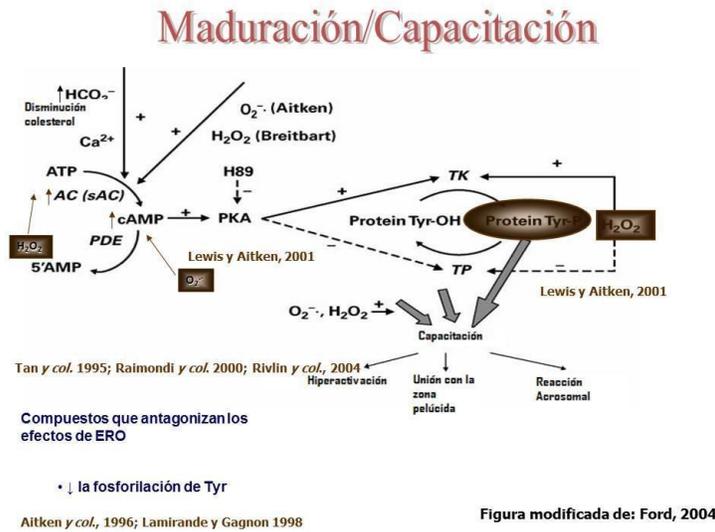


Fig. 7. Principales mecanismos de señalización en los que participan las ERO en la fisiología del espermatozoide.

Así, entre los efectos negativos y positivos de las ERO a los espermatozoides, parece que el buen funcionamiento dependerá de su adecuada regulación por los antioxidantes.

IV. CONCLUSIONES

La generación excesiva de ERO pudieran superar la capacidad antioxidante del espermatozoide, lo cual está relacionado con la subfertilidad e infertilidad masculina. Sin embargo, es importante comprender que sin la participación de las ERO en las vías de señalización que intervienen en los diferentes procesos maduracionales, no se podría llevar a cabo la activación de las diferentes proteínas responsables.

Las ERO actúan a través de la activación de la adenilato ciclasa e inactivación de las fosfatasas; mecanismos fundamentales para la fosforilación de proteínas y que le conferirá al espermatozoide: la adquisición de la movilidad progresiva; de capacitarse y de llevar a cabo la reacción acrosomal, terminando con la posterior fecundación.

Muchos estudios hacen falta sobre las proteínas específicas en las que participan las ERO, no obstante, este conocimiento nos ha permitido comprender mucho mejor los procesos por los cuales el espermatozoide madura, desde su liberación testicular y hasta llegar al tracto genital de la hembra; así como mejorar los sistemas de conservación de espermatozoides sin afectar su fisiología con el uso de concentraciones adecuadas de antioxidantes.

REFERENCIAS

[1] Halliwell, B. and Gutteridge, JMC Free Radicals in Biology and Medicine. JMC 1999. 3rd edn.
 [2] de Lamirande, E., et al., Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod, 1997. 2(1): p. 48-54.

- [3] Chabory, E., et al., Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J Anim Sci*, 2010. 88(4): p. 1321-31.
- [4] Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 2): p. 335-44.
- [5] Aitken, R.J., et al., Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 5): p. 2017-25.
- [6] Aitken, R.J., et al., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 1998. 59(5): p. 1037-46.
- [7] Leclerc, P., E. de Lamirande, and C. Gagnon, Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med*, 1997. 22(4): p. 643-56.
- [8] Lewis, B. and R.J. Aitken, Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod*, 2001. 64(5): p. 1545-56.
- [9] Baker, M.A. and R.J. Aitken, The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. 216(1-2): p. 47-54.
- [10] Bauskin, A.R., I. Alkalay, and Y. Ben-Neriah, Redox regulation of a protein tyrosine kinase in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 1991. 66(4): p. 685-96.
- [11] Holland, M.K. and B.T. Storey, Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. *Biochem J*, 1981. 198(2): p. 273-80.
- [12] Holland, M.K., J.G. Alvarez, and B.T. Storey, Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 1982. 27(5): p. 1109-18.
- [13] Alvarez, J.G. and B.T. Storey, Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 1984. 30(4): p. 833-41.
- [14] Shukla, S., et al., Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 331(2): p. 476-83.
- [15] Ford, W.C., Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(5): p. 387-99.
- [16] Baker, M.A., et al., Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biol Reprod*, 2005. 73(2): p. 334-42.
- [17] Shalgi, R., J. Seligman, and N.S. Kosower, Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod*, 1989. 40(5): p. 1037-45.
- [18] Seligman, J. and R. Shalgi, Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats. *J Reprod Fertil*, 1991. 93(2): p. 399-408.
- [19] Vernet, P., et al., Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 2001. 65(4): p. 1102-13.
- [20] Foresta, C., et al., Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod*, 2002. 67(3): p. 967-71.
- [21] Gomez, E., D.S. Irvine, and R.J. Aitken, Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*, 1998. 21(2): p. 81-94.
- [22] Aitken, R.J., D. Harkiss, and D.W. Buckingham, Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1993. 35(3): p. 302-15.
- [23] Aitken, R.J., D. Harkiss, and D. Buckingham, Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil*, 1993. 98(1): p. 257-65.
- [24] Halliwell, B. and O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991. 281(1-2): p. 9-19.
- [25] Baker, M.A., et al., Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*, 2012. 58(4): p. 211-7.

- [26] Caselli, A., et al., The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem*, 1998. 273(49): p. 32554-60.
- [27] Aitken, R.J., Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl*, 2000. 21(4): p. 491-6.
- [28] Rivlin, J., et al., Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 2004. 70(2): p. 518-22.
- [29] Gamou, S. and N. Shimizu, Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett*, 1995. 357(2): p. 161-4.
- [30] Guyton, K.Z., et al., Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 1996. 271(8): p. 4138-42.
- [31] Tonks, N.K., PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett*, 2003. 546(1): p. 140-8.
- [32] van Montfort, R.L., et al., Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*, 2003. 423(6941): p. 773-7.
- [33] Heffetz, D., et al., The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem*, 1990. 265(5): p. 2896-902.
- [34] Zipser, Y., A. Piade, and N.S. Kosower, Erythrocyte thiol status regulates band 3 phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3-associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS Lett*, 1997. 406(1-2): p. 126-30.
- [35] Bize, I., et al., Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod*, 1991. 44(3): p. 398-403.
- [36] Tan, C.M., S. Xenoyannis, and R.D. Feldman, Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 710-7.