

Apoptosis en espermatozoides

Blanca P. López-Trinidad¹, Mina Konigsberg F.², Alejandro Ávalos-Rodríguez³, Ahiezer Rodríguez-Tobón⁴, Ernesto Rodríguez-Tobón⁵, Fabiola M. Retana S⁵ y Edith Arenas-Ríos⁴

Maestría en Biología Experimental¹, Departamento de Ciencias de la Salud², Departamento de Producción Agrícola y Animal³, Departamento de Biología de la Reproducción⁴, Maestría en Biología de la Reproducción⁵

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa^{1,2,4,5}

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco³

Ciudad de México, CDMX; México

blanca.trinidad22@gmail.com, mkf@xanum.uam.mx, avalosr@correo.xoc.uam.mx, [editharenas2000, ahiezerrod]@yahoo.com.mx, rotoern@hotmail.com,

Abstract— One of the factors favoring sperm capacitation, is the change in the concentration of bicarbonate ion, triggering a series of changes in the architecture of the membrane, allowing the aminophospholipid phosphatidylserine (PS) externalization. However, this same event also occurs in apoptotic cells of different cell types, including the sperm cells. It has been seen that hours after completing the training, the sperm has apoptotic markers, as: breaking double-stranded DNA, mitochondrial malfunction, activation of caspases and outsourcing PS.

Keyword— *Apoptosis, Cell death, Sperm, Sperm capacitation, Sperm apoptosis.*

Resumen— Uno de los factores que favorecen la capacitación espermática, es el cambio en la concentración del ion bicarbonato, activando una serie de cambios en la arquitectura de la membrana, permitiendo que se externalice el aminofosfolipido fosfatidilserina (PS). Sin embargo, este mismo evento ocurre también en células apoptóticas de diversos tipos celulares, incluyendo el espermatozoide. Se ha visto que horas después de haber terminado la capacitación, el espermatozoide presenta marcadores apoptóticos como son ruptura de doble cadena del ADN, mal funcionamiento mitocondrial, activación de caspasas y externalización de PS.

Palabras claves— *Apoptosis, Muerte celular, Espermatozoide, Capacitación espermática, Apoptosis espermática.*

I. MUERTE CELULAR

Desde el punto de vista conceptual, la muerte celular puede ser definida como la degeneración permanente de las funciones celulares vitales. Sin embargo, el límite preciso entre una alteración reversible y la homeostasis, con una pérdida irreversible de las actividades celulares parece difícil de definir. Es por ello que el Comité de nomenclatura sobre la muerte celular (NCCD, por sus siglas en inglés) propone algunas características para definir muerte celular, considerando cualquiera de los siguientes eventos: pérdida de la integridad de la membrana plasmática, la descomposición de la célula en fragmentos discretos (que se refiere comúnmente como “cuerpos apoptóticos”) y su posterior inmersión por fagocitos o por células adyacentes in vitro [1, 2]

No obstante, no todos los tipos de muerte celular entran en esta definición, aunado a que las células que mueren están involucradas en procesos reversibles en sus primeras fases e irreversibles en pasos posteriores. Es por ello que se ha propuesto que este último paso podía ser representado por la activación masiva de caspasas, pérdida de potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\psi_m$), permeabilización completa de la membrana mitocondrial externa o la exposición de residuos de fosfatidilserina (PS) [2].

Sin embargo, también la muerte celular se puede definir de acuerdo a los siguientes criterios: a) apariencia morfológica, misma que puede ser: apoptótica, necrótica, autofágica o asociado con mitosis; b) criterios enzimológicos: con o sin la participación de nucleasas o de distintas clases de proteasas,

tales como: caspasas, calpaínas, catepsinas y transglutaminasas; c) inmunológicas: inmunogénica o no inmunogénica o d) aspectos funcionales: accidental o programada [2].

En este último contexto, la muerte accidental es causada por insultos graves incluyendo aspectos físicos, químicos y mecánicos, entre los que se encuentran: temperaturas elevadas, presiones elevadas, detergentes poderosos, variaciones extremas de pH, etc., y es insensible a cualquier intervención farmacológica o genética[1]. Mientras que, la muerte celular regulada o programada implica una maquinaria molecular codificada genéticamente, y solo se puede integrar en esta clasificación las formas tardías del proceso (activación masiva de caspasas, pérdida de $\Delta\psi_m$, permeabilización completa de la membrana mitocondrial externa o la exposición de PS; ya que este proceso se inicia como un intento de adaptación para restaurar la homeostasis celular.

La respuesta dependerá del estímulo inicial, y generalmente estará implicado algún órgano en especial, el mal plegamiento de las proteínas en el retículo endoplásmico; o puede incluir una respuesta global (como la macroautofagia). Es importante subrayar que, la muerte regulada no solo se produce en consecuencia a perturbaciones microambientales, sino también en un contexto de homeostasis de los tejidos, respuesta inmune o durante el desarrollo embrionario [1]. Dentro de este pasaje se encuentra la apoptosis que cumple ambas funciones.

II. APOPTOSIS

Apoptosis es un término originalmente introducido por Kerr et al [3] y define las características morfológicas de este tipo de muerte celular. Es importante remarcar que apoptosis no es un sinónimo de muerte celular programada o activación de caspasas, ya que la apoptosis también se produce durante el desarrollo fisiológico, y puede no presentar características apoptóticas. Dentro de las características a considerar se encuentran: el redondeo de la célula, la retracción de pseudopodos, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrhexis), poca o ninguna modificación ultraestructural de los organelos citoplasmáticos, formación de vesículas en la membrana plasmática (pero el mantenimiento de su integridad hasta sus etapas finales) e inmersión por fagocitos residentes. Es por ello que la definición debe ampliarse a las células que puedan manifestar varias de estas características morfológicas [2].

Hay dos subtipos de apoptosis que, aunque morfológicamente son similares, se activan a través de diferentes rutas bioquímicas.

III. APOPTOSIS EXTRÍNSECA

El primer tipo de apoptosis involucra la unión de ligandos a los receptores transmembranales de la superficie celular. La súper familia de TNF de receptores de muerte (DRs, por sus siglas en inglés), que tienen como característica poseer un motivo extracelular conservado rico en cisteína, seis diferentes receptores de muerte son conocidos: Fas, TNFR1, DR3, ligando de inducción a la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL; que pueden ser TRAIL-R1 o DR4, y TRAIL-R2 o DR5) y DR6. Cada uno de estos receptores tiene dominios de muerte (DD) intracelulares, que funcionan como proteína de unión a proteínas modula, que desembocan en vías de transducción de señales apoptóticas. Uno de los receptores mejores estudiados es el de Fas. Cuando se une con su ligando natural FasL provoca la oligomerización del receptor, que facilita que la proteína asociada al DD-Fas (FADD) se una al dominio de muerte del efector, en este caso, caspasa 8, que a continuación activa una serie de caspasas aguas abajo que resulta en la escisión de proteínas intracelulares estructurales y reguladoras y que finalmente conducen a la apoptosis (figura 1) [4-6].

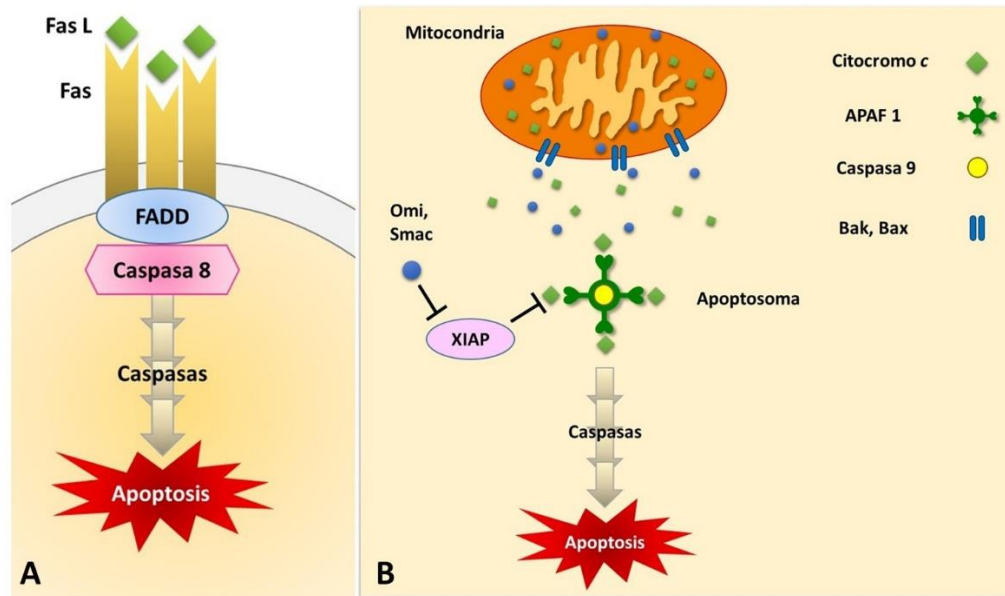


Figura 1. A. Vía de señalización por receptores de muerte (DR). B. Vía de señalización de muerte mediada por la mitocondria [5].

IV. APOPTOSIS INTRÍNSECA

El siguiente tipo de apoptosis es por la vía intrínseca. Esta vía de señalización involucra diversos estímulos que no están mediados por receptores, más bien desencadenan señales intracelulares que actúan directamente dentro de la célula, específicamente, por la mitocondria. Dentro de los factores que pueden desencadenarla está el daño al ADN privación de factores de crecimiento, estrés de retículo endoplásmico, señales de desarrollo [5]; también factores de estrés como: radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres [4]. Todos estos estímulos causan cambios en la membrana mitocondrial interna que resulta en una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación al citosol de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas (citocromo *c*, Smac/DIABLO) y la serin proteasa (OMI), normalmente secuestradas en el espacio intermembranal [4].

Cuando el citocromo *c* es liberado al citosol se une al factor apoptótico 1, activador de proteasa (APAF1), que constituye el andamio alrededor del cual se monta el apoptosoma. La unión citocromo *c*-APAF1, provoca la hidrólisis de APAF1 que permite la oligomerización de siete unidades de citocromo *c*-APAF1, para constituir el apoptosoma activo en donde se ensambla la caspasa 9 y a su vez ser activado. Posteriormente activaran a las caspasas efectoras, para llevar finalmente a la muerte celular [5]. Por otro lado, Smac y Omi potencian la actividad del apoptosoma antagonizando al inhibidor de caspasa e inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP)[4-6].

Uno de los reguladores de la permeabilidad de la membrana externa son las proteínas miembros de la familia de Bcl2, y pueden ser anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG) y pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xL, Bad, entre otras). Directamente, Bax y Bak son responsables de la pérdida de la permeabilidad de la membrana. Cuando las proteínas BH-3 (Bid, Bim, Bad, y Noxa) se unen a Bax y Bak a través de una interacción transitoria, las activan permitiendo la formación de oligómeros que se insertan en la membrana mitocondrial externa formando un mega poro, permitiendo la salida de los componentes mitocondriales. Otras condiciones como el calor, el cambio del pH y cambios en el medio lipídico, pueden activar los efectores de manera independiente a BH-3. Cabe

señalar que BH-3 puede ser escindida y activada por la caspasa 8, coordinando una regulación cruzada entre ambas vías, intrínseca y extrínseca [4-6] (Figura 1).

Es importante destacar que existen otras adicionales que incluyen la performina/granzima, que inducen la apoptosis por medio de la granzima A o granzima B y la vía de p53 [7].

El proceso de la apoptosis es especialmente importante en el contexto de las células germinales ya que experimentaran la mitosis y la meiosis y durante estos procesos pueden generarse errores, que crean la necesidad de inducir la muerte celular para eliminar a las células con defectos genéticos. La buena organización de la población de las células germinales es vital para el proceso de espermatogénesis y la fertilidad masculina.

V. APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDE

A. Testículo

La espermatogénesis es un proceso dinámico y sincronizado de diferenciación, que parte de una espermatogonia redonda; hasta formar la célula aerodinámica, alargada con flagelo, que conocemos como espermatozoide. Este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos, presentes en el testículo [7], y la apoptosis juega un papel muy importante, ya que se encarga de controlar el número de células germinales y eliminar las células germinales defectuosas. Lo anterior se lleva a cabo durante el desarrollo testicular y la espermatogénesis, por lo que debe de existir un balance entre la apoptosis y la sobrevivencia celular, para mantener la homeostasis.

Cuando los gonocitos se diferencian en espermatogonias, hay una fase en la que muchas células mueren por apoptosis, proceso conocido como primera ola de espermatogénesis. Durante este proceso se ha visto que la vía intrínseca de la apoptosis es la que lleva la batuta. El Bax y Bad (dependiente de p53), citocromo C, caspasa 2, 8 y 9 se han visto involucradas, mientras que la familia de Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w, también está involucrada en la regulación, como antiapoptóticas [7, 8]. Sin embargo, la vía de la apoptosis comandada por Fas también se ha visto expresada en testículo [1] y se ha visto implicado en el mecanismo de control de calidad de los gametos, cuando expresan el receptor a través de la activación de caspasa 3 [7].

B. Eyaculado

Una vez que el espermatozoide es eyaculado y entra al tracto reproductor de la hembra, termina su proceso de modificaciones, que lo hace capaz de reconocer al ovocito y que culminará en la fertilización. Para que esto ocurra necesita pasar por un grupo de cambios en el tracto reproductor de la hembra (aunque también se puede inducir *in vitro*) denominado capacitación. Estos cambios en el espermatozoide se caracterizan por el cambio del patrón de movilidad activado (movimiento sincrónico y rectilíneo) al patrón de movilidad hiperactiva (movimiento asincrónico, no progresivo); lo anterior es resultado de una serie de cambios bioquímicos, entre los que se encuentran: la pérdida de colesterol de la membrana e incremento en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, cambios en los niveles redox dependientes de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), producidos por el mismo espermatozoide. Sin embargo, solo unos pocos espermatozoides alcanzaran a fertilizar al ovocito con éxito, los demás estarán destinados a morir por apoptosis [9].

Una de las causas que desencadenan la apoptosis es la sobreproducción de ERO por parte de la mitocondria debido a un desarreglo de la cadena transportadora de electrones, que genera lipoperoxidación de la membrana. Este evento favorece dos procesos, el primero es la salida de los componentes mitocondriales tales como el citocromo c que desencadenaran la apoptosis intrínseca de la apoptosis [9-11]. La oxidación del colesterol de la membrana es otro desencadenante, ya que favorece que, la membrana de la mitocondria sea más fluida, favoreciendo la cascada intrínseca de la

apoptosis [10]. La producción de ERO por la NADPH oxidasa (como la Nox 5), localizada en la membrana del espermatozoide, también puede contribuir a este mismo proceso de desestabilización de la membrana plasmática favoreciendo además, que el espermatozoide pierda movilidad y que la membrana deje de ser funcional [11] (Figura 2).

Seguido de la generación de ERO o ERN y la pérdida de la movilidad, el espermatozoide presentará una externalización de fosfatidilserina y posteriormente después de 4 horas presentará caspasas activas [9].

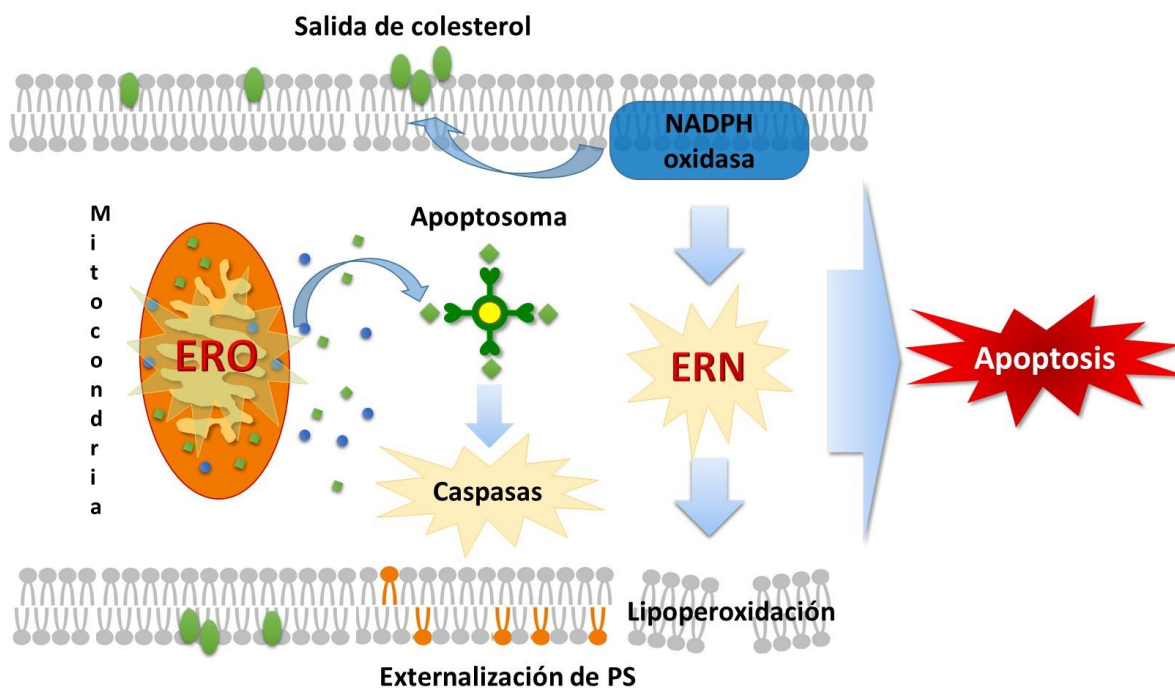


Figura 2. Probable proceso de la apoptosis en espermatozoides eyaculados.

Es necesario conocer y dilucidar los mecanismos que se pudieran llegar a generar en el espermatozoide, durante su tránsito por el epidídimo, ya que, se conoce poco de los procesos relacionados con la apoptosis, que pudieran ocurrir durante su tránsito por el conducto epididimario, y considerar las implicaciones que pudieran llegar a tener en la maduración espermática, en algunas patologías o en el envejecimiento.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó con apoyo de la beca de Maestría en Biología Experimental y con las becas de la Maestría en Biología de la Reproducción Anima de la Universidad Autónoma Metropolitana de los alumnos: Blanca P. López Trinidad, Ernesto Rodríguez Tobón y Fabiola Retana Sandoval del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que pertenecen al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT.

REFERENCIAS

- [1] Galluzzi, L., et al., Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 2015. 22(1): p. 58-73.
- [2] Kroemer, G., et al., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 2009. 16(1): p. 3-11.
- [3] Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
- [4] Elmore, S., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 2007. 35(4): p. 495-516.
- [5] Green, D.R. and F. Llambi, Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7(12).
- [6] Schultz, D.R. and W.J. Harrington, Jr., Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 2003. 32(6): p. 345-69.
- [7] Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010. 365(1546): p. 1501-1515.
- [8] Xu, Y.-R., H.-S. Dong, and W.-X. Yang, Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or guards? *Gene*, 2016. 582(2): p. 97-111.
- [9] Aitken, R.J. and M.A. Baker, Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*, 2013. 57(2-4): p. 265-72.
- [10] Aitken, R.J., The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. *Biol Reprod*, 2011. 85(1): p. 9-12.
- [11] Aitken, R.J., M.A. Baker, and B. Nixon, Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl*, 2015. 17(4): p. 633-9.