



Sustancias reactivas del oxígeno en semen

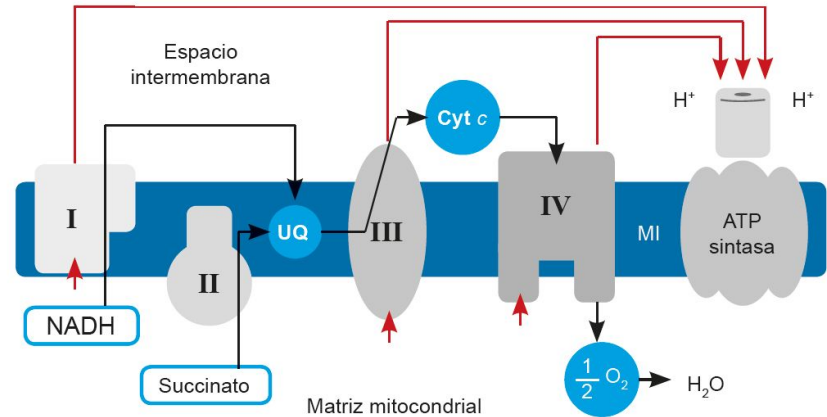
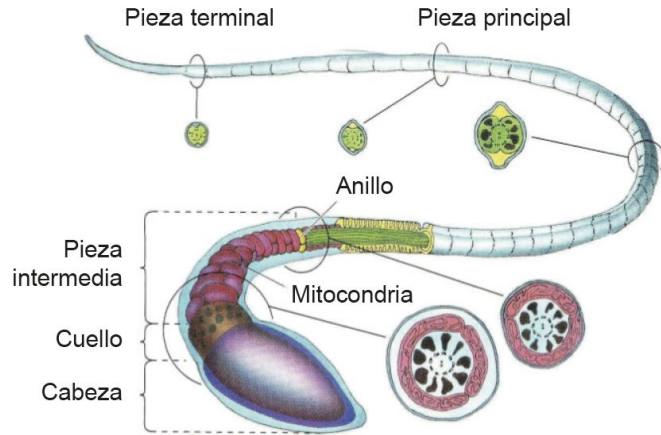
Aspectos inmunológicos del proceso reproductivo 2020
Grupo 2



En casos de infertilidad masculina idiopática es frecuente encontrar en el semen elevadas concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ERO). Generalmente se deben a un incremento en la producción y no a una reducción en la capacidad antioxidante del plasma seminal.



Especies reactivas de oxígeno



Radicales libres

Un radical libre se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados.

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y suele ser más reactiva que su correspondiente no radical. Los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno.

Radicales	No-radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	Oxígeno singlete (1O_2) forma $^1\Delta$
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
	Ácido hipobromoso ($HOBr$)

Estrés oxidativo



Pérdida del **balance** entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes.

- Aumento en la producción de ERO
- Disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación
- Combinación de estos factores

En esta situación se presentan daños de las macromoléculas por la ruptura o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso, la muerte de la célula.

Estrés oxidativo en los espermatozoides



Daño que sufren los espermatozoides después de que son eyaculados.

Las ERO causan:

- **Disminución de la motilidad**
- **Daño en la membrana del espermatozoide**
- **Alteraciones de sus estructuras vitales** como componentes citoplasmáticos, principalmente al material genético (ADN) y por lo tanto, incapacidad para llevar a cabo la fecundación del ovocito de manera normal.

Aunque pequeñas cantidades de ERO son necesarias para mantener la función normal de los espermatozoides, estas pueden provocar pobre desarrollo embrionario y baja fertilidad.

Disminución de la motilidad



- ★ Las ERO inducen peroxidación de la membrana del esperma, disminuyendo la flexibilidad y por lo tanto el movimiento de la cola
- ★ Las ERO dañan directamente a las mitocondrias, disminuyendo la energía

★ ↓ **fosforilación de proteínas del axonema**



**Inmovilización del
espermatozoide**

Reducción en la fluidez de la membrana

Daño sobre las macromoléculas



Lípidos

Lipoperoxidación → RL oxida cadena insaturada de lípido → lípido hidroperoxidado y radical alquilo.

Alteraciones en la estructura de membrana → afecta fluidez y daño en su integridad.

Generación de especies citotóxicas

Proteínas

-Oxidación de R de AA

-Ruptura de enlaces peptídicos

-Agregación entre proteínas.

-Pérdida de la actividad catalítica de enzimas

-Daños en la integridad de proteínas estructurales

-Interrupción de regulación de las vías metabólicas.

Daño sobre las macromoléculas



Ácidos nucleicos

Daño al ADN → reacción con bases nitrogenadas y desoxirribosa.

Presencia de ERO → **fragmentación del ADN**

→ fragmentos internucleosomales



problemas en compactación y
enrollamiento del ADN dentro de la
cromatina

Mecanismos de reparación del ADN → se activan cuando sufre modificaciones oxidativas.



continúan a revisar que exista una adecuada secuencia de bases en el ADN

Fragmentación del ADN espermático



Daño multifactorial. Puede producirse en cualquier etapa del proceso espermatogénico.

↑ niveles de ERO → fragmentación del ADN → apoptosis de las células germinales
→ disminución de concentración espermática
→ deterioro de calidad seminal

Magnitud del daño inducido por RL durante el tránsito por el epidídimo depende de:

- niveles de RL producidos por zoides inmaduros
- presencia de células epiteliales o leucocitos activados en el epidídimo
- niveles de enzimas antioxidantes presentes en la luz del epidídimo

Fragmentación de ADN en zoides eyaculados > zoides testiculares o epididimarios.

Efecto sobre la capacitación espermática



CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA → modificaciones a nivel molecular luego de la maduración, que le confiere capacidad de fecundar el ovocito.

ERO → regulan la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de AMP cíclico y en la fosforilación de proteínas asociada con el eflujo de colesterol.

Cambios a nivel de
Activación de vías de señalización intracelular

} necesarios para que el espermatozoide adquiera la capacidad de responder a los estímulos inductores de la exocitosis acrosomal.
la membrana plasmática

Mecanismos antioxidantes



Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato.

Clasificación de antioxidantes



- Agentes que catalíticamente remueven los radicales libres y a otras especies reactivas.
- Proteínas que disminuyen la disponibilidad de los prooxidantes tal como los iones de hierro o cobre, y el grupo hemo.
- Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño (incluyendo estrés oxidativo) por otros mecanismos.
- Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO y ERN (Especies reactivas de nitrógeno).

Evaluación de las ERO



Métodos directos:

- Mide la concentración del agente oxidante.
- Desventaja: vida media corta
- Los espermatozoides se exponen a una solución de luminol y se monitorea la señal por quimioluminiscencia

Métodos indirectos:

- Se miden los productos formados después del ataque del oxidante sobre las proteínas, lípidos y ADN
- Los compuestos reaccionan con el ATB generando MDA que puede medirse espectrofotométricamente
- Desventaja: poca sensibilidad y la formación de MDA no es total

Evaluación de las ERO



MOST

- Estima la resistencia de los espermatozoides a la lipoperoxidación
- Mide los cambios en la movilidad espermática cuando los espermatozoides móviles se incuban a 40°C
- Niveles bajos de MOST ———>aumenta la lipoperoxidación alterando la capacidad fecundante.

POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN (ORP)

- Se utiliza para medir los niveles de oxidantes y antioxidantes en varios fluidos biológicos
- Se desarrolló el MiOXSYS basándose en una medida galvánica
- Mide con precisión el estrés oxidativo

Alteraciones seminales asociadas a las ERO

Oligozoospermia y criptorquidia

La oligozoospermia se caracteriza por:

una baja concentración de espermatozoides en el semen,

- ✓ Es moderada cuando es menor a 15 millones de espermatozoides/ml de semen
- ✓ Es severa cuando es menor a 5 millones de espermatozoides/ml.

La criptorquidia es una patología congénita que afecta el 4 a 5% de niños recién nacidos.

La exposición del testículo a la temperatura corporal altera el proceso espermatogénico, y además representa un factor de riesgo de cáncer testicular.

Varios autores demostraron que los espermatozoides de pacientes con oligozoospermia o con antecedentes de criptorquidia, producen niveles elevados de ERO con incremento significativo en la extensión del daño en el ADN.

Alteraciones seminales asociadas a las ERO



Varicocele

El varicocele es una dilatación anómala de las venas del plexo pampiniforme, las cuales desempeñan una función importante en el mantenimiento de la temperatura testicular mediante un mecanismo de intercambio contracorriente con la arteria espermática, manteniendo la temperatura gonadal aproximadamente en 35°C.

- Varios investigadores reportaron que el varicocele está asociado con elevados niveles de ERO producidos por el espermatozoide y disminución de la capacidad antioxidante del plasma seminal.
- Los estudios de la calidad y la funcionalidad espermática en hombres con varicocele, mostraron:
 - menor porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva,
 - mayor porcentaje de gametas masculinas muertas,
 - aumento de alteraciones en la morfología espermática y disminución del porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.

RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ESPERMA CON LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN MUESTRAS DE SEMEN (agarwal 1994)

Los niveles de especies reactivas de oxígeno se compararon en muestras de semen de hombres presuntamente infértiles y de voluntarios normales, y se correlacionaron con otros parámetros del semen como:

- * Concentración de espermatozoides
- * La velocidad
- * La motilidad
- * La morfología,
- * La prueba de hinchazón hipoosmótica
- * Los resultados de la prueba de penetración del moco bovino-cervical.

TABLE 1. Comparison of reactive oxygen species values in infertile patients and normal donors

Reactive Oxygen Species Level (mv./sec./10 ⁹ sperm)	Pts. (69)	Donors (15)	All Subjects*		All White Blood Cell Neg.	
			White Blood Cell Neg. (64)	White Blood Cell Pos. (20)	Pts. (51)	Donors (13)
Mean	17.68 ± 4.74	5.51 ± 3.29	15.55 ± 3.79	8.76 ± 4.22	17.37 ± 5.90	6.09 ± 3.79
Probability		0.0075		Not significant		0.0054
Peak	23.44 ± 0.07	7.56 ± 3.50	21.66 ± 5.59	10.42 ± 4.46	19.99 ± 6.50	8.28 ± 4.02
Probability		Not significant		Not significant		Not significant

Values are mean ± standard error.

* Includes patients and donors.

TABLE 2. Reactive oxygen species values for white blood cell-negative semen specimens from infertile patients according to sperm morphology and motility

Reactive Oxygen Species Level (mv./sec./10 ⁹ sperm)	White Blood Cell Neg.			
	Morphology		Morphology and Motility	
	Normal (20)	Abnormal (27)	More Than 50% (10)	Less Than 50% (24)
Mean	6.08 ± 1.43	24.64 ± 7.99	7.24 ± 2.05	16.89 ± 3.38
Probability		0.0491		0.0490
Peak	4.80 ± 1.41	17.21 ± 5.45	9.21 ± 2.15	19.4 ± 4.15
Probability		0.0389		Not significant

Values are mean ± standard error.

Especies reactivas de oxígeno y motilidad espermática

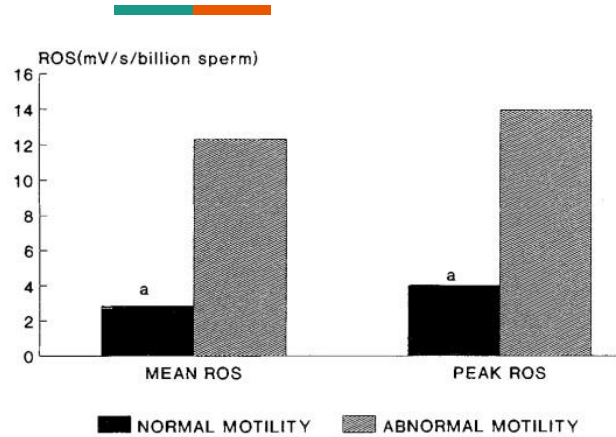


FIG. 1. Comparison of reactive oxygen species (ROS) levels between all subjects with normal and abnormal motility. *a*, $p < 0.01$ compared to reactive oxygen species levels in subjects with abnormal motility.

Un total de 37 muestras con motilidad espermática normal de pacientes y donantes mostraron una formación de especies reactivas de oxígeno significativamente menor (media $2,83 \pm 1,07$, pico $4,02 \pm 1,18$, fig.1) que 44 muestras con motilidad espermática anormal (media $12,31 \pm 3,06$, pico $14,04 \pm 3,48$).

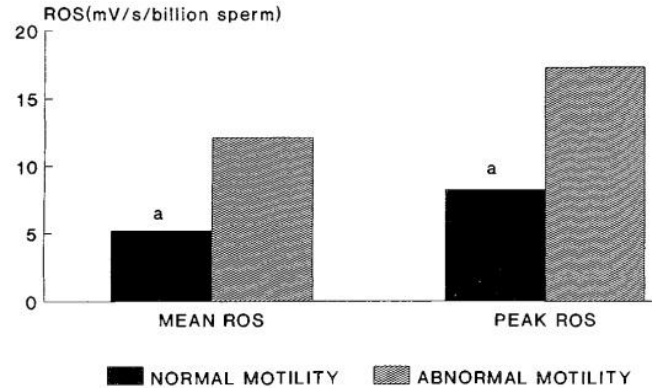


FIG. 2. Comparison of reactive oxygen species (ROS) levels between white blood cell-negative subjects with normal and abnormal motility. *a*, $p < 0.01$ compared to white blood cell-negative, abnormal motility population.

Las muestras de pacientes y donantes negativas a los glóbulos blancos con una motilidad de los espermatozoides superior al 50% (27) mostraron una formación de especies reactivas de oxígeno significativamente menor (media $5,20 \pm 2,99$, pico $8,27 \pm 4,82$) que 37 muestras negativas a los glóbulos blancos con menos del 50% de movilidad de los espermatozoides (media $8,27 \pm 4,82$, pico $17,33 \pm 4,08$, fig.2).

Conclusión



- Una posibilidad alternativa es que la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno pueda ser una consecuencia (más que una causa) de un defecto primario en la diferenciación de la membrana plasmática espermática.
- **La falta de detección de altos niveles de formación de especies reactivas de oxígeno en el semen de voluntarios normales es consistente con la hipótesis de que los espermatozoides anormales son la fuente principal de producción de especies reactivas de oxígeno.**
- La presencia de especies de oxígeno reactivo en exceso en el semen muestra una fuerte relación positiva con una mala concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides.



Formación de ERO en espermatozoides de pacientes infértiles. (1992)

- ★ Incidencia en la formación de ERO en pacientes que consultaron por infertilidad
- ★ Se estudió el semen completo y espermatozoides lavados con Percoll o por centrifugaciones repetidas.
- ★ Se midió la formación de ERO con luminómetro.
- ★ Resultados: la formación de ERO fue detectada en el 40% de los espermatozoides de pacientes infértiles y no se generó en los pacientes control. Esto sugiere que la formación de ERO puede ser causa de infertilidad masculina.

Especies reactivas del oxígeno en el semen de pacientes infértiles: niveles de actividad tipo superóxido dismutasa y catalasa en plasma seminal y espermatozoides (1993)

- ◆ **Objetivo** → determinar si las ERO detectadas en muestras de semen de hombres infértiles se produjeron por una disminución en la capacidad de eliminación de ERO o un incremento en su producción.
- ◆ Se analizaron muestras de semen completo, espermatozoides lavados con Percoll, plasma seminal completo, dializado y ultrafiltrado de pacientes que consultaron por infertilidad.
- ◆ Se midió la formación de ERO con un luminómetro
- ◆ Se investigaron actividades:
 - Actividad tipo catalasa en plasma seminal → responsable de la degradación de H_2O_2
 - Actividad tipo superoxido dismutasa en plasma seminal → responsable de la degradación de $\cdot O_2^-$
 - Actividad tipo catalasa y SOD en espermatozoides



◆ Resultados

El 25% de los pacientes (16 de 65) tenían niveles detectables de ERO en su semen. En 14 de estos 16, las ERO se midieron en espermatozoides lavados con Percoll, mostrando que **los espermatozoides son una fuente importante de ERO en semen.**

No hubo diferencia en la actividad tipo SOD en plasma seminal y espermatozoides entre muestras de semen que produjeron o no ERO.

La actividad tipo catalasa de plasma seminal y de espermatozoides fue mayor en muestras productoras de ERO que en muestras que no produjeron ERO.

Conclusión: los niveles detectables de ERO en el semen de pacientes infértiles son probablemente debidos a un aumento de la producción de ERO en lugar de una capacidad reducida para eliminar ERO.



¡Muchas gracias!