

Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en plasma seminal y sangre en cerdos reproductores



Néstor Alonso Villa¹, Luís Eduardo Sánchez¹, Alejandro Ceballos¹

¹Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas, A.A. 275, Manizales, Colombia.

navilla@ucaldas.edu.co

(Recibido: 30 enero, 2008; aprobado: 10 abril, 2008)

RESUMEN: Con el objeto de evaluar la actividad antioxidante en plasma seminal y sangre, se seleccionaron 20 cerdos reproductores, clínicamente sanos, pertenecientes a dos explotaciones y alimentados con concentrado comercial, a los que se les tomó un eyaculado mediante el método de mano desnuda y 10 mL de sangre con EDTA. Se determinó la actividad de las enzimas Glutatión Peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) y Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) en plasma seminal y en sangre, además de las características seminales (volumen, motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática), y se realizó una prueba hipoosmótica a 150 mOsm. El promedio para GSH-Px fue $25,3 \pm 12,4$ U/mL y 523 ± 106 U/mL en plasma seminal y sangre, respectivamente. La actividad de SOD fue $2,1 \pm 1,8$ U/mL en plasma seminal y 1005 ± 490 U/mL en sangre. No se encontró correlación entre la actividad enzimática en el plasma seminal con la actividad sanguínea. La falta de correlación entre la actividad enzimática en ambos sistemas sugiere que son sistemas antioxidantes independientes.

Palabras clave: cerdos, enzimas antioxidantes, espermatozoides.

Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase of seminal plasma and blood in boars

ABSTRACT: In order to evaluate the antioxidant capacity of seminal plasma and blood in boars, 20 healthy males were randomly selected in two commercial swine farms, fed with commercial balanced diets. An ejaculate was obtained using the gloved-hand technique, and a 10 mL sample of blood was taken with EDTA. The activity of Glutathione peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9) and Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) in seminal plasma and blood was determined, as well as analyzing the seminal characteristics (volume, mass motility, individual motility, spermatic concentration); a hypoosmotic test (150 mOsm) was carried out. The mean GSH-Px activity was 25.3 ± 12.4 U/mL and 523 ± 106 U/g Hb for seminal plasma and blood, respectively. The SOD activity was 2.1 ± 1.8 U/mL in seminal plasma and 1005 ± 490 U/g Hb in blood. No correlation was found between the activity of the enzymes in seminal plasma and the activity in blood ($P > 0.05$). The lack of correlation between the enzymatic activities in both systems suggests that the two antioxidant systems are independent.

Key words: boars, antioxidant enzymes, spermatozoa.

Introducción

El macho reproductor juega un papel destacado en las explotaciones porcinas, bien sea que se utilice para monta directa o en inseminación artificial, ya que es el responsable no sólo del mejoramiento genético sino en gran medida de la fertilidad de la pira.

En los cerdos, así como en las demás especies aerobias, existe un equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad antioxidante tanto de origen enzimático como no enzimático. Pero cuando se rompe ese equilibrio se genera un fenómeno conocido como estrés oxidativo, que puede ocasionar daño celular (Aitken, 1994). Las células espermáticas no son ajenas al daño oxidativo, pero en ocasiones el papel de las ERO es paradójico, ya que en cantidades bajas son necesarias para que el espermatozoide desarrolle sus procesos fisiológicos, como la capacitación e hiperactivación espermática (Aitken, 1994; Man'kovs'ka & Serebrovs'ka, 1998).

La membrana espermática posee gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) necesarios para la fluidez suficiente de la membrana plasmática durante la fusión de membranas, evento necesario para la reacción del acrosoma y la interacción con la membrana del ovocito (Aitken et al., 1993). Los AGPI son fácilmente susceptibles a la peroxidación, lo que hace altamente vulnerable el espermatozoide al estrés oxidativo (Aitken et al., 1993; Aitken & Fisher, 1994). Unido a lo anterior, debe considerarse que durante la espermatogénesis se pierde una gran proporción del citoplasma, haciendo al espermatozoide más susceptible al daño por la producción de ERO (Aitken, 1994).

La acción de las ERO es contrarrestada por el sistema de defensa antioxidante, que puede ser enzimático o no enzimático. La enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) actúa fundamentalmente contra el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos, y la superóxido dismutasa (SOD;

EC 1.15.1.1) ejerce su acción contra el anión superóxido; estas dos enzimas se encuentran entre los principales antioxidantes del plasma seminal (Griveau et al., 1995).

La deficiencia de antioxidantes en el plasma seminal humano deja al espermatozoide desprotegido, especialmente cuando es retirado mediante métodos de selección espermática. Dentro de los trastornos más frecuentemente observados se han descrito alteraciones en la motilidad, en la reacción del acrosoma y disminución de la capacidad fecundante (Aitken & Fisher, 1994). De otra parte, las ERO alteran la integridad del DNA (Kodama, 1997; Lopes et al., 1998); además, el daño oxidativo sobre el DNA del espermatozoide puede inducir mutaciones (Comhaire et al., 1999). Así, la caracterización de la actividad enzimática antioxidante en plasma seminal y sangre, tiene un alto potencial para definir una estrategia terapéutica y de control cuando las alteraciones de la fertilidad masculina sean de este origen (Sánchez, 1997).

En cerdos también se han descrito alteraciones en la morfología y concentración espermática, señalándose que la deficiencia de selenio ha sido asociada con la disminución en el número de células espermáticas, un incremento en la mortalidad espermática y un aumento en la ocurrencia de defectos de la cabeza y la cola del espermatozoide (Hansen & Deguchi, 1996).

En consideración con lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad antioxidante en sangre y plasma seminal en cerdos, mediante la determinación de la actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa; además, establecer la relación de ambas enzimas en sangre y plasma seminal.

Materiales y Métodos

Animales. Se seleccionaron dos explotaciones porcinas ubicadas en los municipios de Villamaría y Manizales, Caldas, (4-6° LN y 75-76° LO); en estas se escogieron al azar 20 cerdos híbridos con

edades entre 14 y 40 meses, clínicamente sanos, en actividad reproductiva y sin reposo sexual previo al estudio. Los cerdos recibían diariamente una ración de 2 kg de alimento balanceado comercial con 14% de proteína.

Muestras. De cada cerdo se obtuvo una muestra de semen con una cerda en celo, mediante el método de la mano enguantada (Grupo Técnico Kubus, 1993), y una muestra de sangre con EDTA mediante venopunción yugular empleando el sistema de tubos al vacío. La sangre, previa determinación de la concentración de hemoglobina, fue hemolizada y conservada a -20°C hasta su posterior análisis. El semen se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm, para separar el plasma seminal que se conservó congelado a -20°C hasta la determinación de la actividad enzimática.

Análisis de laboratorio. Inicialmente se evaluaron las características espermáticas: volumen, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. Además, se practicó a cada una de las muestras una prueba hipoosmótica (PH) en un medio de citrato de sodio a 150 mOsm (Vásquez et al., 1997).

La actividad de GSH-Px en plasma seminal y en sangre se determinó mediante un método cinético NADPH-dependiente, empleando reactivos comerciales (Ransel[®], Randox Laboratories, Crumlin, UK). Para plasma seminal se tomaron 10 µL de la muestra diluyéndolos directamente en el reactivo, según las instrucciones señaladas por el fabricante.

La actividad de SOD en plasma seminal y en sangre se determinó mediante un método colorimétrico, empleando reactivos comerciales (Ransod[®], Randox Laboratories, Crumlin, UK). Para la manipulación y análisis de la muestra de plasma seminal se siguieron las modificaciones de la técnica descritas por Gavella et al (1996).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva, y se obtuvo el promedio, desviación estándar, valores mínimos

y máximos e intervalo de confianza al 95%. Previa comprobación del tipo de distribución de los datos, se obtuvieron las correlaciones y líneas de regresión entre la actividad de ambas enzimas en sangre y plasma seminal, y con la prueba hipoosmótica, se fijó como nivel de significancia $P < 0,05$ (Zar, 1999).

Resultados y Discusión

El promedio y desviación estándar para la actividad enzimática tanto en sangre como en plasma seminal se presentan en la Tabla 1. La actividad de GSH-Px en sangre es dependiente del consumo de selenio en la dieta, y se observa que frente a un mayor consumo, se produce un incremento en la actividad de la enzima (Mahan, & Parrett, 1996). Pese a lo anterior, la actividad de la enzima alcanza una meseta cuando el consumo de selenio es superior a 0,1 ppm. La actividad sanguínea promedio de GSH-Px en los cerdos estudiados fue superior a 60 U/g Hb, valor mínimo considerado indicador de deficiencia de selenio en animales (Ceballos et al., 1996). Los valores encontrados sugieren entonces un consumo de selenio adecuado en la dieta (Wichtel, J. Comunicación personal¹).

Los valores observados de actividad de GSH-Px en el plasma seminal fueron superiores a los descritos en otros estudios; cerdos suplementados con selenio (0,5 mg/kg de ración) presentaron una actividad de GSH-Px en plasma seminal de $0,240 \pm 0,085$ U/mL (Kolodziej & Jacyno, 2004), valor inferior al observado en este estudio.

No se observó correlación entre la actividad de GSH-Px en sangre y en plasma seminal, lo que sugiere una independencia entre ambos compartimientos. Resultados similares a los descritos por Lasota et al. (2004), quienes señalan que los mecanismos que controlan el contenido de selenio y la actividad de GSH-Px en la sangre son independientes a los del semen.

¹ Wichtel, J. DVM., PhD. University of Prince Edward Island, Charlottetown, Canadá.

Tabla 1. Promedio, desviación estándar, valores mínimos y máximos e intervalo de confianza (IC) para la actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en sangre y en el plasma seminal de 20 cerdos de dos explotaciones porcinas en Caldas, Colombia.

	X ± DE	Valores mínimos y máximos	IC (95%)
Sangre:			
GSH-Px (U/g Hb)	217±48	143-314	195-240
SOD (U/g Hb)	1.005±490	422-2.090	25-1.985
Plasma seminal:			
GSH-Px (U/mL)	7,3±6,0	0,0-17,5	4,5-10,1
SOD (U/mL)	2,1 ± 1,8	0,0-7,1	0,0-5,8

Pese a lo anterior, en el cerdo y otras especies, se ha indicado que los espermatozoides contienen altos niveles de selenio (aproximadamente 30 µg/g), el cual se encuentra localizado en la mitocondria y se incorpora tempranamente durante la espermatogénesis (Hansen & Deguchi, 1996). Por lo anterior, es de esperar que frente a un mayor consumo de selenio en la dieta, se presente una mayor disponibilidad de este mineral para los procesos antioxidativos en el semen del cerdo. El tejido testicular tiene una alta capacidad de retención del mineral, y se observa un detrimento en la actividad reproductiva del cerdo frente a dietas deficitarias en este mineral (Marín-Guzmán et al., 1997).

Si bien hay antecedentes en la literatura con respecto a la actividad de GSH-Px en sangre y plasma seminal en cerdos (Kolodziej & Jacyno, 2004; Mahan & Parrett, 1996; Marín-Guzmán et al., 1997), la diversidad de métodos y unidades dificultan la comparación entre los resultados obtenidos y los reportados en la literatura internacional.

La regresión de los resultados de la prueba hipoosmótica, dependiente de la actividad enzimática de GSH-Px y SOD en plasma seminal y de SOD en sangre, no fue significativa. Sin embargo, se observó (Figura 1) una regresión significativa del porcentaje de dilatación en la prueba hipoosmótica dependiente de la actividad de GSH-Px en sangre (P=0.04).

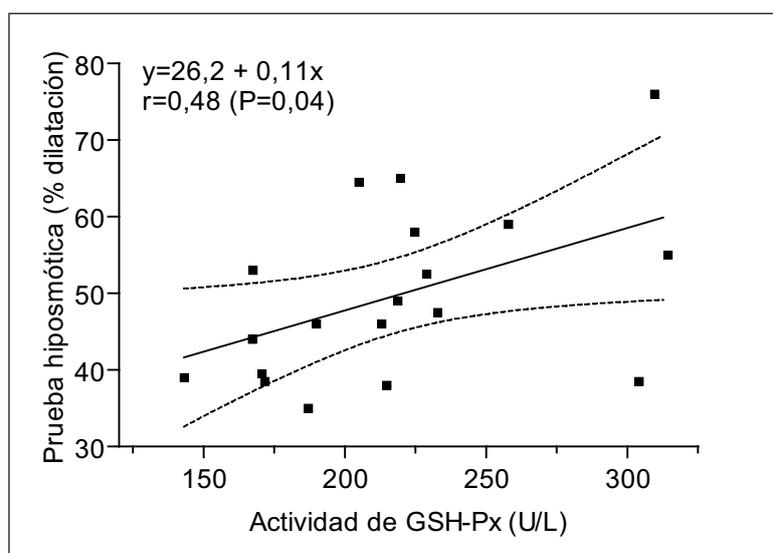


Figura 1. Regresión del porcentaje de dilatación en la prueba hipoosmótica dependiente de la actividad de GSH-Px en sangre de cerdos reproductores.

Este resultado sugiere que una mayor actividad enzimática en sangre afecta positivamente el porcentaje de espermatozoides con una membrana bioquímicamente normal. Teniendo en cuenta la falta de correlación entre la actividad de GSH-Px en plasma seminal y sangre, el mecanismo biológico que resulta en la regresión observada merece estudios complementarios. Además, es de interés la realización de estudios en que se evalúen cerdos con problemas de fertilidad y su posible correlación con el contenido de selenio tanto en la dieta como en sangre y plasma seminal.

No se encontró correlación entre la actividad de SOD en sangre y plasma seminal ($P > 0,05$) y se observó una amplia variación en los valores promedio que fueron inferiores (Tabla 1) a los observados para otras especies. Así, en humanos se ha reportado un rango para la actividad sanguínea de SOD entre 355 y 4074 U/g Hb y entre 6 y 31 U/mL para plasma seminal (Vallejos et al., 2003). Igualmente, se ha descrito un promedio de $6,9 \pm 2,8$ U/mL en plasma seminal humano (Gavella et al., 1996), y en toros Brahman se ha observado una actividad promedio de 1196 ± 645 U/g Hb y $5,7 \pm 4,0$ U/mL en sangre y plasma seminal respectivamente (Villa et al., 1999).

La escasa actividad de esta enzima en el plasma seminal de los cerdos puede deberse a una deficiencia en los precursores para la síntesis de la misma; sin embargo, los cerdos del estudio no presentaron patologías asociadas a deficiencias en los minerales que catalizan la formación de la SOD (cobre, zinc y manganeso). Igualmente, la síntesis de la enzima podría estar disminuida en las glándulas sexuales accesorias y en el testículo, si se la compara con otras especies estudiadas. Finalmente, podría presentarse una mayor participación de la enzima en la defensa antioxidante en el plasma seminal del cerdo, lo que se podría traducir en una menor actividad de la enzima. Pese a lo anterior, hubo cuatro muestras de plasma seminal en las que no se encontró actividad de SOD en los análisis; no obstante, las características seminales de estos cerdos eran normales.

Lo anterior podría indicar que la actividad de SOD tiene baja relevancia para prevenir el daño oxidativo en el semen, por lo que los espermatozoides obtendrían su defensa antioxidante de otros sistemas como las vitaminas; aunque de acuerdo con los antecedentes, la SOD es la mayor enzima protectora contra la toxicidad del oxígeno en términos generales (Álvarez et al., 1987). Esto se corroboró al agregar diferentes antioxidantes a un medio con espermatozoides recuperados mediante separación en gradiente de Percoll e incubados con xantina y xantina oxidasa, encontrando que la catalasa y la SOD evitaron el daño producido por las ERO sobre los ácidos grasos de la membrana espermática (Griveau et al., 1995).

El promedio y la desviación estándar de las características espermáticas evaluadas están descritas en la Tabla 2. Todas estas características, incluyendo el porcentaje de dilatación espermática en la PH, se encontraban dentro de los valores de referencia para la especie (Kolodziej, 2004; Vásquez et al., 1997). La correlación entre la actividad de GSH-Px en plasma seminal con la concentración espermática fue $r = 0,60$ ($P < 0,05$) y con la prueba hipoosmótica $r = 0,46$ ($P < 0,05$), mientras que la actividad de SOD en plasma seminal se correlacionó con el volumen seminal ($r = -0,55$; $P < 0,05$).

Tabla 2. Promedio y desviación estándar para las características seminales observadas en 20 cerdos de dos explotaciones porcinas en Caldas, Colombia.

Característica seminal	X ± DE
Volumen (mL)*	107,1±42,6
Concentración (10 ⁶ /mL)	213±115
Movimiento individual progresivo (%)	65±17
Movimiento masal (1-5)	3±1
Dilatación hipoosmótica (%)	46,4±15,0

*Fracción espermática

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio se puede señalar que la actividad de GSH-Px en sangre es compatible con un consumo adecuado de selenio en la dieta y que la actividad en plasma seminal en cerdos es mayor a lo descrito para otras especies. La actividad de SOD presentó una amplia variación, similar a lo descrito para otras especies, siendo baja la actividad de esta enzima en el plasma seminal.

Además, no hay correlación entre la actividad sanguínea de las enzimas analizadas con su actividad en el plasma seminal, lo que sugiere la independencia de la defensa antioxidante entre el tracto reproductivo y la sangre.

Referencias bibliográficas

- Aitken, R.J. A Free Radical Theory of Male Infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, 6: 19-24, 1994.
- Aitken, R.J.; Buckingham, D.; Harkiss, D. Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 97: 441-450, 1993.
- Aitken, R.J.; Fisher, H. Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa: The Balance of Benefit and Risk. **BioEssays**, 16: 259-267, 1994.
- Álvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, 8(5): 338-48, 1987.
- Ceballos, A.; Wittwer, F.G. Metabolismo del Se en rumiantes. **Archivos de Medicina Veterinaria**, 28 (2): 5-18, 1996.
- Comhaire, F.H.; Mahmoud, A.M.; Depuydt, C.E. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction Update**, 5: 393-8. 1999.
- Gavella, M.; Lipovac, V.; Vucic, M. et al. Superoxide anion scavenging capacity of human seminal plasma. **International Journal of Andrology**, 19: 82-90, 1996.
- Griveau, J.F.; Dumont, E.; Renard, P.J. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence system in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 103: 17-26, 1995.
- Grupo Técnico Kubus S.A. **Manual de Inseminación Artificial Porcina**. Madrid, España: Mar-Car S.A., 1993.
- Hansen, J.C.; Deguchi, Y. Selenium and fertility in animals and man: a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 37: 19-30, 1996.
- Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J. et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**, 68: 519-24, 1997.
- Kolodziej, A.; Jacyno, E. Effect of dietary selenium and vitamin e supplementation on reproductive performance of young boars. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Animal Husbandry**. 7(1), 2004.
- Lasota, B.; Baszczyk, B.; Seremak, B. et al. Selenium Status and GSH -Px Activity in Semen and Blood of Boars at Different Ages Used for Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 39: 309-314, 2004.
- Lopes, S.; Jurisicova, A.; Sun, J.G. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, 13: 896-900, 1998.
- Mahan, D.C.; Parrett, N.A. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. **Journal of Animal Science**, 74: 2967-2974, 1996.
- Man'kovs'ka, I.M.; Serebrovs'ka, Z.O. The role of oxygen radicals in the physiology and pathology of human sperm. **Fiziolohichniy Zhurnal**. 44: 118-25, 1998.
- Marín-Guzmán, J.; Mahan, D. C.; Chung, Y.K. et al. Effects of dietary selenium and vitamin e on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, 75: 2994-3003, 1997.
- Sánchez, R. Estrés oxidativo y fertilidad. In: Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal. Curso seminario. Valdivia, Chile. 1997. pp 47.
- Vallejos, S.; López, C.; Schulz, M. et al. Valores de referencia para superóxido dismutasa, glutatión

- peroxidasa y estado antioxidante total en sangre y plasma seminal humano. In: II Reunión anual sociedad de andrología y gametología de Chile: IV Jornadas internacionales de medicina reproductiva y biología de la reproducción. **International Journal of Morphology**, 21: 167-175, 2003.
- Vásquez, J.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for análisis the sperm membrane. **Theriogenology** 47: 913-922, 1997.
- Villa, N.A.; Ceballos, A.; Correa, S. et al. Evaluación del estado antioxidante en plasma seminal de toros brahman (*Bos indicus*) en pastoreo y suplementados. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 12 (Supl.): 187, 1999.
- Zar, J.H. Biostatistical analysis. 4ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. USA. 1999.