



Radicales libres e infertilidad en el macho

REVISIÓN DE
LITERATURA

Néstor Alonso Villa-Arcila¹, Alejandro Ceballos-Márquez¹

¹*Departamento de Sistemas de Producción,
Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.*

navilla@ucaldas.edu.co

(Recibido: 2 abril, 2007; aprobado: 16 junio, 2007)

RESUMEN: En este texto se presenta una revisión de los aspectos básicos relacionados con la formación de radicales libres en el organismo, así como los mecanismos disponibles para hacer frente a un desequilibrio en su producción, fenómeno conocido como estrés oxidativo. El espermatozoide es una célula altamente susceptible al daño inducido por la liberación de radicales libres, ya que su citoplasma es escaso y lo deja desnudo frente a la agresión por radicales libres. Los antioxidantes presentes en el plasma seminal son los encargados de la defensa del espermatozoide frente a un estrés oxidativo, y las enzimas y las vitaminas antioxidantes juegan un papel primordial. El desequilibrio entre la producción de radicales libres y antioxidantes, puede inducir cambios en la fisiología espermática, trastornos de la fecundación y alteraciones de la información genética que posee el espermatozoide. Lo anterior acarrea una serie de trastornos que han sido asociados con infertilidad en el macho.

Palabras clave: antioxidantes, espermatozoide, estrés oxidativo, plasma seminal.

Free radicals and male infertility

ABSTRACT: This review deals with the basic aspects of the formation of free radicals in the organism, as well as the available mechanisms to defend the body from an imbalance in its production, phenomenon known as oxidative stress. The spermatid cell is highly susceptible to damage induced by the liberation of free radicals, since their cytoplasm is scarce leaving it naked to the aggression for free radicals. The antioxidants present in the seminal plasma are those in charge of the defense of the spermatid cell during oxidative stress, antioxidant enzymes and vitamins also play an essential role. The imbalance between the production of free radicals and antioxidants can lead to changes in the spermatid physiology, fecundation dysfunctions, as well as alterations of the genetic information it possesses. The above-mentioned induces a dysfunction that has been associated with male infertility.

Key words: antioxidants, sperm, oxidative stress, seminal plasm.

Introducción

En medicina humana y veterinaria se han descubierto cada vez más agentes nosológicos para el organismo, dentro de los cuales figuran las especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres; muchos de ellos derivados del metabolismo normal del oxígeno, de ahí que éste se considere como un elemento con una función paradójica.

El oxígeno (O_2) es el segundo elemento más abundante en la atmósfera (21%), apareció hace aproximadamente 2500 millones de años y se formó a partir de la liberación hecha por algas verde-azules al desdoblarse el agua para obtener los átomos de hidrógeno esenciales para su crecimiento; así, la tierra pasó de ser un medio reductor a un medio oxidante (Gutteridge & Halliwell, 1994).

En forma paralela, y como un mecanismo para hacer frente al nuevo ambiente oxidante, un grupo de organismos evolucionaron a la par con los cambios ocurridos en la atmósfera. Este proceso evolutivo se pudo dar gracias al desarrollo de eficientes mecanismos antioxidantes, permitiendo no sólo sobrevivir en este ambiente oxidante sino emplear el O_2 para la producción de energía y en reacciones metabólicas de oxidación. Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben el daño oxidativo a una molécula susceptible (Gutteridge & Halliwell, 1994).

El efecto benéfico del O_2 está en el hecho de que es un receptor universal de electrones al final de la cadena respiratoria celular. Sin embargo, diversos efectos nefastos de una exposición prolongada al O_2 han sido descritos y se han conocido por más de ocho décadas; por ejemplo, la inhalación de O_2 puro puede dañar severamente los pulmones (Deby & Pincemail, 1986).

En los últimos años se ha indicado que el estrés oxidativo produce en el macho una baja en la calidad espermática (Lamirande & Gagnon, 1995). La producción de ERO es mantenida en equilibrio gracias a la presencia de sustancias

antioxidantes sintetizadas en las células a partir de minerales principalmente, los que constituyen el sustrato para la producción de estas enzimas antioxidantes, como son la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) y catalasa (CAT; EC 1.11.1.6).

Por lo anterior, el objetivo de esta revisión es presentar y describir los aspectos más importantes relacionados con la producción de ERO y antioxidantes en la infertilidad en el macho.

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres, son átomos o moléculas que contienen un electrón impar (desapareado) en su órbita más externa. Son capaces de aceptar electrones de otras moléculas de su entorno (oxidantes) y, por tanto, generar reacciones en cadena, ya que la reacción continúa ininterrumpidamente (Melgarejo, 1997).

El O_2 es esencial para la vida de los organismos aerobios y su mayor parte (98%) es utilizado para la generación de energía, la cual es liberada durante las oxidaciones biológicas y almacenadas por las células en forma de ATP. El O_2 actúa como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial; una consecuencia directa de este proceso es que en el intermedio se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, algunas de las cuales también pueden entregar uno o dos electrones al O_2 y producir intermediarios parcialmente reducidos, tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radicales alcoxi, peroxi y peroxinitritos, entre otros (Chane et al., 1979).

Anión superóxido

La fuente más importante de anión superóxido (O_2^-) es la cadena respiratoria en la mitocondria, ya que en este proceso se puede reducir parcialmente el O_2 en dos lugares de la cadena: uno, por acción de la NADH-deshidrogenasa, primera enzima de la cadena respiratoria; y segundo, como

consecuencia de la autooxidación de la coenzima Q o ubiquinona (Turrens & Boveris, 1980).

Otra fuente de O_2^- la constituye la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos; al producirse el “estallido respiratorio” en una reacción iniciada por la NADPH-oxidasa, se produce un consumo del O_2 y en su reducción se produce O_2^- (Market et al., 1984; Kaneko et al., 1997).

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ha sido identificado como el agente citotóxico en los medios donde se ha expuesto la célula a la acción de O_2^- (Halliwell & Gutteridge, 1986). Químicamente, el H_2O_2 es una molécula estable no radical, pero su comportamiento es similar a un radical libre, se forma a partir de la dismutación del O_2^- en una reacción catalizada por la SOD; además, cierta cantidad de oxididasas en los peroxisomas citoplasmáticos también están en capacidad de producir H_2O_2 en forma directa. De otra parte, se genera H_2O_2 por la transferencia de electrones al O_2 mediante sistemas enzimáticos, entre los que se tienen la NAD-deshidrogenasa y la coenzima Q (Boveris et al., 1976).

Según Murray et al. (2000), otra forma de producir H_2O_2 es por medio de la reacción catalizada por la glutatión reductasa, donde se genera esta sustancia al reducir el glutatión oxidado.

La generación continua de O_2^- y H_2O_2 puede inducir en forma indirecta alteraciones en algunas de las estructuras celulares, pero no se ha demostrado que la interacción de las ERO con dichas estructuras sea directa. El interés está centrado en la capacidad *in vivo* que tienen el O_2^- y H_2O_2 de generar otras moléculas más nocivas que ellos, reacciones que en su mayoría involucran metales de transición.

Radical hidroxilo

El radical hidroxilo (OH^\bullet) se forma a partir de la reacción de H_2O_2 con O_2^- en presencia de hierro y en menor grado de cobre, en lo que

se conoce como reacción de Fenton; también pueden intervenir níquel o cobalto como agentes reductores formando OH^\bullet a partir de H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1986). El OH^\bullet es uno de los oxidantes más potentes que existen, capaz de sustraer átomos de hidrógeno de cualquier molécula biológica, por ejemplo, ADN, lípidos y proteínas (Chane et al., 1979).

Radicales alcoxi y peroxi

Estos radicales se generan por la acción de un radical libre sobre la cadena de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los radicales peroxi (ROO^\bullet) son conocidos por ser menos reactivos y más selectivos que los radicales hidroxilo, además son el origen de las reacciones en cadena, que como es sabido, constituyen el proceso básico de la lipoperoxidación de las membranas celulares (Melgarejo, 1997).

Peroxinitrito

Este radical se produce normalmente como consecuencia de la reacción entre el O_2^- y el óxido nítrico (NO), es un oxidante casi tan poderoso como el radical OH^\bullet (Radi et al., 1991).

De otra parte, se ha reportado que células no fagocíticas también tienen la capacidad de producir ERO, incluyendo células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, células tiroideas, células de Leydig u ovocitos, linfocitos B, adipocitos y células tumorales (Cross & Jones, 1991).

Las ERO tienen un origen endógeno o exógeno. Desde el punto de vista endógeno, se ha indicado anteriormente que la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente de ERO durante la transferencia de electrones. También los procesos de fagocitosis, las reacciones de desintoxicación donde interviene la citocromo P-450 y la síntesis de los derivados del ácido araquidónico, entre otras, son reacciones generadoras de radicales libres (Gutteridge & Halliwell, 1994).

Dentro de las fuentes exógenas se encuentran las radiaciones UV, el tabaquismo, el ejercicio, la exposición al ozono, la intoxicación por herbicidas, el abuso de suplementos minerales, el consumo indiscriminado de AGPI y el calor (Gutteridge & Halliwell, 1994).

Fases de la peroxidación lipídica

Los pasos en la peroxidación lipídica, según Clavel et al. (1985), son iniciación, propagación y terminación. La iniciación se da con la pérdida de un átomo de hidrógeno de los AGPI en la membrana celular por parte de un OH^\bullet , así se forma un radical lipídico libre que reacciona con el O_2 generando un radical peroxi (ROO^\bullet).

Al reaccionar el ROO^\bullet con las cadenas de ácidos grasos vecinas, se libera hidrógeno y se forman hidroperóxidos (ROOH) inestables en su carga eléctrica, los que tratan de estabilizarse captando átomos de hidrógeno de otros ácidos; así, se da inicio a una reacción de propagación o en cadena. Lo anterior determina la pérdida de la integridad de la membrana celular.

Cuando se encuentran dos radicales libres se crean puentes entre ellos, deteniendo la reacción, que también puede detenerse por la presencia de moléculas secuestrantes de radicales libres, como son el α -tocoferol, la vitamina C y los flavonoides, entre otras.

Sustancias antioxidantes

Las estructuras capaces de contrarrestar un estrés oxidativo deben tener una estructura química tal que les permita no sólo atrapar el radical libre, sino también estabilizarlo en su estructura, ya que de otra manera ellos podrían convertirse en propagadores del proceso oxidativo. Existen varios tipos de antioxidantes en el organismo que se encuentran en la membrana o citoplasma de la célula. Éstos son: las enzimas antioxidantes que catalizan reacciones para formar sustancias menos reactivas; los antioxidantes preventivos

no enzimáticos, que actúan generalmente como secuestrantes de los metales de transición; las vitaminas que son recolectoras o detienen la reacción en cadena, y otros como el alopurinol u oxipurinol, que actúan como inhibidores enzimáticos en algunas de las reacciones donde se forman radicales libres (Maxwell, 1995; Sardesai, 1995).

Enzimas antioxidantes

En este grupo se encuentran la GSH-Px, la SOD y la CAT. La GSH-Px es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual actúa como agente reductor al ceder un átomo de hidrógeno (H^+) y transformarse en glutatión oxidado (GSSG), que a su vez es transformado en GSH por acción de la glutatión reductasa (GRd), (Ceballos & Wittwer, 1996). Además, la GSH-Px puede usar complejos de peróxidos como sustrato, incluyendo peróxidos lipídicos que se convierten en alcoholes inertes (Sardesai, 1995).

La actividad de la enzima en diferentes tejidos es un indicador del balance nutricional de selenio, ya que este mineral es un componente estructural de la estructura proteica de la enzima. La GSH-Px está presente en el citoplasma y la mitocondria (Maxwell, 1995).

La SOD es la primera línea de defensa contra la toxicidad del O_2^- , es permeable a la membrana y puede acumularse en la fracción celular donde es producida. En los humanos se han identificado tres formas de SOD, la citosólica (dependiente de cobre y zinc), la mitocondrial (dependiente del manganeso) y una extracelular que depende del cobre y zinc. La SOD cataliza la dismutación de O_2^- en H_2O_2 durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria; posteriormente, por acción de catalasas y peroxidasas, el H_2O_2 es transformado en agua (Kaneko et al., 1997).

La CAT está localizada en los peroxisomas dentro de los cuales el H_2O_2 puede difundirse. Esta enzima utiliza el hierro como cofactor y

cataliza la formación de agua y O_2 a partir del H_2O_2 . Además, posee actividad peroxidásica, lo que significa que la CAT es capaz de usar una molécula de H_2O_2 como sustrato para ceder electrones y otra molécula de H_2O_2 como oxidante o receptor de electrones (Murray et al., 2000).

En consideración a lo anterior, la actividad de las enzimas antioxidantes depende del aporte nutricional de los llamados minerales antioxidantes, entre otros, selenio, manganeso, cobre y zinc; el mecanismo general de acción de estos oligoelementos es a través de su participación en sistemas enzimáticos, ya sea como parte integrante de la estructura proteica de la enzima o como su activador. Cabe señalar que también ejercen otras funciones antioxidantes independientemente de su incorporación a la enzima.

Antioxidantes preventivos

Pertenecen a este grupo los sequestrantes de los metales de transición, que favorecen la integridad de la membrana hidrofóbica, el citosol hidrofílico y, al mismo tiempo, el compartimiento extracelular. Tienen actividades anti-radicales interviniendo en la fase de iniciación, pero sobre todo en la de propagación, para evitar la acción del OH^\bullet (Sardesai, 1995).

Los metales de transición contenidos en el organismo están ligados, pero cualquiera que escape durante la muerte celular o intercambio es rápidamente sequestrado para prevenir la actividad redox (Maxwell, 1995). Un ejemplo de ello lo constituyen las proteínas ligadoras de hierro transferrina y lactoferrina, y la de cobre ceruloplasmina. Comercialmente está disponible la deferoxamina que liga el hierro y es un potente inhibidor de la peroxidación mediada por este mineral.

Antioxidantes captadores o recolectores

Las vitaminas se encuentran en este grupo de sustancias. Éstas reaccionan con los radicales libres antes de producir daño en las estructuras

del organismo. En el proceso de recolección, estas moléculas son a su vez oxidadas pudiendo ser regeneradas por la acción de otros antioxidantes. Dentro del grupo se encuentran sustancias liposolubles (tocoferol y carotenos) e hidrosolubles (ascorbato y uratos).

Una serie de isómeros del tocoferol (vitamina E) son solubles en lípidos y son los antioxidantes más importantes encontrados en las membranas lipídicas del cuerpo. Esta vitamina posee un grupo OH en su anillo cromanol, lo cual le confiere su actividad como antioxidante. El tocoferol interrumpe la reacción en cadena de los radicales libres como resultado de su capacidad para transferir un hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre de un ácido graso peroxidado. El radical fenoxi libre que se ha formado reacciona con otro radical peroxilo libre. Por lo anterior, el tocoferol no se une fácilmente a oxidaciones reversibles (Miller et al., 1993; Rock et al., 1996; Murray et al., 2000). El tocoferol debe reemplazarse de nuevo totalmente para cumplir sus funciones como antioxidante.

Los carotenos también son otra fuente de antioxidantes en la dieta, son importantes en la protección de la membrana lipídica contra la oxidación; además, son precursores de la Vitamina A y excelentes antioxidantes, especialmente contra radicales peroxilo e hidroxilo (Canfield et al., 1992). También actúan como sequestrantes del oxígeno singlete.

El antioxidante hidrosoluble más abundante en el cuerpo es la vitamina C. Su función básica es la reducción reversible de los radicales libres con la posterior formación de dehidroascorbato. Su acción básica es como captador de radicales hidroxilo y superóxidos en un medio acuoso, y actúa también interrumpiendo las reacciones en cadena en la peroxidación de lípidos (Rock et al., 1996).

Pese a lo anterior, el consumo y la utilización de la vitamina C como antioxidante deben considerarse cuidadosamente, ya que altas concentraciones pueden convertirla en un potente

prooxidante, especialmente en presencia de altas concentraciones de hierro libre, dado que favorece la reacción tipo Fenton (Valenzuela & Nieto, 1995).

Los flavonoides son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se encuentran naturalmente en frutas y vegetales. Los más importantes son las antocianinas, flavones y flavonoles. Son compuestos solubles en agua y captadores de oxígeno libre y de los radicales superóxido, peroxilo y peroxi-lipídicos (Husain et al., 1987).

El glutatión es un tripéptido sintetizado intracelularmente, su concentración varía de acuerdo con el contenido de aminoácidos sulfúricos en la dieta. Es sustrato para la GSH-Px, aunque la limitada permeabilidad de la membrana al glutatión puede reducir la efectividad de este mecanismo. Además, el glutatión puede atrapar por sí solo el oxígeno libre, O_2^- y OH^\bullet , y reaccionar directamente con aldehídos citotóxicos producidos durante la peroxidación lipídica, tales como el 4, hydroxynenol. Así protegen los grupos tiol sobre la membrana plasmática. Además, esta molécula facilita la acción antioxidante del tocoferol en la membrana plasmática del espermatozoide, participando en la regeneración de los radicales tocoferol y dehidroascorbato (Baker et al., 1996).

Radicales libres e infertilidad masculina

Espermatozoides y radicales libres

Se ha demostrado que el O_2^- estimula la hiperactivación del espermatozoide humano por medio de vías que inhiben la acción de la SOD (Aitken & Fisher, 1994). También hay antecedentes que comprueban la activación directa de la fosfolipasa A_2 por ERO, posiblemente por medio de una inhibición de la lipocortina; así, las ERO facilitan la reacción de acrosoma a través del efecto promotor de la actividad de la fosfolipasa A_2 , enzima que está presente en el espermatozoide humano y su actividad es estimulada por el calcio

y la formación de peróxidos lipídicos dentro de la membrana plasmática.

Los AGPI que abundan en el espermatozoide humano, principalmente ácido decosahecanoico, le confieren la fluidez suficiente a la membrana plasmática, permitiendo que ésta participe en los eventos de fusión de membranas, evento necesario para la reacción acrosómica y la unión ovocito-espermatozoide (Aitken et al., 1993). Las ERO podrían iniciar un bajo nivel de peroxidación lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, generando condiciones que mejoran la actividad de la fosfolipasa A_2 ; de esta manera, se crea la fluidez de membrana necesaria para los eventos de fusión asociados con la fertilización (Goldman et al., 1992).

Pese al efecto de las ERO sobre la fisiología espermática, su presencia en exceso puede alterar la integridad de esta célula, dado que su membrana celular es rica en AGPI susceptibles de peroxidación. Además, durante la espermatogénesis se pierde una gran proporción del citoplasma, sitio que se caracteriza por poseer una abundante actividad antioxidante.

Desde la década del 40, se ha indicado que el espermatozoide del toro genera H_2O_2 , siendo perjudicial para la motilidad espermática (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Además, se ha demostrado que la producción de H_2O_2 por el espermatozoide del toro podría realizarse a través de la deaminación oxidativa de aminoácidos aromáticos, tales como la fenilalanina, tirosina y triptófano, y en algunos casos por la deaminación oxidativa de los aminoácidos espermidina y espermina (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

Un factor importante que contribuye a la producción de ERO por los espermatozoides parece ser la interrupción de la espermiogénesis y la retención de un exceso de citoplasma residual por la metamorfosis del espermatozoide. Estudios realizados por Huszar et al. (1988), indicaron que la función espermática defectuosa está asociada con una actividad elevada de ciertas enzimas claves, incluyendo la creatín kinasa (CK), lactato

deshidrogenasa (LDH) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH); se sugirió que los errores de espermiogénesis pueden conllevar a una elevación de la CK durante el estrés oxidativo, ya que el daño peroxidativo está relacionado con la actividad de esta enzima (Huszar & Vigue, 1993; Aitken & Fisher, 1994).

La G-6-PDH está relacionada con la generación de ERO, principalmente O_2^- , quizá porque éstos pueden ser producidos por el fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADPH), metabolito generado en la vía de la hexosa monofosfato por la G-6-PDH y que cede electrones reduciendo el oxígeno (Aitken & Fisher, 1994).

La formación de ERO en exceso produce un desequilibrio con la capacidad antioxidante del espermatozoide, e inicia una reacción en cadena que propaga el efecto oxidativo a través de toda la membrana y los demás espermatozoides; así, se pierde la fluidez de la membrana; como consecuencia, los espermatozoides que generan niveles altos de ERO son incapaces de realizar el proceso de reacción de acrosoma. La GSH-Px, la SOD y la CAT se encuentran entre los principales antioxidantes presentes en el plasma seminal (Griveau et al., 1995); pero, en el semen de pacientes donde se ha detectado una gran producción de ERO, el espermatozoide y el plasma seminal no están en condiciones de neutralizar completamente los radicales, lo que estaría indicando que el semen en algunos pacientes tiene una capacidad antioxidante deficiente (Iwasaki & Gagnon, 1992).

La astenozoospermia ha sido asociada con una elevada producción de radicales libres, vía depleción intracelular del ATP y la subsecuente disminución en la fosforilación de las proteínas del axonema (Aitken et al., 1995).

Igualmente, se ha indicado que la deficiencia de selenio, precursor de la formación de GSH-Px, induce una reducción del número de espermatozoides vivos e incrementa la ocurrencia de colas y cabezas defectuosas. Se reporta que

el selenio es necesario para el desarrollo normal del espermatozoide, donde su deficiencia ha sido asociada con alteraciones de la fertilidad (Hansen & Deguchi, 1996).

La terapia antioxidante en pacientes con una alta producción de ERO o la adición de antioxidantes a las fracciones de semen recuperadas por diferentes medios, podría mejorar la calidad del semen. A la adición de dos antioxidantes a un medio con espermatozoides recuperados mediante centrifugación, se encontró que la vitamina E fue efectiva al proteger los AGPI presentes en la membrana del espermatozoide (Aitken & Clarkson, 1988). El uso de diferentes antioxidantes (CAT y SOD) en un medio con espermatozoides recuperados mediante separación en gradiente de Percoll e incubados con xantina y xantina oxidasa, protege las células del daño producido por los radicales libres sobre los AGPI de la membrana espermática (Griveau et al., 1995).

Oeda et al. (1997) encontraron que la terapia *in vivo* con sustancias antioxidantes como la N-acetilcisteína, mejora las características seminales en pacientes con una producción elevada de ERO, efecto que se logra en forma independiente de la procedencia de los radicales libres.

En otros estudios se ha evaluado el efecto de la administración de vitamina E por vía oral, y se encuentra una mejoría en la función espermática *in vitro* en aquellos pacientes que recibieron 600 mg/día de la vitamina. En este estudio no se observó una elevación significativa de los niveles de vitamina E en el plasma seminal, lo que podría indicar que la vitamina se oxida antes de la eyaculación o que la concentración de la vitamina en el plasma seminal no refleja los niveles que se encontrarían en el tejido testicular o en la membrana del espermatozoide (Kessopoulou et al., 1995).

El glutatión administrado a pacientes que pueden tener infertilidad secundaria a estrés oxidativo,

al parecer, actúa en el epidídimo y durante la espermatogénesis, mejorando la función del espermatozoide eyaculado (Irvine, 1996).

Puede observarse que la utilización de antioxidantes de diversas formas, bien sea como suplementación o adicionándolos a los medios para trabajar con espermatozoides, tiende a mejorar la calidad espermática. Por lo anterior, queda demostrado que la presencia de los antioxidantes es necesaria para la protección de la célula espermática, en especial cuando se pretende separarla del plasma seminal. No obstante, el efecto de los radicales libres sobre el espermatozoide es paradójico, ya que se requieren en cantidades bajas para mantener la funcionalidad de la célula y favorecer la fusión con el oocito.

Especial atención merece la suplementación con metales de transición que en un momento se pueden convertir en generadores de radicales libres, en especial cuando éstos quedan libres en el organismo y encuentran moléculas reductoras. En esta reacción (tipo Fenton) también pueden verse involucrados los espermatozoides, puesto que así se da inicio a una reacción de peroxidación en cadena donde se ven involucrados los AGPI de la membrana.

Plasma seminal y radicales libres

Muchos análisis han confirmado que cuando hay infiltración de leucocitos en grandes cantidades dentro del eyaculado, como ocurre en casos de infección del tracto genital, se pueden detectar altos niveles de ERO (Aitken & Fisher, 1994).

En un experimento donde se utilizaron leucocitos polimorfonucleares (PML), con una concentración relativamente alta ($5 \times 10^5/\text{mL}$) y un método de centrifugación repetida a una preparación de espermatozoides humanos para promover daño peroxidativo a la célula, se observó una supresión de la motilidad espermática después de 5 horas de incubación, ya que bajo estas condiciones de estimulaciones repetidas los PML aumentan el consumo de oxígeno y activan la NADPH-

oxidasa que cataliza la formación de ERO (Baker et al., 1996).

Es probable que cuando las concentraciones de PML sean bajas, el poder antioxidante presente en el plasma seminal sea suficiente para prevenir el daño peroxidativo al espermatozoide; sin embargo, con altas concentraciones de PML, la función protectora del plasma seminal puede verse disminuida. Además, altos niveles de contaminación con leucocitos pueden estar asociados con daño en las glándulas sexuales accesorias y la viabilidad espermática, por medio de mecanismos que no están relacionados directamente con daño peroxidativo a la membrana plasmática del espermatozoide (Sukcharoen et al., 1995).

En ausencia de la protección brindada por el plasma seminal, se ha demostrado un impacto negativo de los PML sobre la función espermática. Plante et al. (1994) determinaron que aunque la liberación extracelular de ERO por espermatozoides defectuosos fue insuficiente para comprometer la motilidad del espermatozoide normal, los PML en concentraciones mayores de $1 \times 10^6/\text{mL}$ afectan la motilidad de las células espermáticas.

El plasma seminal humano presenta proteínas transportadoras de hierro, transferrina y lactoferrina, que tienen entre sus funciones quelar una molécula iones de hierro libres que se encuentran cerca al espermatozoide y así reducir el riesgo de reacciones catalizadoras tipo Fenton que favorecen la peroxidación lipídica en el espermatozoide (Quinlivan, 1968).

Muestras de semen de pacientes humanos que producían eyaculados altamente contaminados con leucocitos generadores de ERO, asociados a prostatitis crónica, no presentaban alteraciones de la fertilidad; esta falta de asociación se debe presumiblemente al hecho de que leucocitos originados de infecciones de la uretra, glándulas vesiculares y próstata, solamente hacen contacto con el espermatozoide en el momento de la eyaculación, momento en que el espermatozoide está protegido por los antioxidantes presentes en

el plasma seminal, lo que hace que sea altamente dependiente de la protección antioxidante que brinda el plasma seminal (Aitken, 1992; Aitken & Fisher, 1994).

Radicales libres y fecundación

Las ERO alteran la fusión espermatozoide-oocito, motilidad e integridad del DNA del espermatozoide. Aitken et al. (1998) evaluaron los factores enumerados anteriormente en espermatozoides humanos expuestos a niveles altos de radicales libres, y encontraron que a concentraciones bajas de ellos, la fragmentación del DNA fue reducida significativamente, mientras que las tasas de fusión del espermatozoide-oocito estaban significativamente elevadas. A medida que el estrés oxidativo se incrementaba, los espermatozoides exhibían un daño significativo del DNA y continuaba expresándose y elevándose la capacidad de fusión espermatozoide-oocito. Cuando los niveles de estrés oxidativo estuvieron a niveles más altos, se observaron tasas altas de fragmentación del DNA y los espermatozoides mostraron una pérdida de su capacidad de movimiento y fusión al oocito.

Estos estudios señalan que los mecanismos de óxido-reducción pueden elevar o interrumpir la integridad funcional y genómica del espermatozoide humano; además, demuestran que la capacidad de fertilización del espermatozoide puede darse aun con un daño en su DNA. Donde el medio aerobio propicia la formación de una serie de moléculas que son necesarias en el organismo, así como también son nocivas para el funcionamiento corporal, en especial en cierto tipo de células. La célula ha desarrollado mecanismos de defensa frente a esta situación, los que al verse saturados favorecen la presentación de un estrés oxidativo.

Ciertas células son más susceptibles al daño por la formación de radicales libres, ya que poseen una composición que las hace más vulnerables a este daño; así, el espermatozoide es una de ellas, donde además su citoplasma es escaso, siendo este sitio el principal reservorio de antioxidantes. No debe

dudarse de que una baja defensa antioxidante deja el espermatozoide desprotegido frente a los radicales libres, que igualmente son necesarios para su función. Lo anterior acarreará una serie de trastornos que inducirán en el macho trastornos de la fertilidad y alteraciones en la transmisión de la información genética a la descendencia (Aitken et al., 1998).

Cualquiera que sea el mecanismo que se encuentre generando los radicales libres en el macho, permite señalar que el estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de las alteraciones de la fertilidad y que los antioxidantes tienen un potencial grande en la terapéutica y prevención de estos desórdenes.

Referencias Bibliográficas

- Aitken, R.J. Criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.166, p.264-265, 1992.
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.9, p.367-376, 1988.
- Aitken, R.J.; Fisher, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **BioEssays**, v.16, p.259-267, 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**, v.97, p.441-450, 1993.
- Aitken, R.J.; Paterson, M.; Fisher, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.108, p.2017-2025, 1995.
- Aitken, R.J.; Gordon, E.; Harkiss, D. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1047, 1998.
- Baker, G.H. W.; Brindle, J.; Irvine, S.D. et al. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear

- leukocytes. **Fertility and Sterility**, v.65, p.411-419, 1996.
- Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, A.O.M. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v.156, p.435-444, 1976.
- Canfield, L.M.; Forage, J.W.; Valenzuela, J.G. Carotenoids as cellular antioxidants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.200, p.260-265, 1992.
- Ceballos, A.; Wittwer, F.G. Metabolismo del selenio en rumiantes. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.28, p.5-18, 1996.
- Chane, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p.527-605, 1979.
- Clavel, J.P.; Emerit, J.; Thuillier, A. Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en pathologie. **Pathologie Biologie**, v.33, p.61-69, 1985.
- Cross, A.R.; Jones, O.T.G. Enzymic mechanism of superoxide production. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1057, p.281-298, 1991.
- Deby, C.; Pincemail, J. Toxicity of oxygen, free radicals and defense mechanisms. **Presse Médicale**, v.15, p.1468-1474, 1986.
- Goldman, R.; Ferber, E.; Zort, U. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. **Febs Letters**, v.309, p.190-192, 1992.
- Griveau, J.F.; Dumont, E.; Renard, P. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.17-26, 1995.
- Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. **Antioxidants in nutrition, health and disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 143p.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics Arch. Biochem. Biophys**, v.246, p.501-514, 1986.
- Hansen, J.C.; Deguchi, Y. Selenium and fertility in animals and man. A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.37, p.19-30, 1996.
- Husain, S.R.; Cillard, J.; Cillard, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, p.2489-2498, 1987.
- Huszar, G.; Vigue, L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, p.292-298, 1993.
- Huszar, G.; Corrales, M.; Vigue, L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normozoospermic and oligospermic men. **Gamete Research**, v.19, p.67-75, 1988.
- Irvine, S.D. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.6-12, 1996.
- Iwasaki, A.; Gagnon, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v.57, p.409-416, 1992.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- Kessopoulou, E.; Powers, H.J.; Sharma, K.K. et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. **Fertility and Sterility**, v.64, p.825-831, 1995.
- Lamirande, E.; Gagnon, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, Oct;10 Suppl 1, p.15-21, 1995.
- Mann, T.; Lutwak-Mann, C. **Male reproductive functional and semen**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 495p.
- Market, M.; Andrew, P.C.; Babior, B.M. Measurement of O₂ production by human neutrophils. The preparation of an assay of NADPH oxidase containing particles from human neutrophils. **Methods In Enzymology**, v.105, p.358-365, 1984.
- Maxwell, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v.49, p.345-361, 1995.
- Melgarejo, E.R. Radicales libres en patología humana. **Ecos**, v.1, p.4-14, 1997.
- Miller, J.K.; Brzezinska-Slebodzinska, E.; Madsen, F.C. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2812-2823, 1993.
- Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. et al. **Harper's biochemistry**. 25.ed. Stanford: Appleton & Lange, 2000. 927p.
- Oeda, T.; Henkel, R.; Ohmori, H. et al. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? **Andrologia**, v.29, p.125-131, 1997.
- Plante, M.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. Reactive

- oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.62, p.387-393, 1994.
- Quinlivan, W.L.G. Analysis of the proteins in human seminal plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.127, p.680-687, 1968.
- Radi, R.; Beckmans, J.S.; Bush, K.M. et al. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.288, p.481-487, 1991.
- Rock, C.L.; Jacob, R.A.; Bowen, P.E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96, p.693-702, 1996.
- Sardesai, V.M. Role of antioxidants in health maintenance. **Nutrition in Clinical Practice**, v.10, p.19-25, 1995.
- Suckcharoen, N.; Keith, J.; Irvine, D.S. et al. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. **Fertility and Sterility**, v.63, p.1293-1300, 1995.
- Turrens, J.F.; Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v.19, p.421-427, 1980.
- Valenzuela, A.; Nieto, S. Los antioxidantes protectores de la calidad en la industria alimentaria. **Ronda Latinoamericana**, v.55, p.55-75, 1995.