

## Especies reactivas y daño en el ADN espermático.

Pablo C. Rodríguez<sup>1</sup>, Noelia Cabral<sup>2</sup>, Agustina González Torres<sup>2</sup>, Martha Beconi<sup>1</sup>, Vanesa Rawe<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup> REPROTEC, Patología de Gametas y Embriones. Buenos Aires, Argentina.

E-mail: prodriguez@fvet.uba.ar

El contenido de este texto es el producto de una disertación presentada por el Dr. Pablo Rodríguez en el curso de posgrado “Aspectos de la Funcionalidad Espermática en Especies Domésticas” en la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad de Buenos Aires), coordinado por la Dra. Elizabeth Breininger, y del posterior trabajo de análisis, búsqueda bibliográfica y reflexión de los autores de este trabajo.

### ¿Qué son las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno?

Es común escuchar que los radicales libres son “moléculas de vida media corta” o son siempre “altamente reactivos”, sin embargo estas afirmaciones no siempre son del todo ciertas ya que existen radicales libres de tiempos de vida media muy variados; probablemente los más estudiados son de vida media corta pero también existen de vida media más largas. Además no todos son altamente reactivos, existen sobrados ejemplos de relevancia fisiológica que contradicen esta afirmación, de hecho el oxígeno en su forma O<sub>2</sub> es un radical libre y es mínimamente reactivo.

Es importante hacer estas aclaraciones ya que muchas veces se confunden los términos “especies reactivas” y “radicales libres” o se usan

indistintamente, lo cual no es del todo correcto. En la bibliografía, incluso la especializada, pareciera ser que “las especies reactivas son siempre radicales libres” y es importante destacar que no es así y profundizar sobre la diferencia. De hecho, hay especies reactivas que son radicales libres y otras que no lo son.

Otro error muy común y que aún se mantiene, es la creencia de que “los radicales libres son siempre especies oxidantes” o que “se forman siempre como subproductos indeseables”, sin embargo hoy sabemos que los radicales libres pueden actuar, además de oxidando, por muchos otros mecanismos químicos como la nitración o la nitrosación y, si bien originalmente se las estudió como productos indeseables, hoy sabemos que poseen un importante papel en procesos fisiológicos.

### ¿Qué es un radical libre?

Un radical libre es cualquier especie química, átomo o molécula que exista (es decir, que tenga una existencia independiente) y que posea al menos un electrón desapareado en su capa externa. Por ejemplo, el anión superóxido ( $O_2^-$ ) es un radical libre por excelencia y probablemente sea el más estudiado. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), es sin dudas la especie reactiva más estudiada, pero no es un radical libre porque no tiene ningún electrón desapareado. Entonces, el  $H_2O_2$  ¿Es una especie reactiva del oxígeno? La respuesta es: Sí y está involucrada en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Lo que debemos tener en claro es que no se trata de un radical libre porque no posee electrones desapareados.

### **¿Porque hay tanta confusión al respecto?**

Originalmente (hace unos 3.850 millones de años) la Tierra era anóxica, es decir, no había oxígeno y el metabolismo era anaeróbico. Las formas de vida de ese entonces realizaban glucólisis anaeróbica y así obtenían su energía, como aún hoy lo hacen algunas bacterias, nuestros eritrocitos o una célula muscular que trabaja en anaerobiosis.

Hace unos 2.500 millones de años aparece el oxígeno en la Tierra, probablemente producido por algunas algas subacuáticas como producto de desecho. Los organismos comenzaron a oxidar la glucosa hasta dióxido de carbono y agua con un considerable aumento de la energía que obtenían. Al respecto, Gregory Bulkeley, en su libro *"Free radical and reactive oxygen species, la evolución de un concepto"* nos deja una idea más que interesante: "Mientras los

estudiantes correctamente aprenden, el metabolismo aeróbico como lo normal y el camino anaeróbico como una situación especial, evolutivamente fue al revés. Cuando el oxígeno aparece por primera vez en el ambiente era altamente tóxico y literalmente no tenía ningún uso. De hecho, los biólogos evolucionistas nos cuentan que los mecanismos de defensa antioxidantes que hoy vemos en las células surgieron muy tempranamente en el tiempo en paralelo con la aparición del oxígeno. Muchos creen que lo que todos conocemos como cadena respiratoria mitocondrial (es decir la respiración oxidativa) evolucionó más tarde y que en un principio fue un mecanismo para deshacerse del oxígeno. Habiendo evolucionado entonces, primero como un mecanismo de defensa contra el daño tisular mediado por especies reactivas del oxígeno, después es cierto que, el proceso de fosforilación oxidativa fue transformado por mecanismos de selección natural en un muy eficiente mecanismo para producir ATP y hoy somos tan dependientes de este sistema de alta eficiencia que la mayoría de los mamíferos y humanos podemos sobrevivir muy poco tiempo sin oxígeno"

### **¿Todas las especies reactivas son del oxígeno? ¿Qué son las especies reactivas del nitrógeno?**

Una especie reactiva del oxígeno (ROS) es cualquier molécula (muy reactiva, que puede ser un radical libre o no) que deriva del oxígeno. Es decir, producida en algún proceso metabólico en el que participa el oxígeno, como su nombre lo indica.

Una especie reactiva del nitrógeno es cualquier molécula derivada de algún proceso metabólico del nitrógeno o del óxido

nítrico que sea muy reactiva. Por supuesto, algunos de ellas serán radicales libres y otras no.

### **¿Cuáles son las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno?**

Como vimos anteriormente, no todas las especies reactivas son radicales libres, por lo tanto podemos clasificarlas en: aquellas que tienen al menos un electrón desapareado y aquellas que no lo tienen. En los procesos espermáticos, las especies reactivas más estudiados son el anión superóxido entre los radicales libres y el peróxido de hidrogeno entre los no radicales.

Dentro de las especies reactivas del nitrógeno, está el óxido nítrico (entre los radicales libres) y el peroxinitrito (entre los no radicales). Todos estos con una importante función en los procesos de capacitación, reacción acrosomal y daño en el ADN espermático.

Respecto a la vida media de estas especies, existen radicales libres o especies reactivas cuyas vidas medias son minutos (como el peróxido de hidrógeno), otras de vidas medias de segundos (como el óxido nítrico), o incluso de milisegundos (como el peroxinitrito) y los muy reactivos pueden vivir microsegundos (como el anión superóxido) o hasta nanosegundos (como el radical hidroxilo).

### **¿Cómo se generan las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno?**

Los organismos superiores estamos diseñados para tomar el oxígeno atmosférico

y distribuirlo en las células, particularmente en las mitocondrias y así reducir el oxígeno a agua para formar ATP. De este modo el oxígeno se queda con dos electrones desapareados.

Como estos electrones tienen el spin paralelo su reactividad es mínima (es un ejemplo de un radical libre que no es muy reactivo); sin embargo, la reducción del oxígeno a agua (en el complejo IV de la cadena respiratoria), no es directa y no ocurre en un solo paso. Es decir que el oxígeno no se reduce directamente a agua, sino que tiene una reducción parcial, univalente y sucesiva. En esa reducción el oxígeno toma un electrón y produce anión superóxido que es un radical libre y una especie reactiva. Luego toma otro electrón y produce peróxido de hidrogeno, que no es radical libre pero sí es una especie altamente reactiva, y con otro electrón, el temido radical hidroxilo, que es un radical muy nocivo para la célula en concentraciones altas. Finalmente con otro electrón, se forma agua. Cuando se enlentece la cadena respiratoria, se empiezan a acumular estas moléculas, generando un tipo de estrés oxidativo por producción de especies reactivas.

Sin embargo, al mismo tiempo que surgieron estos sistemas para “depurar” el oxígeno, surgieron también los sistemas antioxidantes que ya conocemos. Los más famosos son la enzima superóxido dismutasa (SOD), que si se acumula el anión superóxido lo transforma en peróxido de hidrogeno, y la enzima catalasa o glutatión peroxidasa, que si se acumula peróxido de hidrogeno lo

transforma en agua. Existen una gran variedad de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Y todos tienen por objetivo evitar que se acumulen radicales superóxido, peróxidos o radicales hidroxilo.

### **¿Dónde se generan las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno?**

El sitio principal de producción de especies reactivas son las mitocondrias. Estas organelas representan la fuente intracelular cuantitativamente más importante tanto de especies reactivas del oxígeno como del nitrógeno. Sin embargo también se producen en otras membranas, como la plasmática, la nuclear o la del retículo endoplasmático. En el caso de los espermatozoides, en la membrana plasmática hay una enzima que es la NADPH oxidasa de membrana que es muy importante en la producción de anión superóxido. Las especies reactivas también se producen en cualquier sistema redox citosólico y en los peroxisomas, pero cabe destacar que la mitocondria es la fuente más abundante. Las células espermáticas están cargadas de mitocondrias, principalmente en la región conocida como pieza intermedia.

Los dos principales radicales libres producidos en las mitocondrias son el anión superóxido y el óxido nítrico (ambas especies poseen un electrón libre desapareado) y ambos implicados en procesos relacionados con la fecundación, como la capacitación, la hiperactivación o la reacción acrosomal en espermatozoides de diversas especies de mamíferos.

### **Participación de las especies reactivas y los radicales libres en procesos espermáticos.**

El óxido nítrico es un radical libre y su síntesis está a cargo de toda una familia de enzimas que se conocen como óxido nítrico sintasas (NOS).

Participa en un sinnúmero de procesos fisiológicos, entre los cuales se encuentra la producción espermática. Sus efectos pueden ser moduladores, deletéreos, y/o protectores de acuerdo a la función específica que tenga.

Dentro de los efectos moduladores del óxido nítrico se encuentran, la capacitación espermática, la ovulación, los procesos de fecundación y el desarrollo embrionario.

Del mismo modo varias especies reactivas del oxígeno son necesarias para el funcionamiento espermático normal, la capacitación y la reacción acrosómica, la clave está en el fino equilibrio que se mantiene entre la concentración fisiológica necesaria para estos procesos y la concentración patológica que termina por producir efectos deletéreos en el espermatozoide.

Entre los efectos deletéreos del óxido nítrico, podemos encontrar que produce daño en el ADN, induce la peroxidación lipídica (lipoperoxidación) e incrementa la susceptibilidad a la radiación y agentes alquilantes. Es decir que es capaz de hacer todo lo que hace cualquier radical libre cuando inicia y propaga una cadena de

efectos deletéreos en el ADN, las proteínas y los lípidos.

Por último, los efectos protectores, incluyen su capacidad de actuar como antioxidante, inhibir la adhesión leucocitaria y proteger a las células de la toxicidad inducida por TNF.

### **Efecto de las especies reactivas sobre la funcionalidad espermática.**

Las fuentes primarias de ROS en el plasma seminal provienen, como lo vimos anteriormente, del propio espermatozoide (membranas, mitocondrias, etc.) sin embargo una fuente extrínseca a los espermatozoides que también aporta niveles significativos de ROS son los leucocitos polimorfonucleares que coexisten en el plasma seminal del eyaculado. Además, la literatura informa que los espermatozoides inmaduros o defectuosos producen niveles de ROS superiores a sus contrapartes normales. De este modo, un aumento en el número de espermatozoides defectuosos o un incremento en la infiltración leucocitaria, principalmente a nivel testicular, del epidídimo o la próstata, genera altos niveles de ROS que exceden la capacidad protectora del fluido seminal.

El exceso de agentes oxidantes puede formar parte de reacciones específicas y no específicas con componentes celulares próximos como lípidos insaturados de las membranas, proteínas y ADN, impactando consecuentemente en los procesos celulares normales. Altos niveles de ROS son tóxicos para la función y calidad espermática y se han reportado en un 25-40% de los pacientes infértiles

Los principales efectos que tienen las especies reactivas sobre los espermatozoides son a nivel de membrana y núcleo, repercutiendo en la movilidad y la integridad del material genético, respectivamente.

Este efecto puede ser inducido a nivel testicular durante la espermatogénesis o a nivel post-testicular durante el transporte de los espermatozoides a través del tracto genital masculino. Tanto la presencia de especies reactivas del oxígeno en el tracto genital, como el bajo poder antioxidante contenido en el plasma seminal volverían al espermatozoide particularmente susceptible al daño. Como resultado de esto, las células son dependientes de la protección antioxidante ofrecida por el tracto reproductor masculino, principalmente en el epidídimo donde el espermatozoide permanece varios días completando el primer estadio de su maduración post-testicular.

### **Consecuencias del daño del ADN espermático en el resultado de las técnicas de reproducción asistida.**

Entre los parámetros clásicos que determinan una buena calidad seminal, tales como la movilidad, la morfología, la concentración o el estado de las membranas, la integridad de la molécula de ADN es crucial para llevar a cabo una fecundación con éxito.

El ADN del espermatozoide porta la mitad de las instrucciones necesarias para la

fecundación, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y postnatal. Numerosos autores han descrito que existe una correlación negativa entre las alteraciones en la organización del material genético en el núcleo espermático y el potencial fecundante de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro*

El daño en la línea germinal masculina ha sido asociado a una diversa variedad de resultados clínicos adversos aunque el impacto que tendrá dependerá del tipo de daño inducido (cadenas simples o dobles), la región del genoma afectado (intrones o exones) y la habilidad del ovocito para repararlo antes de iniciar la primera división mitótica.

Algunos estudios sugieren que cuando el estrés oxidativo es bajo, provoca daño en el ADN pero los espermatozoides mantienen intacta su capacidad de fecundar. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo es elevado provoca un daño severo en el ADN y además el espermatozoide pierde su capacidad fecundante debido al estrés oxidativo colateral que sufre su membrana plasmática, lo que le impide la correcta reacción acrosómica y fusión de membranas durante la fecundación. Este hecho se corrobora con los resultados de estudios clínicos que indican que el éxito de la fecundación *in vitro* (FIV) se correlaciona negativamente con el nivel de daño del ADN espermático.

Aun en técnicas de alta complejidad como la ICSI (Inyección intracitoplasmática de

espermatozoides), el daño en el ADN es un importante factor que determina una variedad de resultados clínicos adversos como fallas en la fecundación, bajo índice de implantación, disrupción de la implantación, pobre desarrollo embrionario e incremento de los abortos espontáneos.

### **¿Cómo detectamos el daño en el ADN espermático?**

Existen numerosas técnicas para estudiar la fragmentación del ADN espermático, aunque podríamos resumirlas en 2 grandes grupos:

1. Aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos, como *Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)*, *Sperm Chromatin Dispersion (SCD)*, Ensayo cometa, entre otros. Es decir, que miden indirectamente el daño.

2. Aquellos que marcan las roturas en la cadena de ADN, como ISNT (*In Situ Nick Translation*) o TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*) que permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, sean de cadena simple o cadena doble. La reacción se cataliza *in situ* mediante la acción de una transferasa terminal que incorpora deoxiuridina modificada en el extremo OH-3' de la cadena afectada. De este modo las roturas son detectadas directamente, dándonos el valor real del daño presente.

Actualmente, las técnicas de diagnóstico más robustas son aquellas que detectan el daño

de forma directa. Dentro de estas, la más difundida, es la técnica de TUNEL, utilizada en forma rutinaria en cualquier laboratorio de andrología.

### **¿En la práctica, se puede reducir el grado de daño en el ADN de las muestras?**

Numerosos autores han reportado una disminución en los niveles de fragmentación luego del uso de terapias antioxidantes. Estos podrían tener un efecto amortiguador sobre el estrés oxidativo que sufre el espermatozoide, aumentando de este modo su capacidad antioxidante. Este tipo de terapia podría funcionar como una estrategia preventiva frente a la vulnerabilidad al daño.

Otra posible opción terapéutica en muestras que presentan altos niveles de daño, es la realización de una biopsia de testículo. Se postula que la tasa de fragmentación del ADN espermático es marcadamente menor en el testículo si se la compara con el eyaculado, sin embargo, al ser una técnica altamente invasiva es poco difundida.

Finalmente, otra forma de abordar terapéuticamente a las muestras con altos niveles de daño es a través del uso de MACS (*Magnetic Active Cells Sorting*). Este procedimiento de separación o filtrado molecular a través de la utilización de Columnas de Anexina, se basa en la externalización de fosfatidilserina en las membranas plasmáticas de los espermatozoides que están por entrar en apoptosis. La externalización de fosfatidilserina es un marcador temprano del daño, ya que marca el inicio de la entrada en

apoptosis, que terminará con la translocación de nucleasas y la consecuente fragmentación del ADN en el núcleo. Los espermatozoides que externalizan fosfatidilserina se unirán a moléculas de Anexina V que, acopladas a las microesferas, quedarán adheridas a la columna de separación. De esta manera se logra la selección de espermatozoides no apoptóticos y se enriquece la muestra de espermatozoides que podrían llegar a ser usados en técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

Es necesario aclarar, que la utilización de estas técnicas, deben realizarse con un criterio clínico adecuado teniendo en cuenta los resultados diagnósticos previos. Los valores de TUNEL deben evaluarse de forma próxima al procedimiento, de manera de reducir las fluctuaciones propias del espermograma y así tener un valor más certero de lo que ocurre en ese ciclo espermático.

Bajo ningún punto es recomendable realizar la selección espermática sin tener valores de TUNEL lo suficientemente altos que justifiquen este procedimiento, o en aquellas muestras donde la relación costo - beneficio no sea razonable. La utilización de MACS en muestras para inseminación solo es recomendable cuando se parte de un espermograma con movilidad progresiva abundante, ya que el paso a través del campo magnético tiende a aminorar la movilidad. Finalmente, en muestras necrozoospermas, la utilización de columna de anexina no provee ningún beneficio.

## **Conclusiones**

El estudio de la patología espermática y el abordaje de las terapéuticas apropiadas para ello, requieren del trabajo interdisciplinario entre el conocimiento fisiopatológico que aportan las ciencias básicas y las herramientas que se construyen de manera aplicada a partir de éstos.

A partir de este nuevo paradigma, la etiopatogenia de la infertilidad masculina será objeto de estudio en un contexto donde se tenga en cuenta que la infertilidad es una condición compleja, donde existen diversos factores que interactúan y donde la labor de

cada área del conocimiento nos permitirá acercarnos más al diagnóstico correcto, y por ende a la terapéutica más acorde a cada patología.

Este resumen fue realizado a través del trabajo conjunto de veterinarios, químicos, biólogos y médicos que aunaron en una temática común a través de la experiencia laboral en la cual se desarrolla cada uno. Esperamos que haya cumplido con el fin de dilucidar inquietudes y dudas respecto a la temática desarrollada, aunque también, del mismo modo, permita hacernos nuevas preguntas en cuanto al rol que cumplen las especies reactivas y así empezar a comprender la complejidad de estos procesos.