

ENFOQUES SOBRE SEMEN, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

Med. Vet. Carlos E. Villa*. 2009. Taurus, Bs. As., 11(43):34-38.

*Ex Presidente de CABIA. Director del Laboratorio Villa de Diagnóstico.

laboratoriovilla@ciudad.com.ar

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Inseminación artificial](#)

INTRODUCCIÓN

Durante el transcurso de la Exposición Ganadera de Palermo 2008, tuvimos la oportunidad de escuchar, invitados por la firma Productos Agroganaderos, una interesante conferencia sobre "Factores que intervienen en la congelación del semen vacuno". La misma fue dictada por el conocido especialista en reproducción e inseminación artificial y ex Director Técnico del Centro de Inseminación Artificial de E Aigle, Francia, Dr. Gustavo De-cuadro Hansen.

Luego de una introducción, el disertante desarrolló el tema clasificando los factores que afectan la congelabilidad y fertilidad del semen en tres grupos:

- 1) Factores que influyen en la capacidad fecundante de un toro: características de los espermatozoides, efecto toro, efecto eyaculado, efecto edad, efecto familia y anomalías cromosómicas;
- 2) Medidas de manejo y medio ambiente y su incidencia en la calidad del semen obtenido: colecta de semen, sala de monta, estación del año y alimentación y
- 3) Tecnología de tratamiento de semen: diluyentes, curva de enfriado, número espermatozoides por dosis de inseminación artificial, número de espermatozoides viables por dosis, efecto del precio de la dosis de semen.

Dentro de las características de los espermatozoides, explicó claramente la importancia de que se mantenga durante el proceso de enfriado/congelado y descongelado la integridad de las membranas biológicas (plasmática, acrosomal externa y mitocondrial). Indicó también que la integridad físico-morfológica de éstas no garantiza que la célula sea viable, ya que puede haber daños en su organización, permeabilidad y composición lipídica.

En cuanto a la tecnología de tratamiento del semen, dividió los últimos avances en materia de diluyentes en dos tipos: a) aquellos que están relacionados a la protección de la membrana durante el proceso de congelación/descongelación, y b) aquellos que incorporan sustancias de carácter antioxidante (AOX) en el diluyente.

Explicó que el daño que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación/descongelación es ocasionado por efectos temperatura y osmótico, afectando la morfología y fisiología de los espermatozoides (incluyendo la regulación del calcio intracelular, la fluidez de la membrana plasmática, la permeabilidad, la composición lipídica y la actividad mitocondrial) e induciendo la pérdida de proteínas de membrana necesarias para la fecundación en el tracto reproductivo de la vaca. Los daños ocasionados por este proceso se minimizan incluyendo en el diluyente "crioprotectores" como el glicerol, yema de huevo y azúcares. Agregó que debido a la contaminación bacteriana que puede acompañar a la yema de huevo se ha buscado sustituirla, lo cual se ha logrado con éxito.

COLESTEROL Y OXIDACIÓN

La baja fertilidad del semen crioconservado es atribuida a cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que sufre una proporción significativa de las células espermáticas que conducen a la pérdida de viabilidad de los espermatozoides en el tracto genital. La presencia de yema de huevo es un factor crioprotector para las células espermáticas. El colesterol presente en la misma actúa como un núcleo esteroide que se inserta como un naípe dentro de la bicapa de la membrana y mediante interacciones hidrofóbicas con las colas no polares de los glucosfolípidos la estabiliza y flexibiliza, manteniendo junto con las proteínas las propiedades morfológicas y funcionales de la membrana. El efecto crioprotector de la yema de huevo se ejerce a través del aumento de la oferta del colesterol que estabiliza y da mayor flexibilidad a la bicapa y no a través del resto de sus lípidos.

La membrana plasmática del espermatozoide cumple un rol regulador importante en el mantenimiento de la viabilidad y funciones que permiten la fertilización del ovocito.

El espermatozoide, como toda célula, aprovecha sus nutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) a través de procesos oxidativos, de los cuales obtiene energía para mantener su viabilidad y funciones. El más importante es el que se lleva a cabo en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, principal fuente de ATP y también de radicales libres (ROS).

El aumento de los ROS puede dañar a los espermatozoides y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante, que causa peroxidación de los lípidos de la membrana, modificación de su fluidez y alteración de su permeabilidad, lo que puede conducir a la muerte celular.

La membrana de los espermatozoides contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le brinda una alta susceptibilidad a los problemas de daño oxidativo (oxidación o peroxidación), alterando la posibilidad de fecundación.

Decuadro Hansen mostró un importante número de experiencias en donde con el agregado de algunas sustancias antioxidantes a los diluyentes con yema de huevo se obtenían mejores resultados en cuanto a supervivencia espermática y tasas de NR. Esto no sucedía cuando se utilizaban diluyentes sin yema de huevo.

Vale la pena aquí intentar una explicación bioquímica teórica a todo esto, tratando de entender por qué las oxidaciones son malas o nocivas, si sabemos que todos los procesos catabólicos que las células utilizan para degradar los hidratos de carbono, lípidos y proteínas obteniendo a partir de ellos energía, básicamente en forma de ATP, son oxidaciones.

El elemento oxidante por naturaleza es el oxígeno y sin embargo sin él la célula de los seres superiores no vive, ya que los productos finales del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria son CO₂, ATP y H₂O y que esta última se forma por reducción del oxígeno. No obstante, el exceso de O₂ o determinadas sustancias intermedias con O₂ pueden ser dañinos para la célula, porque provocan estrés oxidativo.

FORMAS TÓXICAS DEL OXÍGENO

Todos los que trabajamos en espermatología, sabemos que cuando realizamos una prueba de termorresistencia, el resultado de un semen no será el mismo si lo incubamos dentro de la pajueta sin abrir (ambiente microaerófilo con 5% de O₂), que si lo volcamos -sin agregados- en un tubo y lo incubamos dentro de él (en amplio contacto con el 20 % de oxígeno del aire). Mantendrá mucho mejor el vigor y el porcentaje de espermatozoides móviles dentro de la pajueta que en el tubo. Por lo tanto concluimos que el oxígeno es necesario pero puede ser tóxico.

El oxígeno es un poderoso oxidante y un excelente aceptor de electrones que se reduce a agua en la cadena respiratoria. Algunas formas del oxígeno altamente tóxicas para la célula (capaces de producir oxidaciones indeseables) son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, cada uno de los cuales se produce como un producto transitorio durante la reducción del O₂ a H₂O en la respiración celular como mencionamos anteriormente.

Estos intermediarios transitorios son muy tóxicos, ya que tienen uno o más electrones desapareados, lo que los hace muy reactivos y oxidantes.

El superóxido es muy reactivo y puede oxidar prácticamente cualquier compuesto orgánico de la célula. Los peróxidos pueden dañar componentes celulares, pero los más tóxicos son los radicales hidroxilos que se producen a expensas de ellos. En general los radicales hidroxilos no se acumulan en las células debido a la acción de la enzima catalasa y también del glutatión reducido sobre los peróxidos. Pero la acción de esta enzima puede estar desbordada si se "obliga" a la célula a oxidar un exceso de ácidos grasos que producen peróxidos (como cuando se utiliza yema de huevo como diluyente).

Las células de los mamíferos tienen sistemas enzimáticos que destruyen estas formas tóxicas intermedias de la reducción del O₂, protegiéndolas:

- a) superóxido dismutasa: cataliza el pasaje de superóxido a peróxido,
- b) catalasa: cataliza la liberación de O₂ desde el peróxido,
- c) superóxido dismutasa/catalasa combinadas: reacción total de a + b y
- d) peroxidasa: cataliza la reducción del peróxido a agua utilizando al NAD reducido.

Hoy la ciencia considera que el proceso de envejecimiento, muerte celular, como también el daño al ADN que produce cáncer, deterioro mental, entre otros se deben a las oxidaciones indeseables producidas por los ROS. Así vemos que el oxígeno, elemento vital, puede dañar al organismo a través de los radicales libres.

Las membranas de los espermatozoides contienen alto porcentaje de ácidos grasos poli-insaturados y baja concentración de enzimas protectoras de las formas tóxicas del O₂ (catalasas, dismutasas, peroxidasas y glutatión reductasas). Esta mala relación entre ácidos grasos insaturados y enzimas protectoras convierte a los espermatozoides en células muy sensibles a las peroxidaciones por ROS.

Los ácidos grasos insaturados son imprescindibles para que las membranas mantengan (especialmente a bajas temperaturas) su fluidez o estado de mosaico fluido. Los ROS, al oxidar a los ácidos grasos, hacen que las membranas espermáticas pierdan su fluidez y que los espermatozoides disminuyan su motilidad y capacidad fertilizante. Este daño de membrana altera su permeabilidad y afecta a las bombas de Na⁺ y Ca²⁺, con la consecuencia del ingreso de estos cationes al interior del espermatozoide, alterando la osmolaridad, permitiendo la formación de fosfatos de calcio pocos solubles, agotamiento del ATP y activación por medio del Ca de enzimas proteolíticas y fosfolipídicas, entre otros procesos de señales intracelulares que provocan daño proteico y lipídico, alteraciones en el ADN y muerte celular.

ROL DE LOS ANTIOXIDANTES (AOX)

Las sustancias AOX son fundamentalmente de dos tipos: a) enzimáticas: como las catalasas, peroxidases, etc., descritas antes y b) no enzimáticas: como la Vitamina C (ácido ascórbico), Vitamina E (tocoferol) y el glutatión.

Estas sustancias con poder reductor sobre los ROS protegen a las membranas y componentes celulares del estrés oxidativo. Muchas se hallan en condiciones naturales en las células, pero como vimos no abundan en el espermatozoide.

En los experimentos que mostró el Dr. Decuadro Hansen, los AOX eran benéficos para el espermatozoide cuando se agregaban a diluyentes con yema de huevo, pero no aportaban mejoras si se utilizaban sobre diluyentes que no la tuvieran. La porción crioprotectora de la yema de huevo es el colesterol, pero los fosfolípidos que contiene pueden ser perjudiciales para el espermatozoide.

Una posible explicación, que necesita ser validada, acerca de la diferencia de acción de los AOX en caso de utilizar diluyentes con y sin yema de huevo es planteada en los siguientes párrafos.

La yema de huevo contiene cantidades muy importantes de fosfolípidos, con ácidos grasos de diversos tipos, incluso de cadena larga y ramificados. El espermatozoide obtiene normalmente la energía necesaria (ATP) del catabolismo (oxidación) de glúcidos simples (fructosa, glucosa y manosa) y de la oxidación final del piruvato que éstas producen en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Sin embargo, cuando incorporamos yema de huevo aumentamos en forma muy importante la oferta de lípidos y "obligamos" al espermatozoide a metabolizarlos. La oxidación de los ácidos grasos en las células de mamíferos se produce normalmente en la matriz mitocondrial y consta de tres fases: a) fase 1: o B-oxidación con producción de acetil-CoA; b) fase 2: ingreso de la acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, con producción de CO₂ y electrones y c) fase 3: pasaje de los electrones a través de la cadena respiratoria, con reducción final del O₂ a H₂O y producción de ATP.

Pero las mitocondrias no son el único lugar de la célula donde se oxidan los ácidos grasos. Existen otras organelas llamadas peroxisomas en las células animales que contienen enzimas capaces de oxidar a los ácidos grasos a Acetil-CoA, que además, a diferencia de las mitocondrias son capaces e imprescindibles para oxidar ácidos grasos de cadena larga (presentes en la yema de huevo). Los peroxisomas son organelas celulares rodeadas de membrana que tienen diferencias con la oxidación mitocondrial. En esta última, los electrones eliminados en el primer paso de la 13-oxidación (fase 1) pasan a través de la cadena respiratoria al O₂ para producir H₂O y ATP. En cambio en los peroxisomas (que no tienen los componentes de la cadena respiratoria), los electrones liberados en el primer paso pasan directamente al O₂ produciendo peróxido de hidrógeno y calor, sin síntesis de ATP. Este potente y peligroso oxidante es transformado inmediatamente por la enzima catalasa en H₂O y O₂.

Al aumentar la oferta de ácidos grasos, especialmente de cadena larga a través de la yema de huevo, se "obliga" al espermatozoide a utilizar más al peroxisoma y la actividad de la catalasa (que es escasa en éstos) puede ser rebasada. De aquí mi conclusión de por qué el agregado de catalasa y otros AOX funcionan como protectores del espermatozoide sólo en los diluyentes con yema de huevo. Hasta aquí he tratado de dar una explicación bioquímica lo más sencilla posible a los resultados de los experimentos mostrados por el Dr. Gustavo Decuadro Hansen. Siempre me gustó entender el por qué de los fenómenos biológicos y sólo aspiro a que estas líneas sirvan a algún colega para comprenderlos mejor.

Los interesados en leer una versión ampliada sobre el tema pueden pedirla directamente al autor a: laboratoriovilla@ciudad.com.ar

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Decuadro Hansen, G. 2008. Factores que intervienen en la congelación del semen vacuno. Conferencia Palermo. Buenos Aires.
- Gametes: The spermatozoon. Edited by Grudzinskas, J.C. & Yovich, J.L. Cambridge University Press. UK, 1955.
- Temas de Química General. 1995. Autores varios. 2ª edición. EUDEBA. Buenos Aires.
- Madigan, M.I., Martinko, J.M. y Parker, J. 2004. Biología de los Microorganismos. 101ª edición. Pearson Educación S.A. Madrid.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2006. Lehninger. Principios de Bioquímica. 6ª edición. Ediciones Omega. Barcelona.
- Palma, G.A. 2008. Biotecnología de la Reproducción 2ª edición. Ed. del autor. Mar del Plata.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2009. Lehninger. Principles of Biochemistry. Fifth Edition. W. H. Freeman & Co. New York.

Volver a: [Inseminación artificial](#)