ALTERACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE DURANTE EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS. PAPEL DEL GLUTATION

Gadea J, Sellés E, Marco MA, García-Vázquez FA, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D, Rodríguez JA, Sansegundo M, Matás C, Romar R, Ruiz S, Coy P.
Dep. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. jgadea@um.es
http:///www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

Los procesos de refrigeración y congelación producen una alteración física y química de las membranas espermáticas que tienen como consecuencia la reducción de la viabilidad celular y de su capacidad fecundante. Las alteraciones producidas por la reducción de la temperatura están asociadas con el denominado estrés oxidativo, que está inducido por la generación de agentes oxidantes (ROS). La consecuencia final es la peroxidación de los lípidos y una alteración grave de la funcionalidad espermática. El semen representa un complejo sistema redox que combina el potencial antioxidante del plasma seminal y de los espermatozoides con el potencial pro-oxidante del espermatozoide a través de la generación de ROS. El sistema defensivo antioxidante incluye una actividad enzimática (superóxido dismutasa, glutation reductasa, glutation peroxidasa y catalasa), así como la presencia de diversas sustancias con actividad antioxidadante (glutation reducido (GSH), urato, ácido ascórbico, Vitamina E, taurina, hipotaurina, carotenoides y ubiquinonas).

El glutation (L-g-glutamil-L-cisteinilglicina) es un tri-péptido distribuido en todas las células del organismo y juega un papel decisivo en el mecanismo de defensa intracelular frente el estrés oxidativo. La enzima glutation peroxidasa usa GSH como agente pare reducir el peróxido de hidrógeno hasta agua y el lipoperóxido hasta alquil-alcohol. Por otro lado, la forma oxidada del glutation (GSSG) se reduce hasta GSH mediante la enzima glutation reductasa usando NADPH como cofactor.

El objetivo de este trabajo es revisar y mostrar de forma conjunta las experiencias desarrolladas por nuestro grupo para evaluar la cantidad de GSH presente en la célula espermática porcina, estudiar como se altera como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación, y por último las posibilidades que puede aportar la adición de GSH a los medios de congelación y descongelación para mejorar la viabilidad y funcionalidad espermática. Parte de los resultados han sido publicado previamente (Gadea et al., 2004 y 2005)

MATERIAL Y MÉTODOS

Congelación espermática

Las muestras seminales obtenidas de verracos de fertilidad probada fueron congeladas en un medio con lactosa y yema de huevo. El semen fue envasado en pajuelas de 0.5 ml con una concentración final de 1 x 10^9 espermatozoides/ml, 3% de glicerol y 0.5% de Orvus et Paste. El proceso de descongelación se realizó mediante inmersión en un baño de agua circulante a 50ºC durante 12 segundos y posterior dilución en BTS a 37ºC.

Medición del contenido de GSH intracelular

El contenido en glutation fue determinado mediante un sistema fotométrico, en el que el glutation es oxidado por DTNB y entonces reducido por la glutation reductasa usando NADPH como donante de protones. El producto final de la reacción se detecta mediante cambios en la absorbancia a 412 nm.

Análisis de la funcionalidad espermática

Se ha utilizado una amplia batería de técnicas de análisis seminal entre las que se incluyen: motilidad (microscópica y mediante CASA), viabilidad (eosina-nigrosina, carboxifluoresceina/yoduro de propidio), actividad mitocondrial (R123), estado del acrosoma, inducción de la reacción acrosómica con progesterona y ionoforo de calcio, técnicas de penetración de ovocitos in vitro (IVP) y citometría de flujo (capacitación: M540/Yo-pro1; alteraciones de grupos thioles: 5-IAF, generación de ROS y grado de condensación cromatínica).

Experiencias:

1. Evaluación del contenido intracelular de GSH y variaciones durante el proceso de refrigeración y congelación.
2. Efecto de la adición de GSH al medio de congelación
3. Efecto de la adición de GSH al medio de descongelación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación del contenido intracelular de GSH y variaciones durante el proceso de refrigeración y congelación.

El contenido de GSH en espermatozoides porcinos fue determinado en 44 eyaculados de 27 diferentes verracos. El valor medio fue de 3.84 ±0.21 nM GSH/10^8 espermatozoides, mostrandose diferencias significativas entre los verracos ($P < 0.001$; rango 1.05-6.16 nM GSH/10^8 cells). El proceso de congelación provocó una reducción significativa del contenido de GSH (4.99 ±0.23 para semen fresco, 3.36 ± 0.34 para semen congelado), asociado a una disminución significativa de la calidad seminal.

2. Efecto de la adición de GSH al medio de congelación sobre la funcionalidad espermática.

Durante la fase de refrigeración (hasta 5 ºC), previa a la congelación propiamente dicha, la adición de 1 y 5 mM GSH no tuvo efecto alguno sobre los parámetros seminales (IVP, motilidad, viabilidad (DCF), actividad mitocondrial), proteínas de membrana y acrosomas). Sin embargo, al estudiar la fase de congelación, la adición de GSH mejoró la motilidad (microscópica y CASA), la integridad de membrana y la funcionalidad de la misma (mayor porcentaje de espermatozoides no capacitados y menor alteración de las proteínas de membrana).

3. Efecto de la adición de GSH al medio de descongelación sobre la funcionalidad espermática

La adición de GSH al medio de descongelación aunque no tuvo efecto alguno sobre los parámetros seminales rutinarios, incrementó las tasas de penetración de ovocitos madurados in vitro y la tasa de formación de pronúcleos masculinos. En un segundo experimento, con mayor número de animales se confirmó estos resultados (mayor capacidad de penetración) así como mejoraba la viabilidad y funcionalidad de las membranas del espermatozoide (menor grado de desestabilización de membrana). Igualmente los espermatozoides tratados presentaban una menor compactación de su cromatina y la producción de agentes oxidantes fue significativamente reducida.

Estos resultados preliminares en el estudio del sistema antioxidante del espermatozoide nos permite alcanzar algunas conclusiones. 1. La congelación produce un descenso del contenido de GSH. 2. Se presentan grandes diferencias entre machos tanto para los contenidos de GSH como en el porcentaje de reducción durante el proceso de congelación. 3. La adición de GSH al medio de congelación favorece la funcionalidad de membrana, de manera dosis dependiente y altamente influenciado por el efecto macho. 4. La adición de GSH al medio de descongelación favorece la funcionalidad espermática y la capacidad de penetración y formación del pronúcleo masculino. Sin embargo, es necesario estudiar con mayor profundidad las alteraciones que se producen en el sistema antioxidante (enzimático y no enzimático) y en los procesos pro-oxidativos de generación ROS durante el proceso de congelación espermática.

Esta actividad protectora del GSH demostrada en la especie porcina esta siendo evaluada en nuestros laboratorios en la actualidad en la especie humana (Molla et al. 2004; Selles et al. 2004) y en la especie bovina (Gumbao et al., datos no publicados). Igualmente se está evaluando la función de otros agentes antioxidantes presentes en la célula espermática (Ducci et al., 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ducci M, Pacchini S, Niccolini A, Gazzano A, Martelli F, Gadea J. Concentration of Carnosine, Anserine, l-Histidine and 3 methylhistidine in boar spermatozoa by a modified HPLC method. Reprod Dom Anim. Abstr. 2005
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology. 2004 Aug;62(3-4):690-701.
- Gadea J, García-Vazquez FA, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. J. Androl. 26 (3). 2005.
- Molla M, Selles E, Marco Ma, Remohi J, Balleseros A., Gadea J. Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. J. Andrology. 25 (Suppl.) 45. abstr. 2004.
- Sellés E, Mollá M, Ballesteros A, Remohí J, Landeras J, Gadea J. Effect of reduced glutathione on frozen-thawed human sperm. Andrologia 36:187. abstr. 2004.

Financiado con proyectos MCyT (AGL-2003-03144) y Fundación Séneca (PB/15/FS/02).