



Estudio de la función mitocondrial espermática humana

Lic. Patricia Silveira

Orientador: Rossana Sapiro

Co-orientador: Adriana Cassina

Depto. de Histología y Embriología

Depto. Bioquímica

Facultad de Medicina – Universidad de la República

Noviembre de 2016 Montevideo, Uruguay

Tabla de contenido

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	3
2.1 Infertilidad masculina	3
2.2 Estudio del semen	4
2.3 Causas de la infertilidad masculina.....	5
2.4 Características estructurales del espermatozoide humano	6
2.5 Formación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno: rol mitocondrial.	9
2.6 Estrés nitro-oxidativo.....	16
2.7 Rol fisiológico de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno: formación en el espermatozoide	18
2.8 Origen del estrés nitro-oxidativo en el espermatozoide humano e infertilidad ..	20
3 Hipótesis	22
4 Objetivos general y específico	22
4.1 Objetivo general:.....	22
4.2 Objetivos específicos:	22
4.2.1 Objetivo específico #1:	22
4.2.2 Objetivo específico #2:	22
4.2.3 Objetivo específico #3:	22
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	23
5.1. Población de estudio.....	23
5.2 Recolección y análisis de las muestras	23

5.3 Evaluación de la función mitocondrial espermática mediante ensayos de consumo de oxígeno.....	24
5.4 Formación de oxidantes por el espermatozoide: Determinación de la formación de peroxinitrito	25
Preparación de mitocondrias aisladas	25
Medida de la actividad succinato deshidrogenasa	26
Formación de peroxinitrito en la fracción enriquecida de mitocondrias espermáticas	26
Formación de peroxinitrito en células espermáticas intactas.	27
Purificación de espermatozoides por gradiente de densidad.	28
5.5 Estudio de las modificaciones postraduccionales producidas por estrés nitro-oxidativo.....	28
5.6. Inmunolocalización de la nitración por peroxinitrito	30
5.7 Medida de la formación de oxidantes por células leucocitarias presentes en la muestra de semen.	31
5.8 Desarrollo de un modelo de daño mitocondrial mediante el uso de un agente oxidante	32
Detección de la producción de ONOO^- en el modelo de daño	33
Evaluación del daño mitocondrial y vitalidad espermática mediante citometría de flujo.....	33
5.9 Análisis estadístico	34
5.10 Consideraciones éticas.....	34
6. RESULTADOS.....	36
6.1 Características de las muestras analizadas	36

6.2 La motilidad espermática se correlaciona con la disfunción mitocondrial	37
6.3 Las mitocondrias espermáticas aisladas son capaces de producir peroxinitrito .	40
6.4 La fuente principal de oxidantes <i>in vivo</i> son las mitocondrias de las células espermáticas.	42
6.5 Los espermatozoides representan la fuente principal de especies reactivas del oxígeno.....	45
6.6 Muestras con con bajo porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva muestran mayor estrés nitro-oxidativo	47
6.7 Los mayores niveles de nitración espontánea se detectan en la pieza intermedia y la cabeza del espermatozoide	48
6.8 Desarrollo de un modelo de daño mitocondrial.....	50
7 DISCUSIÓN	54
8 CONCLUSIONES.....	59
9 PERSPECTIVAS.....	59
10 REFERENCIAS	61

ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre completo
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$\cdot\text{NO}_2$	Dióxido de nitrógeno
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
3-Tyr- NO_2	3-nitrotirosina
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
AA	Antimicina-A
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
BWW	Biggers Whitten Whittingham
CASA	Computer-assisted sperm analysis
Cit-C	Citocromo c
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	Radical carbonato
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DCPIP	Diclorofenol-Indofenol
DHR-123	Dihidroxirodamina-123
ETC	Cadena transportadora de electrones
FAD/FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido (oxidado/reducido respectivamente)
FCCP	carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
Fmlp	formilmetionil-fenilalanina
HCO_3^-	Bicarbonato
HRP	Peroxidasa de rábano
IP	Ioduro de propidio
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NAD^+/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado/reducido respectivamente)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOC-7	3-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-propanamine
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPHoxidasas
O_2	Oxígeno molecular
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical Superóxido
OMS	Organización Mundial de la salud
	Peroxinitrito
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
RCR	Índice del control respiratorio
RH	Rodamina

RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SIN-1	3-Morpholinosydnnonimine hydrochloride (dador de $O_2^{\bullet-}$ + $\bullet NO$)
SOD	Superóxido dismutasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Tyr[•]	radical tirosilo

1 RESUMEN

La infertilidad conyugal se define como la dificultad de la pareja para concebir un hijo por métodos naturales después de un año de relaciones sexuales regulares, sin uso de métodos anticonceptivo. Se estima que el 15% de las parejas sufren esta condición. Las causas de la infertilidad en la pareja responden en un 50% de los casos a un factor masculino solo o combinado con causas femeninas. No se conocen con certeza cuáles son las causas de la infertilidad masculina, más aún en muchos casos no existen estudios diagnósticos que determinen el origen de la misma y el diagnóstico de infertilidad se basa en la historia clínica del hombre y en el espermograma o análisis del semen. Este último solamente en raras ocasiones determina claramente si el hombre es fértil o infértil. Creciente evidencia señala al estrés oxidativo como una de las principales causas responsables de la infertilidad masculina. Se ha detectado un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno, las cuales se asocian a la pérdida de motilidad y disminución de la capacidad de fusión ovocito-espermatozoide, es decir pérdida en la función espermática. La mitocondria constituye la principal fuente de formación de especies reactivas a nivel intracelular. Estas especies altamente oxidantes y nitrantes, pueden reaccionar con proteínas y lípidos mitocondriales provocando daño por estrés nitro-oxidativo, lo que conlleva a un aumento aun mayor de la formación de especies reactivas. En este trabajo nos planteamos evaluar la función mitocondrial, detectar la formación de especies reactivas y buscar huellas que evidencien el estrés nitro-oxidativo en espermatozoides humanos. Nuestro estudio de la función mitocondrial realizado mediante ensayos de consumo de oxígeno en células espermáticas intactas de 130 donantes, mostraron que existe un correlación positiva entre la disfunción mitocondrial y la motilidad espermática. Detectamos la formación de peroxinitrito así como la nitración de proteínas en la pieza intermedia de los espermatozoides, región donde se localizan las mitocondrias. Observamos que las muestras con bajo porcentaje de células espermáticas motiles presentaron mayores niveles de nitración proteica que las muestras con alto porcentaje de células motiles. Demostramos que los espermatozoides pueden producir especies reactivas del oxígeno principalmente en la

pieza intermedia donde se encuentran las mitocondrias. En conjunto estas evidencias indican que la disfunción mitocondrial observada en los espermatozoides induce un aumento en la formación de oxidantes que llevan al deterioro de la motilidad espermática. Estos datos proporcionan la prueba de función para utilizar drogas dirigidas a mejorar la condición mitocondrial como forma de tratamiento de la infertilidad masculina

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Infertilidad masculina

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad conyugal como la dificultad de la pareja para concebir un hijo por métodos naturales después de un año de relaciones sexuales regulares, sin uso de métodos anticonceptivo (1) (2). Según datos que fueron obtenidos de la Unidad de Reproducción Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossel, en nuestro país al igual que a nivel mundial, el 15 a 20% de las parejas tienen problemas de infertilidad (2). En este contexto, según el censo realizado por el Instituto Nacional de Estadística de Uruguay en el 2011 aproximadamente 6.000 parejas se encuentran en esta situación. La infertilidad conyugal es una enfermedad que si bien no afecta físicamente al individuo produce importantes daños psicológicos a sus integrantes, muchas veces llevándolos a tratamientos largos, costosos y no siempre obteniendo resultados acordes (3). Para muchas parejas tener descendencia constituye un objetivo esencial en su vida, por lo cual no alcanzarlo puede tener un fuerte impacto negativo llevándolos a un profundo desgaste emocional, frustración y debilitamiento personal (4)(5).

El embarazo se produce por una sincronía perfecta entre una serie de procesos fisiológicos complejos y una anatomía normal del aparato reproductor tanto femenino como masculino. Es fácil entender entonces que cualquier alteración de uno de ellos puede causar infertilidad. El 30% de los casos de infertilidad se atribuye a problemas de origen femenino, otro 30% se debe a problemas masculinos, mientras que un 20% corresponde a un factor masculino conjuntamente con uno femenino (Figura 1). El 20% restante se debe a infertilidad donde se desconoce cuál miembro de la pareja es el afectado principalmente. Teniendo en cuenta estas estadísticas la infertilidad causada por un factor masculino asciende a un 50% (6,7). La causa de infertilidad masculina es desconocida aproximadamente en el 30% de los casos (8). Esto es consecuencia en gran medida a la falta de conocimiento sobre las bases celulares y moleculares de la disfunción espermática. Este desconocimiento trae como consecuencia la falta de nuevas metodologías para el diagnóstico más preciso de la

causa de infertilidad así como la ausencia, en mucho de los casos, de tratamiento adecuado para esta condición (9,10).



Figura 1. Esquema representativo del porcentaje de incidencia de los factores femeninos y masculinos en la infertilidad.

2.2 Estudio del semen

Para el estudio de la infertilidad masculina se debe realizar la evaluación clínica del varón. A diferencia de los múltiples estudios para identificar los factores causales femeninos, el análisis del varón cuenta casi exclusivamente con el estudio básico del semen, el espermiograma. Si bien este estudio aporta invaluable información, salvo excepciones no es diagnóstico de fertilidad ni de infertilidad (2). Los resultados obtenidos del análisis del semen al ser comparados con los valores de referencia establecidos por la OMS ofrecen un valor solamente predictivo del estado fértil del individuo (2). El estudio básico del semen evalúa las cualidades macroscópicas como: aspecto visual, olor, licuefacción, viscosidad y volumen. También incluye el examen de las propiedades microscópicas: concentración espermática, número total de espermatozoides, motilidad y vitalidad espermática. Además, se realiza el recuento diferencial según la morfología espermática y la evaluación de la presencia de detritus y otros tipos celulares en semen (2,11). La OMS estipula como un recuento espermático normal el conteo igual o superior a 15.000.000 cel/mL. La motilidad espermática se clasifica en: *i*) espermatozoides progresivos rápidos (motilidad tipo a), *ii*) progresivos lentos (motilidad tipo b), *iii*) espermatozoides no progresivos, que se mueven en el lugar (motilidad tipo c) y *iv*) no móviles (motilidad tipo d). Se consideran valores normales aquellos iguales o mayores a 32% de motilidad progresiva (motilidad

a+b). Frente a valores inferiores al 32% el paciente presenta una astenozoospermia. Otra característica ampliamente referenciada en el espermograma es la morfología de la célula espermática. Los criterios definidos por la OMS, establecen como límite inferior 4% de espermatozoides morfológicamente normales en la muestra de semen (12,13). Los hombres cuyos parámetros seminales (morfológicos y de motilidad) estén por debajo de los valores establecidos por la OMS se asocian a dificultades de fertilidad (Tabla 1) (14). El espermograma permite orientar hacia una participación masculina en la subfertilidad de pareja pero usualmente no ayuda a determinar con exactitud la causa de la infertilidad masculina.

Tabla 1. Valores de referencia según la OMS de los parámetros seminales

Parámetro seminal	Valor de referencia OMS 5^{ta} edición (2010)
Volumen	≥2mL
pH	7.2 a 8
Recuento espermático	≥ 15.000.000/mL
Motilidad	a+b ≥32%
Morfología (Criterio Kruger y col, 1986)	4%
Células redondas	≤ 1.000.000/mL

2.3 Causas de la infertilidad masculina

El 40-50% de los casos de infertilidad se deben a causas conocidas, de origen intrínseco y/o extrínseco. Dentro de las causas intrínsecas se destacan alteraciones en la producción y desarrollo de los células espermáticas; alteraciones inmunológicas, con generación de anticuerpos contra sus propios espermatozoides y varicocele, entre otros (15). Por otra parte los factores extrínsecos asociados a la infertilidad son el estilo de vida, alimentación, tóxicos ambientales, exposición a radiación y el consumo de drogas de recreación tales como, marihuana, cocaína, tabaco y de alcohol (16–19). Cuando la infertilidad no presentan una causa específica no siempre se observa deterioro en la calidad espermática a través del espermograma, pero la capacidad de fecundar así como el desarrollo embrionario se ven comprometidos (20). Esto sugiere la existencia de alteraciones funcionales en los espermatozoides que impiden la

fecundación. Para dilucidar estas alteraciones se realizan otros estudios que complementan el espermiograma clásico y que incluyen estudios funcionales: test post-coital, evaluación de la reacción acrosómica inducida, prueba de interacción del espermatozoide con la membrana del ovocito o test de hamster, test hiposmótico, daño del ADN espermático y análisis de las características cinéticas del movimiento espermático (21,22). Desafortunadamente en muchos de los casos estas pruebas funcionales no logran dar respuesta a la etiología de la infertilidad. En la búsqueda de los factores que subyacen las causas de infertilidad el estrés oxidativo es considerado cada vez más una de las principales causas responsables de la misma (23,24). Identificar dichos mecanismos podrá dar lugar al desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la infertilidad masculina.

2.4 Características estructurales del espermatozoide humano

Es importante destacar la particularidad estructural de la célula espermática. Durante la espermiogénesis, la espermátida sufre una serie de reordenamientos donde pierde gran parte del componente citoplasmático y muchos organelos. Este proceso le permite adquirir la estructura funcional definitiva del espermatozoide (Figura 2) (25).

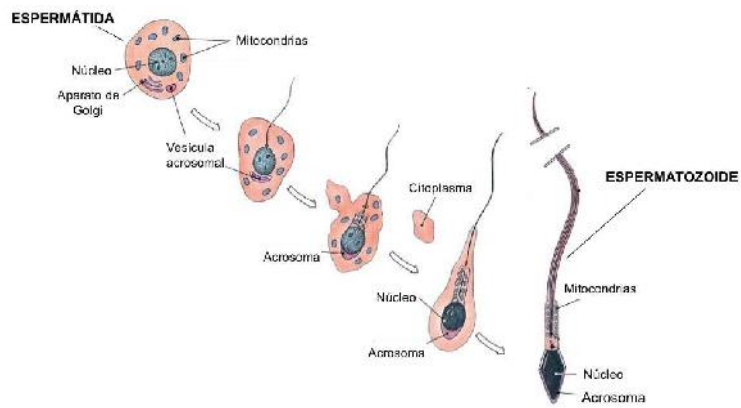


Figura 2. Etapas del proceso de espermiogénesis. Cambios citoplasmáticos y nucleares que transforman una célula redonda (espermátida) en espermatozoide (26).

La estructura del espermatozoide maduro se compone de la cabeza y la cola. En la cabeza se localiza mayoritariamente el núcleo rodeado de escaso citoplasma y recubierto en sus dos tercios anteriores por el acrosoma. Este último se forma a partir del Aparato de Golgi y contiene en su interior enzimas necesarias para la digestión de las capas que rodean al ovocito. La cola o flagelo es la estructura que brinda la motilidad asegurando el pasaje del espermatozoide por el tracto genital femenino hasta el encuentro con el ovocito (Figura 3A).

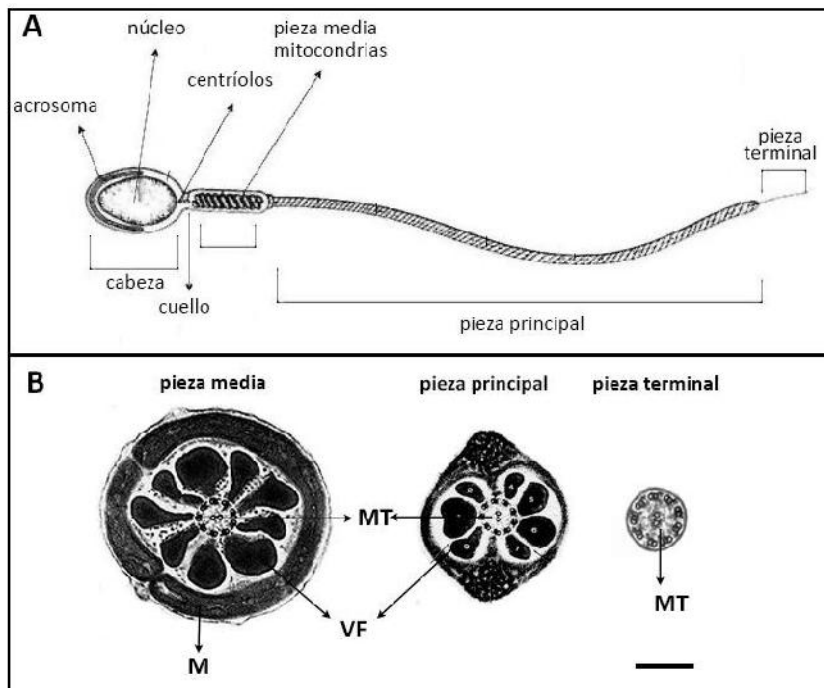


Figura 3. Estructura espermática. A) Diagrama de un espermatozoide humano donde se observan las principales partes, cabeza y flagelo. El flagelo se divide en cuatro piezas: cuello, media, principal y terminal. B) Micrografías electrónicas de transmisión de secciones transversales de tres segmentos del flagelo espermático. La vaina mitocondrial (M) rodea a la pieza media. Por debajo se disponen diversas vainas fibrosas (VF). En el centro de los tres segmentos se ubican los microtúbulos (MT), siendo este el único componente de la pieza terminal. Barra = 0.2 μm (27).

Acompañando toda la extensión del flagelo se encuentra el axonema, componente del citoesqueleto que regula el movimiento espermático (Figura 3B). El axonema consiste en dos microtúbulos centrales rodeados por una hilera de nueve dobletes de microtúbulos. La fuerza impulsora del espermatozoide es proporcionada por la dineína, otra proteína del citoesqueleto unida a los microtúbulos. El flagelo se divide en cuatro regiones que pueden ser diferenciadas por la naturaleza de las estructuras que rodean al axonema. Desde la base de la cabeza se extiende la primera región denominada pieza conectora o cuello. En esta región se encuentran los centriolos proximal y restos del distal. A continuación se extiende la pieza media, ésta se compone de 9 fibras densas que rodean al axonema brindando soporte estructural al

mismo. Más externamente se localiza la característica vaina de mitocondrias. Estas últimas, en número variable de acuerdo a las especie, se asocian con las fibras densas y el axonema, rodeándolos en forma helicoidal (28). A medida que la membrana externa de una mitocondria entra en contacto con otra se forman puentes disulfuro muy estables, creando una especie de cápsula donde las mitocondrias se unen unas con otras (29). Más aún, las proteínas claves que conforman a las mitocondrias espermáticas son isoformas diferentes de las mitocondrias somáticas lo cual puede tener implicancias funcionales aún no suficientemente exploradas (30).

La denominada pieza principal continua a la pieza intermedia del flagelo, en ella, desaparecen las mitocondrias y dos de las fibras densas conforman una vaina fibrosa que rodea al axonema. Las siete fibras densas restantes rodean el axonema y le confieren una asimetría estructural al flagelo que ha sido postulada como base de la asimetría observada en el batido flagelar. Por otro lado la vaina fibrosa, ubicada por fuera de las mismas presenta un rol estructural pero también es soporte de varias enzimas vinculadas al metabolismo espermático. La pieza principal se estrecha progresivamente a medida que se aproxima a la región terminal.

La porción terminal del flagelo, contiene únicamente el axonema cubierto por la membrana plasmática.

2.5 Formación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno: rol mitocondrial.

Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente, por sus siglas en inglés) fueron inicialmente integradas al concepto biológico como agentes exclusivamente tóxicos y asociadas a patologías. Actualmente sabemos que también tienen un rol fisiológico regulando cascadas de señalización. Además, se forman naturalmente como productos del metabolismo mitocondrial, durante el proceso de respiración celular (31,32).

Estructura de la mitocondria: De igual manera que las mitocondrias de células somáticas, las presentes en los espermatozoides se componen de dos membranas. La más externa, es fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones, los cuales difunden a través de la membrana por canales transmembrana. Dispuesta en forma

paralela a la membrana mitocondrial externa (MME), se localiza la membrana mitocondrial interna (MMI). Esta última se invagina formando pliegues que se internalizan en la matriz mitocondrial, estos permiten aumentar el área rica en proteínas claves del metabolismo mitocondrial. Las membranas mitocondriales delimitan dos compartimentos. Uno de ellos, la matriz, corresponde al área delimitada por la MMI. En ella se encuentran enzimas claves del metabolismo intermediario mitocondrial que participan en el catabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. La acetil-CoA, formada en la matriz mitocondrial a partir de la descarboxilación oxidativa del piruvato, se condensa con oxalacetato rindiendo citrato, la primer reacción del Ciclo de Krebs catalizada por la enzima citrato sintasa. De esta forma la acetil-CoA proveniente tanto del catabolismo de los glúcidos como de los ácidos grasos, se oxida completamente a CO_2 en el Ciclo de Krebs. La energía liberada en esta oxidación se conserva en los transportadores de electrones reducidos nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH_2). Estas coenzimas reducidas son capaces de ceder un par de electrones a la cadena respiratoria (ETC, por sus siglas en inglés). El otro compartimento es el espacio intermembrana, localizado entre las dos membranas (Figura 4A). En la MMI se alojan los complejos proteicos de la cadena respiratoria y el complejo V o ATPsintasa, responsables de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) (33). La cadena respiratoria está integrada por una serie de transportadores moleculares por donde pasan los electrones hacia el aceptor final, el oxígeno (O_2), el cual se reduce a agua (H_2O) (34). El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y II (succinato deshidrogenasa o succinato ubiquinona óxido reductasa) aceptan electrones provenientes de las coenzimas reducidas NADH y FADH_2 respectivamente. Ambos complejos ceden los electrones a la coenzima Q o ubiquinona (CoQ), esta puede aceptar un electrón transformándose en radical semiquinona o dos electrones reduciéndose completamente a ubiquinol. El complejo III (ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa) es el responsable de acoplar la transferencia de electrones contenidos en el ubiquinol para ser cedidos al citocromo c (Cit-c). El pasaje de electrones por este sector de la cadena es complejo y escalonado, los electrones son cedidos por diferentes centros del complejo III que finalmente se lo ceden a Cit-c.

Este último es una proteína soluble que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la parte exterior de la MMI, que luego de aceptar un electrón difunde hacia el complejo IV (citocromo c oxidasa). En este último paso de la cadena respiratoria los electrones son cedidos al O_2 reduciéndolo a H_2O . La energía que se genera en el pasaje de electrones por los complejos I, III y IV permite la salida de protones (H^+) en contra de su gradiente de concentración hacia el espacio intermembrana, lo que genera un potencial de membrana negativo en la matriz mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esta energía almacenada en $\Delta\Psi_m$ es utilizada por la ATP sintasa (complejo V) para formar ATP a partir de ADP (adenosina 5'-difosfato) y fosfato inorgánico (Pi) (35–37)(Figura 4B).

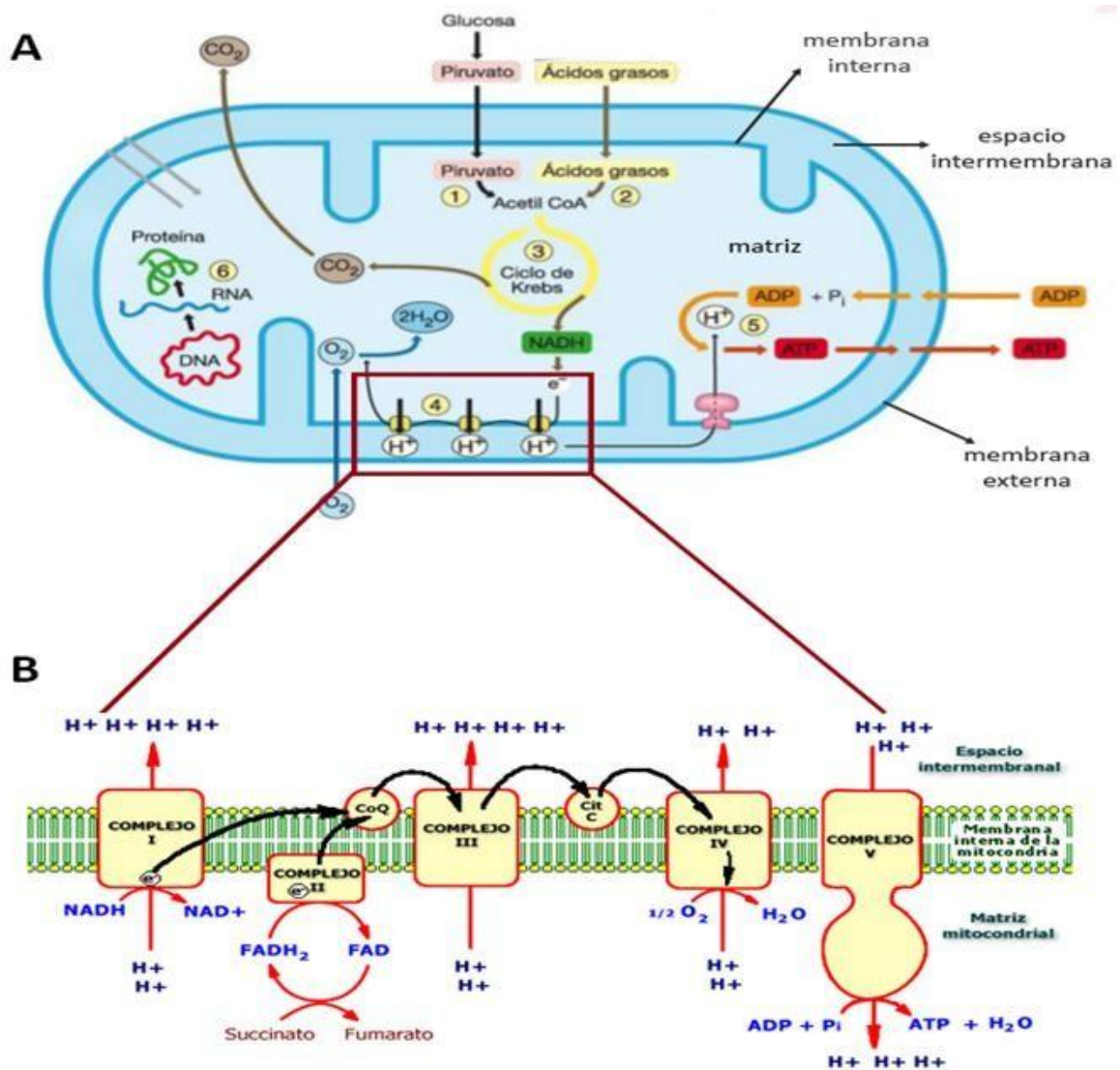


Figura 4. Esquema de la estructura de la mitocondria. A) En el esquema se observa las principales funciones de este organelo. En (1) y (2) se representa el metabolismo oxidativo de glúcidos y ácidos grasos dando lugar a la formación de acetil-CoA. Ciclo de Krebs (3). En esta etapa la acetil-CoA se oxida y la energía liberada se acumula como energía química en las moléculas de NADH y FADH₂. La energía de estas moléculas se utiliza para la síntesis de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (4 y 5). En la matriz se encuentran también varias copias de ADN mitocondrial cuyos genes codifican para diversas proteínas de la propia mitocondria (6). **B)** Se representan los cuatro complejos (I al IV) que participan en el transporte de electrones y forman la cadena respiratoria que acoplada a ATP sintasa (complejo V) sintetizan ATP (38).

Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno: La mitocondria cumple un rol fundamental en la producción de energía para el funcionamiento celular y también constituye la principal fuente de formación de ROS a nivel de la cadena respiratoria. Durante la respiración celular el O_2 se reduce a H_2O y la energía de esta reacción se utiliza para la síntesis de ATP. El 0.1-2% del total del O_2 se reduce parcialmente dando lugar a la formación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) una de ROS (39,40). El $O_2^{\bullet-}$ se produce por la fuga de electrones a nivel del complejo I y III a través de la reducción monovalente del O_2 [Ec.1] (Figura 5) (41,42).

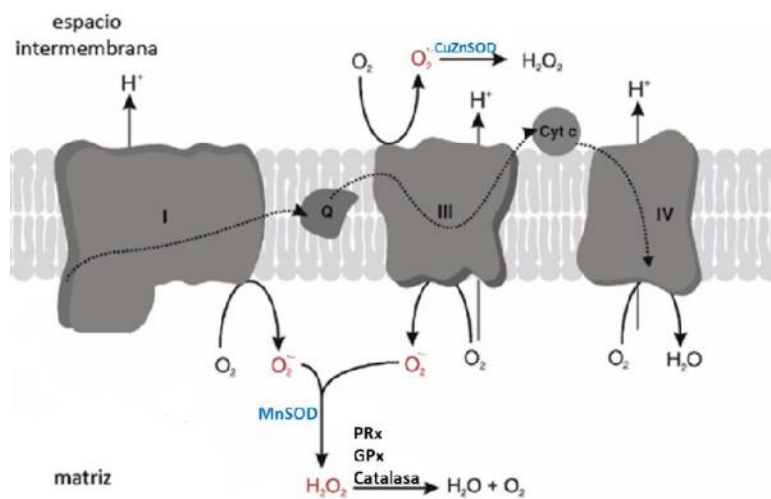
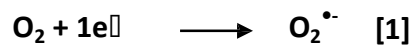
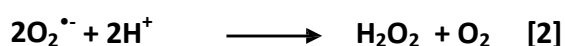


Figura 5. Formación de ROS. El radical $O_2^{\bullet-}$ se forma por la reducción monovalente del O_2 a través del complejo I y III de la cadena respiratoria. El $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar mediante la acción de la CuZnSOD del espacio intermembrana o por Mn-SOD en la matriz mitocondrial a H_2O_2 . En células con gran capacidad antioxidante el H_2O_2 puede ser eliminado por acción de glutatión peroxidasas-reductasa (GPx), peroxirredoxinas (PRx), catalasa. Modificado de Kowaltowski y col. (36).

El radical $O_2^{\bullet-}$ una vez formado, puede dismutar espontánea (constante de velocidad del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) o enzimáticamente mediado por la superóxido dismutasa (SOD, constante de velocidad $1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y producir peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), que es una molécula oxidante, relativamente estable (43,44). Existen tres variantes de la SOD, manganeso (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial, la cobre-zinc (CuZnSOD) citosólica y la EC-SOD extracelular. Estas constituyen una de las defensas antioxidantes principales que poseen los sistemas biológicos (45). En los mecanismos de detoxificación del H₂O₂, participan sistemas enzimáticos (peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa-reductasa y catalasas) y no enzimáticos (glutatión, ascorbato y vitamina A y E) los cuales reducen el H₂O₂ a H₂O [Ec.2] (Figura 5) (46).



Conjuntamente, el O₂^{•-} y el H₂O₂ son las principales especies reactivas generadas a nivel mitocondrial. En presencia de un metal de transición, como ión ferroso (Fe²⁺), el H₂O₂ se puede reducir a radical hidroxilo (•OH) (reacción de Fenton) generando así uno de los oxidantes más potentes [Ec. 3] (Figura 6) (47).

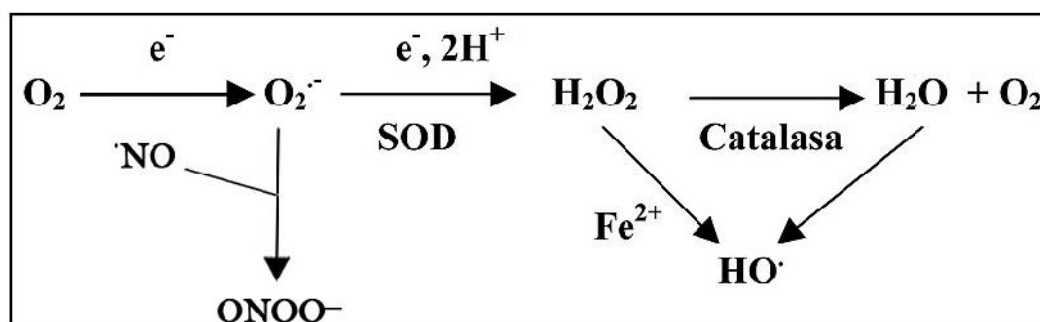
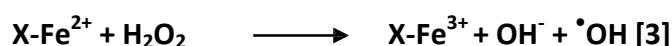


Figura 6. Formación de ROS a partir de la reducción del O₂.

Se han demostrado otros sitios importantes de formación de O₂^{•-}/H₂O₂ a nivel mitocondrial, además del complejo I y III de la cadena respiratoria, como 2- oxoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y succinato dehidrogenasa (48).

El anión $O_2^{\bullet-}$ formado a nivel mitocondrial puede reaccionar con el radical óxido nítrico ($\bullet NO$). El $\bullet NO$ se forma a partir de la oxidación de L-Arginina a L-citrulina catalizado por la enzima denominada óxido nítrico sintasa (NOS por sus siglas en inglés). Existen tres isoformas de esta enzima la endotelial eNOS, neuronal nNOS y la inducible iNOS (Figura 7).

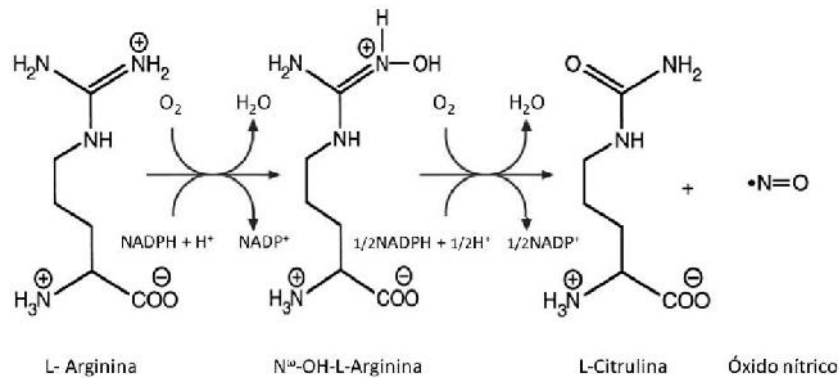
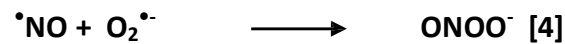


Figura 7. Esquema ilustrativo de la formación de $\bullet NO$ a partir del metabolismo de la L-arginina por la acción de la NOS (49).

El $\bullet NO$ difunde a través de las membranas biológicas y en la mitocondria reacciona con el radical $O_2^{\bullet-}$ formando una especie altamente oxidante y nitrante, el pero initrito ($ONOO^-$) con una constante de reacción de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Ec.4](Figura 8) (50,51).



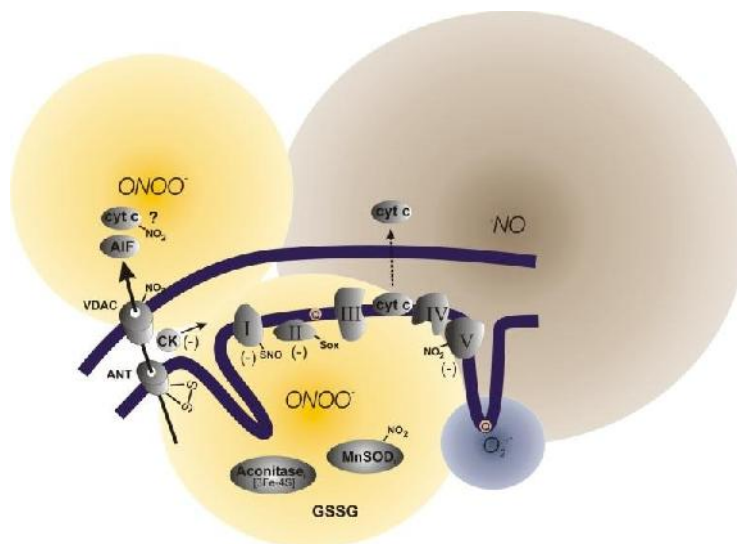


Figura 8. Esquema de la formación de ONOO⁻. Se observa que ante la formación de a nivel de la ETC y en presencia de un flujo de NO se forma ONOO⁻ a nivel mitocondrial (52).

2.6 Estrés nitro-oxidativo.

Cuando las ROS se producen en exceso el sistema antioxidante no logra neutralizar el efecto de estas especies. Este desbalance entre los oxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, conlleva a la desregulación de la señalización redox y daño molecular (53). El aumento significativo de la formación del radical $O_2^{\bullet-}$ en presencia de $^{\bullet}NO$ dan lugar a la formación de $ONOO^-$. Dada su naturaleza altamente reactiva puede rápidamente reaccionar con biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico, induciendo múltiples efectos adversos en la viabilidad y función celular. La nitración de proteínas es una de las principales huella a nivel molecular que nos indican la formación de $ONOO^-$ *in vivo* (54,55). El $ONOO^-$ puede dar lugar a la nitración de proteínas mediante la generación de radicales libres secundarios (por homólisis de $ONOOH$ o del aducto que se forma entre el $ONOO^-$ y el CO_2). Este proceso de modificaciones postraduccionales en los residuos de tirosina proteica da lugar a la formación de 3-nitrotirosina (3-Tyr- NO_2) (56). El mecanismo por el cual se incorpora un grupo $-NO_2$ a residuos de tirosinas de las proteínas es un proceso en pasos sucesivos que implican: la oxidación de proteínas por un electrón da lugar a la formación de un radical tirosilo (Tyr $^{\bullet}$) [EC. 5], que luego se reacciona con $^{\bullet}NO_2$ para dar lugar a la 3-Tyr- NO_2 [Ec.6] (Figura 9) (57). Como se observa en la figura 9, la formación de 3-Tyr- NO_2

también puede darse por combinación con $\cdot\text{NO}$ para dar 3-nitrosotirosina y su posterior oxidación secuencial por dos electrones dando lugar a la formación de 3-Tyr- NO_2 .

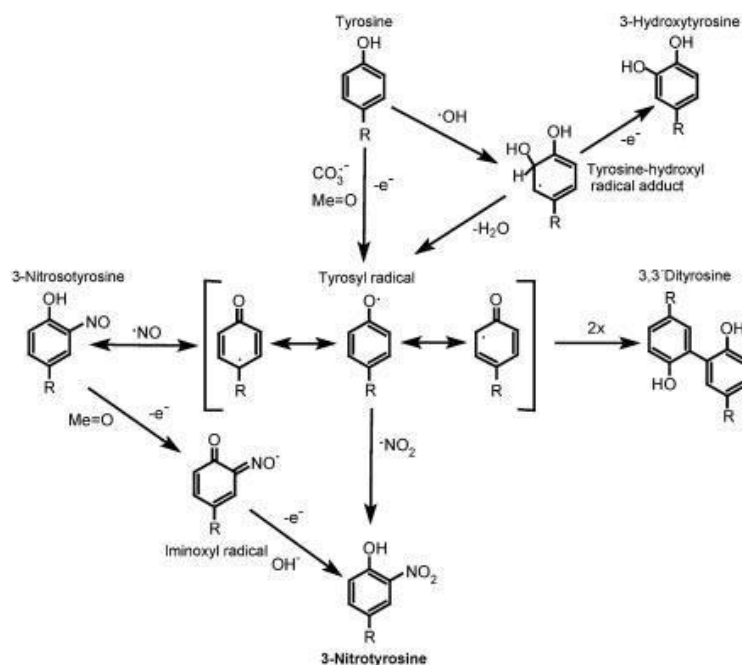
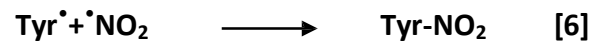
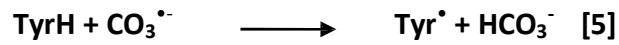


Figura 9. Esquema de la nitración proteica. En presencia de CO_2 el ONOO^- produce los oxidantes $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$, en la primera etapa del proceso de nitración el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ reacciona con los residuos de tirosina dando lugar al radical $\text{Tyr}^{\cdot}$. En la segunda etapa el $\cdot\text{NO}_2$ se adiciona rápidamente al radical $\text{Tyr}^{\cdot}$ formado 3-Tyr- NO_2 . Tomado de Radi. y col. (56).

La acumulación de moléculas nitradas refleja un desbalance entre la formación de oxidantes y antioxidantes denominado recientemente estrés nitro-oxidativo. El estrés nitro-oxidativo podría alterar la función de las propias enzimas mitocondriales

induciendo así la disfunción mitocondrial provocando un aumento aún mayor en la formación de ROS (58).

2.7 Rol fisiológico de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno: formación en el espermatozoide

Las ROS y RNS modulan diversos procesos fisiológicos y activan vías de señalización mediadas por segundos mensajeros. Las ROS pueden generarse por la propias células o en el ambiente que las rodea (59). Datos recientes indican que pequeñas cantidades de ROS y RNS son necesarias para que el espermatozoide adquiera la capacidad fecundante regulando procesos claves de la capacitación como la hiperactivación y reacción acrosómica(60–62).

Capacitación: Luego de la eyaculación, los espermatozoides no presentan las características estructurales ni bioquímicas necesarias para lograr la fecundación. Durante su trayecto por el tracto genital femenino sufren una serie de cambios que les permiten alcanzar la capacidad fecundante que se denominan colectivamente capacitación. Luego de la eyaculación los espermatozoides exhiben un patrón de motilidad caracterizado por trayectorias lineales, asociadas a ondas flagelares de alta frecuencia, baja amplitud y simétricas (63,64). Este tipo de trayectoria le brinda la fuerza de propulsión necesaria para que los espermatozoides puedan atravesar el mucus cervical, una de las primeras barreras del tracto femenino. A medida que ascienden por la vagina y la cavidad uterina para llegar al ovocito se produce cambios en el patrón de movimiento (hiperactivación), aumenta la fluidez de la membrana plasmática y se desencadena la reacción acrosómica. Estos tres procesos, son en primera instancia los que aseguran la fecundación del ovocito (65,66). Los movimientos del espermatozoide observados en el estado de hiperactivación se caracterizan por ondas flagelares asimétricas, de gran amplitud y velocidad, los cuales determinan trayectorias no progresivas (67). Este tipo de movimiento asegura la penetración por la zona pélcida, capa mucosa que rodea al ovocito, otra de las barreras que debe sobrepasar el espermatozoide para lograr la fecundación (Figura 10) (68).

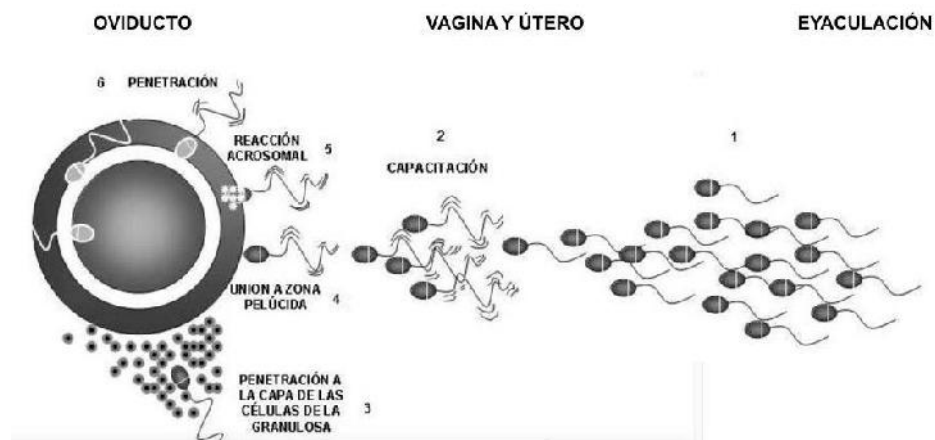


Figura 10. Procesos fisiológicos previos a la fecundación. Se esquematiza la motilidad espermática en el momento de la eyaculación, los cambios de este parámetro y el proceso de capacitación durante el trayecto por el tracto genital femenino hasta el encuentro con el ovocito. Tomado de Rios y col. (69).

Los procesos involucrados en la capacitación son muy complejos y aun no se conocen en profundidad. Se sabe que alguno de los eventos tempranos de la capacitación involucra la entrada de calcio, aumento en el adenosín monofosfato cíclico (cAMP). En etapas tardías, se desencadena la fosforilación de proteínas, puntualmente en el residuo de tirosina (70–72). Algunas de la evidencias muestran que en presencia de SOD las células espermáticas no logran alcanzar el estado capacitado, sugiriendo que el $O_2^{\bullet -}$ que se forma extracelularmente es fundamental para este proceso (73). La exposición exógena a H_2O_2 induce la capacitación espermática (Figura 11)(74).

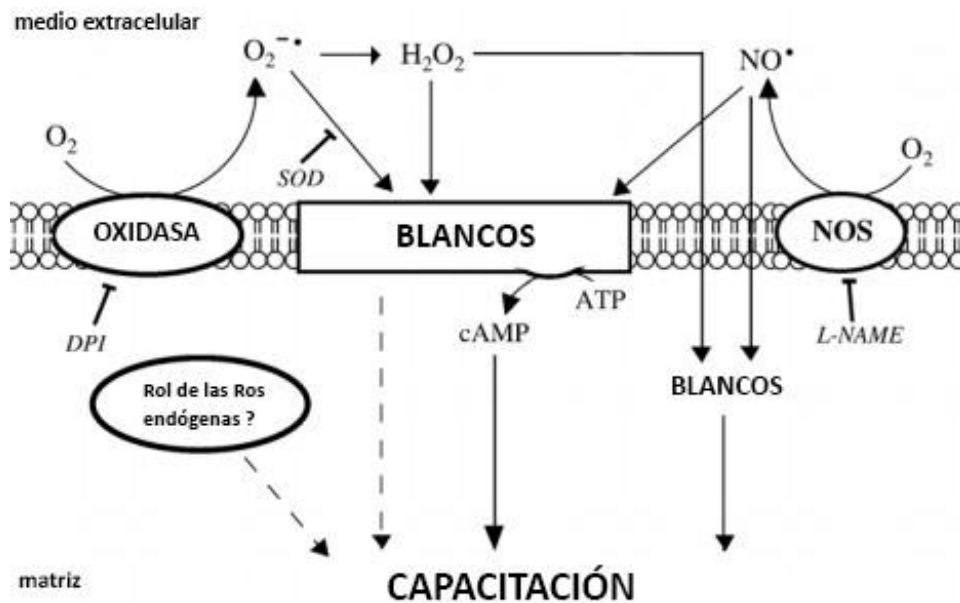


Figura 11. Rol fisiológico de las ROS en el espermatozoide. Modificado de O'Flaherty y col. (75).

Se ha demostrado que el $\text{NO}^\bullet$ está vinculado con el procesos de capacitación (76). La inhibición de la NOS mediante el uso de L-AME (ω -Nitro-L-arginine methyl ester) bloquea la capacitación de los espermatozoides (77). Otros reportes han mostrado que la exposición de los espermatozoides frente al $\text{NO}^\bullet$ en bajas concentraciones induce un mayor porcentaje de células capacitadas (78). Ensayos bioquímico e inmunohistoquímicos han revelado y localizado varias isoformas de la NOS en células espermáticas humanas (79). En conjuntos las evidencias indican que el $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\text{NO}^\bullet$ a bajas concentraciones y de forma controlada activan blancos en la membrana espermática que desencadenan mecanismos intracelulares involucrados en el proceso de capacitación. Hasta el momento no se ha demostrado aún el posible rol de la mitocondria en los mecanismos de capacitación y como fuente principal de ROS intracelular.

2.8 Origen del estrés nitro-oxidativo en el espermatozoide humano e infertilidad

Si bien se ha propuesto, al igual que en las células somáticas, a la mitocondria del espermatozoide como fuente principal de ROS, la pregunta de cómo y para qué se producen en el espermatozoide es aún controversial (80). Como se describió anteriormente, a bajas concentraciones estas especies reactivas pueden participar

como mediadores en procesos fisiológicos (81). Las células somáticas contienen un sistema de defensa antioxidante que logra controlar la formación excesiva de ROS y así evitar desencadenar un estado de estrés oxidativo. Dado su reducido espacio citoplasmático, los espermatozoides carecen de estas defensas antioxidantes (82). Por lo tanto las células espermáticas son vulnerables frente a un desbalance en la producción de oxidantes, comprometiendo su funcionalidad. Se ha detectado que el 25-40% de las muestras de semen de pacientes que sufren infertilidad de causa desconocida presentan altos niveles en la producción de ROS (83,84). Altas concentraciones de ROS se asocian a la pérdida de motilidad y disminución de la capacidad de fusión ovocito-espermatozoide (85,86).

El origen de las ROS en el eyaculado humano podría provenir de varios tipos celulares incluyendo leucocitos seminales, células germinales inmaduras o espermatozoides anormales. Especialmente estas últimas han demostrado ser importantes fuentes de generación de ROS (87,88) y es discutido los tipos de anomalías que las producen. Se hipotetiza que los espermatozoides inmaduros con exceso de citoplasma podrían ser una fuente importante de los mismos (89).

Dada la presencia de otros tipos celulares, como leucocitos, en la muestra espermática humana, el estudio de la formación de ROS exclusivamente por el espermatozoide, ha resultado ser un gran desafío. En condiciones normales la población de células leucocitarias se encuentra en una proporción menor a 1.000.000 cel/mL. Se considera patológico, cuando la población leucocitaria es mayor a 1.000.000 cel/mL. Frente a esta situación patológica (leucocitospermia) los niveles de ROS formados por los leucocitos constituyen una fuente significativa de daño celular. El estrés nitro-oxidativo generado intra o extracelularmente podría dañar y alterar la función de las propias enzimas mitocondriales espermáticas. Esto induce disfunción mitocondrial provocando un aumento aún mayor en la formación de ROS (58). Esta disfunción mitocondrial podría ser una de las causas de la infertilidad masculina, como se ha planteado para otras enfermedades tales como neurodegenerativas y cardiovasculares (90).

3 Hipótesis

La disfunción mitocondrial disminuye la capacidad fecundante de los espermatozoides medida a través de los parámetros seminales. Esta alteración mitocondrial desencadena un aumento del estrés nitro-oxidativo llevando a un daño mayor del metabolismo mitocondrial que altera la función espermática.

4 Objetivo general y específico

4.1 Objetivo general: Determinar si la disfunción mitocondrial se asocia con espermatozoides defectuosos en el eyaculado y con aumento de la formación de especies oxidantes espermáticas

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Objetivo específico #1: Evaluar la función mitocondrial (índice de acople) en un amplio rango de muestras espermáticas humanas y su correlación con la motilidad.

4.2.2 Objetivo específico #2: Determinar la formación de especies oxidantes por la mitocondrias del espermatozoide humano.

4.2.3 Objetivo específico #3: Detectar si las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno producen modificaciones en proteínas y lípidos del espermatozoide.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

5.1. Población de estudio

Se analizaron muestras de semen provenientes de 150 individuos entre donantes sanos y pacientes, cada uno contaba con el espermiograma completo realizado por la Clínica Andrológica FERTILAB o en nuestro Laboratorio en el Departamento de Histología y Embriología de Facultad de Medicina. Cada espermiograma cuenta con la edad del individuo. Se excluyeron del análisis 20 muestras que presentaban leucocitospermia.

5.2 Recolección y análisis de las muestras

Las muestras se recolectaron en la Clínica FERTILAB y en nuestro Laboratorio. Las mismas provienen de donantes sanos o pacientes que consultaron por infertilidad propia o de su pareja. Dichas muestras se obtuvieron por masturbación luego de un período de abstinencia sexual de por lo menos 72 horas. Luego de alcanzada la licuefacción de la muestra a temperatura ambiente, se analizaron los parámetros macroscópicos del semen, el volumen, olor, color, viscosidad y pH. Para el análisis microscópico se realizó el recuento espermático y el estudio de la motilidad mediante un sistema de análisis computarizado (CASA, Microoptics, Barcelona, España). Para ello, una alícuota de la muestra (5 μ L) se cargó en una cámara de conteo (CELL-VU-Millennium Sciences, Nueva York, Nueva York), se monitoreó diferentes campos hasta completar el análisis de 1.000 células espermáticas. En cada campo el sistema CASA captura 25 imágenes por segundo, lo que permite reconstruir la trayectoria seguida por cada espermatozoide y así clasificar el tipo de motilidad del espermatozoide (a,b,c, d). Los parámetros de motilidad se clasificaron siguiendo los criterios propuestos por la OMS [5]. Se analizaron valores cinéticos del movimiento espermático los cuales se expresaron como el valor promedio del total de la población estudiada. Se evaluó la velocidad curvilínea (VCL, μ m/s) que es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo y la velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), que es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria. A su vez se calculó la distancia recorrida por el

espermatozoide a lo largo de la trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$). Se analizó también la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, $\mu\text{m/s}$).

5.3 Evaluación de la función mitocondrial espermática mediante ensayos de consumo de oxígeno.

La velocidad de la fosforilación oxidativa está regulada por la demanda energética de la célula. Este mecanismo regulatorio denominado "control respiratorio" permite que un aumento en la velocidad de fosforilación oxidativa determine un incremento en el transporte de electrones de la cadena respiratoria y como consecuencia a un aumento en el consumo de O_2 . Por lo tanto evaluar el estado de la actividad mitocondrial monitoreando el consumo de O_2 en diferentes estados funcionales en células intactas, nos aporta datos del estado bioenergético de la célula.

Las muestras de semen se centrifugaron a $400 \times g$ durante 10 minutos a RT. Luego de un lavado en buffer fosfato salino (PBS) se resuspendieron en el medio Biggers Whitten Whittingham (BWW) + albúmina de suero bovino (BSA) (95 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.7 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 5.6 mM glucosa, 0.25 mM piruvato, 20 mM Hepes, 25 mM NaHCO_3 , 20 mM ácido láctico, 32 mM HCO_3^- y 5 mg/ml BSA). Para medir la respiración mitocondrial la concentración de células espermáticas se ajustó a 20×10^6 células/mL. La respiración mitocondrial se midió en un oxímetro de alta sensibilidad Oxygraph-2 K (Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria) a pH 7.4 y a 37°C de temperatura, equipado con un software que expresa la velocidad de consumo de O_2 como $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (DatLab versión 4.2; Oroboros Instruments GmbH). Se registró el consumo basal de O_2 por los espermatozoides, luego se inyectó en la cámara oligomicina (oligo 2 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) inhibidor de la ATPsintasa mitocondrial. Continuamos con la titulación en pasos sucesivos de 1 μM de carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP, Sigma-Aldrich), desacoplante de la cadena respiratoria, hasta obtener el consumo máximo de O_2 . Para finalizar el estudio, se trató con antimicina A (AA, 2.5 μM , Sigma-Aldrich), inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria (Figura 12).

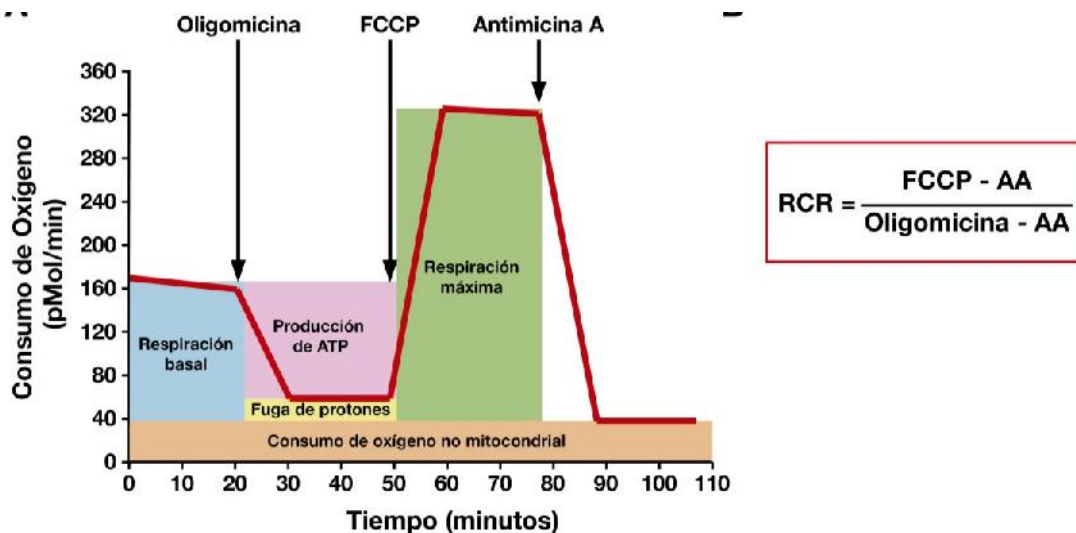


Figura 12: Esquema de los ensayos de respirometría de alta resolución. Se mide el consumo basal de O_2 seguido de la inhibición con oligomicina. Al inhibir la ATPsintasa, el flujo de electrones se reduce progresivamente regulado por el gradiente electroquímico de protones que se acumula en el espacio intermembrana. Esto permite estimar cuánto de la respiración basal está destinado a la síntesis de ATP y cuánto corresponde a fuga de protones. Se prosigue con la titulación de FCCP, este ácido débil se disocia en la matriz mitocondrial liberando protones, de esta manera se disipa el gradiente electroquímico restableciendo el flujo de electrones por la cadena respiratoria aún cuando la ATPsintasa permanece inhibida y por tanto aumenta el consumo de O_2 . Se genera un desacople entre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones. Finalmente se inyecta AA para estudiar el consumo de O_2 exclusivamente mitocondrial.

A partir de este ensayo se calcularon 2 índices indicativos del estado funcional mitocondrial:

- 1) Índice del control respiratorio (RCR): se calculó como la relación entre el consumo de oxígeno en presencia de FCCP sobre el flujo en presencia de oligomicina.
- 2) Respiración basal: corresponde a la respiración celular en ausencia de inhibidores o desacoplante.

5.4 Formación de oxidantes por el espermatozoide: Determinación de la formación de peroxinitrito

Preparación de mitocondrias aisladas

Como primera aproximación evaluamos la formación de oxidantes mitocondriales en una fracción enriquecida de mitocondrias espermáticas. Para obtener dicha fracción se

realizó un fraccionamiento subcelular. Las muestras de semen en BWW se sonicaron (S1) y luego se centrifugaron a $1.000 \times g$ por 10 min. El sobrenadante (S2), se centrifugó a $10.000 \times g$ por 10 min a RT. El pellet (P1) de esta última centrifugación corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias, el cual se resuspendió en BWW (91).

Medida de la actividad succinato deshidrogenasa

Para demostrar el enriquecimiento de la fracción medimos la actividad del complejo II de la cadena respiratoria, succinato deshidrogenasa (SDH). Primero, se midió la concentración de proteínas de la fracción obtenida mediante el método de Bradford. Se tomó 10-20 μg de proteína de la fracción y se incubaron junto con 2,6 Diclorofenol-Indofenol (DCPIP, $20 \mu M$), succinato (15 mM) y cianuro de potasio ($2 \mu M$). El cianuro inhibe el complejo IV de la cadena respiratoria, entonces los electrones cedidos por el succinato son captados por el DCPIP, la reducción de este compuesto produce un cambio de color azul a incoloro de la solución. Para evaluar la actividad de la SDH seguimos la reducción del DCPIP espectrofotométricamente a 600 nm ($\epsilon = 20.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)(91).

Formación de peroxinitrito en la fracción enriquecida de mitocondrias espermáticas

Para evidenciar la formación de ONOO^- en el espermatozoide humano utilizamos la sonda dihidroxirodamina-123 (DHR-123) (92,93). Dicha sonda reacciona con los radicales derivados de la descomposición del ONOO^- formando rodamina (RH), un compuesto fluorescente, característica que permite seguir su formación. Se tomó 0.7 mg/mL de proteína de la fracción enriquecida en mitocondrias y se incubó con DHR-123 ($50 \mu M$), se agregó AA ($2.5 \mu M$) junto con un dador de $\bullet\text{NO}$ (NOC-7 Alexis-Biochemicals, Farmingdale, NY; 10 y $30 \mu M$) y succinato como sustrato mitocondrial. El dador de $\bullet\text{NO}$ se preparó en una solución de hidróxido de sodio 1mM ya que a pH alcalino el compuesto es estable (94). Para evaluar la concentración de $\bullet\text{NO}$ liberada por este dador seguimos la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina en PBS, a 37°C , pH 7.4. La oxidación se evaluó por espectrofotometría a $\lambda = 577 \text{ nm}$ y 630 nm durante 10 minutos. Se determinó que a 10 y $30 \mu M$ de NOC-7 libera un flujo

constante y lineal de $\bullet\text{NO}$ de 0.7, y 2.1 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivamente. Realizamos controles en los cuales expusimos la fracción mitocondrial a: *i)* solo a succinato, *ii)* succinato y AA y *iii)* succinato y NOC-7. Adicionamos en una de las condiciones experimentales metionina, un scavenger (velocidad de reacción de $200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) del ONOO^- (94). La fluorescencia de la RH se midió durante 20 minutos a 37 °C con un lector de fluorescencia en placa (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) con una longitud de onda de λ e citación= 485 nm y λ emisión= 520 nm.

Formación de peroxinitrito en células espermáticas intactas.

Al igual que en los procedimientos anteriores, las muestras se lavaron y una vez en BWW las células se incubaron con DHR-123 durante 30 minutos a 37 °C. Se tomaron 4×10^6 células por condición experimental que incluyen las tratadas con AA (2.5 μM) y NOC-7 (30 μM). Los controles realizados incluyen la incubación de las células únicamente con AA o NOC-7. Inmediatamente después de iniciado el tratamiento, se midió la formación de RH por fluorescencia en placa, como se describió previamente para la fracción enriquecida. Para el estudio por microscopía confocal las células se incubaron previamente con DHR-123 y luego de 10 minutos de la exposición a AA y NOC-7 se realizó un lavado en PBS de 5 min y se montaron sobre portaobjetos pre-tratados con poli-L-lisina. Los espermatozoides se observaron bajo microscopio confocal utilizando el láser de argón a λ 488 nm (LeicaTCS SP5 II; Leica Microsystems). Para el estudio por citometría de flujo, las células se procesaron de igual manera a como se describió para la microscopía confocal. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). En cada condición experimental se registraron 30.000 eventos, los cuales se observan en gráficos de puntos (dot-plot) provenientes de señales de dispersión de la luz, el forward y side Scatter, que nos indican tamaño y complejidad celular respectivamente. En los dot-plot seleccionamos la región correspondiente a las células espermáticas, excluyendo del análisis otros tipos celulares y debris. En esta región seleccionada se detectaron las células marcadas con RH utilizando un láser de e citación de longitud de onda λ = 488 nm y un detector de filtro de banda de 530nm/30nm (FL-2). Los datos obtenidos se analizaron con el software Cell Quest.

Purificación de espermatozoides por gradiente de densidad.

Se analizó también la formación de ONOO^- en células espermáticas purificadas mediante gradiente de centrifugación. Para la purificación se utilizaron soluciones de doble densidad 40-90% (SpermGrad; Vitrolife, Göteborg, Sweden). En un tubo cónico de centrifuga de 15 mL se preparó el gradiente sobre el cual se depositó la muestra de semen (1mL). Los tubos se centrifugaron a 400 x g a RT durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1mL de medio BWW y se volvió a centrifugar esta vez durante 10 minutos a 400 x g a RT, el sobrenadante se descartó y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de BWW concluyendo así la etapa de purificación. En estas muestras purificadas se analizó la formación de oxidantes siguiendo la oxidación de DHR-123 mediante fluorescencia en placa.

5.5 Estudio de las modificaciones postraduccionales producidas por estrés nitro-oxidativo.

Una forma de determinar la existencia de estrés oxidativo es evaluar los productos derivados de la reacción de las ROS con biomoléculas. Se demostró mediante ensayos de inmunodetección modificaciones proteicas y lipídicas inducidas por agentes oxidantes. Valoramos los niveles de nitración en muestras de baja calidad espermática (motilidad progresiva < 32%) y de alta calidad espermática (motilidad > 32%) de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS (2). El estrés oxidativo puede inducir la peroxidación lipídica, en la cual se generan aldehídos altamente reactivos como el 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), uno de los compuestos más tóxicos generados en este proceso. Este tipo de derivado lipídico puede reaccionar con residuos proteicos, principalmente cisteína, histidina o lisina. Esta reacción denominada adición de Michael, da lugar a la formación de aductos proteicos que se pueden evidenciar por inmunodetección (95). Las muestras de espermatozoides con diferente calidad espermática se centrifugaron a 400 x g a RT. Luego de sucesivos lavados en PBS se resuspendieron en BWW, sonicaron y centrifugaron a 5.000 x g a RT. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Las proteínas (30-40 µg) se separaron de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) a 30 mA a 4 °C. Previo a

realizar la corrida electroforética, las proteínas se incubaron con el buffer de carga (0.5 M buffer Tris-HCl pH 6.8, 25% Glicerol; 2.5% de sodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, 0.1 mg/mL de azul de bromofenol, 25% 2-mercaptoethanol) durante 5 min a 95 °C. Esto garantiza la desnaturalización de las proteínas para su correcta migración por peso molecular. Mediante electro-transferencia, se realizó el traspaso de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa a 30 mA a 4 °C durante toda la noche. Las membranas con el material transferido se bloquearon para impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos empleados. Este proceso se realizó incubando las membranas con una solución de bloqueo (5% leche, Tween-20 0.6% en PBS) durante 1 h a RT. Las membranas se incubaron por separado con el anticuerpo anti-3-nitro-tirosina (1/1.000) y anti-4-HNE (1/1.000), ambos anticuerpos policlonales de conejo en la misma solución de bloqueo durante 1 h a RT. Se lavaron tres veces durante 10 min en PBS con 0.6% de Tween-20. Se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo IR Dye 800CW (1/20.000, Li-COR, Lincoln, NE), durante 1 h en PBS con 0.3 % de Tween-20 a RT. Estos anticuerpos secundarios permiten revelar las membranas mediante fluorescencia infrarroja utilizando el equipo Odyssey® CLx Infrared Imaging System (Li- COR). Para finalizar, se realizaron 3 lavados de 10 min en PBS con 0.3 % de Tween-20, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Junto con las muestras en estudio se corrieron muestras control tratadas con un bolo de ONOO^- de 1 mM. Esta muestra control se utilizó para relativizar los datos de cuantificación de señal obtenidos de las muestras de estudio. Se midió la densidad del área marcada con la señal utilizando el software libre ImageJ. El ONOO^- se sintetiza en el laboratorio utilizando un reactor de flujo detenido, a partir de nitrito de sodio y H_2O_2 en condiciones ácidas (96). El producto de reacción obtenido se mezcló con dióxido de manganeso para eliminar el exceso de H_2O_2 y se almacenó a -80 °C. Rutinariamente, previo a su utilización, se midió la concentración ONOO^- espectrofotométricamente (Espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Tablet, Varian, Inc.) midiendo la absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en solución de hidróxido de sodio (NaOH, 10 mM).

5.6. Inmunolocalización de la nitración por peroxinitrito

Se realizaron extendidos de espermatozoides en BWW sobre láminas previamente tratadas con poli-L-lisina para asegurar la adhesión celular. Se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS (PFA) a pH 7.4 durante 30 min. Luego de lavarlos en PBS para eliminar el fijador, los preparados se sometieron a una recuperación antigénica. Para ello, las láminas se colocaron en buffer citrato de sodio (10 mM, pH 6) pre-calentado a 80 °C, utilizando un horno microondas se mantuvieron a dicha temperatura durante 40 min. Finalizado el proceso de recuperación se dejó enfriar el buffer citrato y las láminas se lavaron dos veces por 10 min en PBS. Se inhibieron las peroxidasas endógenas con una solución de H₂O₂ (volumen 30) al 3 % en PBS 20 min. Las células se permeabilizaron con PBS-TritonX-100 0.6% 30 min y para bloquear las interacciones inespecíficas se incubaron con solución de bloqueo (PBS-TritonX-100 0.2%, BSA 2%, suero de cabra 10%) por 1h. El anticuerpo primario utilizado anteriormente, anti-3-Tyr-NO₂, se usó a una concentración de 1/50 diluido en la solución de bloqueo por 48 horas a 4 °C en cámara húmeda. Tras tres lavados de 15 min en PBS los preparados se revelaron con el kit de amplificación de señal de tiramida (TSA®, Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA). El kit cuenta con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), el cual se incubó a una concentración de 1/100 durante 1h. Luego de los lavados, los preparados se incubaron con la tiramida marcada con el fluorocromo alexa 488 (1/100) en buffer de amplificación del Kit y

0.00015% de H₂O₂. La HRP en presencia de H₂O₂ activó la tiramida marcada, siendo ahora capaz de unirse con residuos de tirosinas adyacentes. Finalizada la inmunodetección los preparados se montaron con un medio comercial que contiene 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) para preservar mejor los preparados y marcar los núcleos. La especificidad del anticuerpo secundario se controló en láminas en las que se omitió el anticuerpo primario y como control positivo se utilizó espermatozoides nitrados con un bolo de ONOO⁻ 1mM. Los preparados se examinaron bajo un microscopio confocal LeicaTCS SP8 (Leica Microsystems) usando el láser de Argon (λ 488 nm) y un diodo azul (λ 405 nm).

5.7 Medida de la formación de oxidantes por células leucocitarias presentes en la muestra de semen.

En las muestras de semen, además de las células espermáticas maduras también se pueden detectar células inmaduras y otros tipos celulares como leucocitos. Dependiendo de la cantidad presente en la muestra espermática estas últimas pueden ser una fuente potencial de ROS. La formación de ROS por parte de los leucocitos, conocido como estallido respiratorio, es uno de los mecanismos de defensa que desarrollan frente a un patógeno (97). Para asegurarnos que los leucocitos presentes en la muestra de semen no están contribuyendo a la formación de ROS activamos (NADPHoxidasa o NOX) el mecanismo de defensa utilizando el péptido sintético formilmetionil-fenilalanina (fMLP, Sigma-Adrich), el cual es homólogo a los péptidos originados en la lisis de bacterias (98,99). Evaluamos la formación de ROS utilizando el sistema de detección por amplex-red. Este compuesto es oxidado por la HRP y oxidantes como H_2O_2 generando como producto de la reacción un compuesto fluorescente, la resorufina (Figura 13).

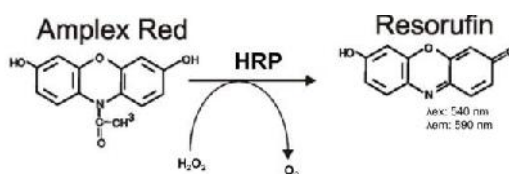


Figura 13. Oxidación del compuesto Amplex Red. La HRP utiliza al Ampelx Red como dador de electrones durante la reducción del H_2O_2 a agua. El producto de esta reacción, la resorufina, es un compuesto fluorescente.

Las muestras de semen se centrifugaron a 400 x g a RT durante 10 min para separar plasma seminal de células espermáticas. Se continuó con tres lavados sucesivos de 10 min en PBS. Finalmente, 4×10^6 de células por condición experimental se resuspendieron en medio HAM F10 (126 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 1.08 mM NaH_2PO_4 , 0.6 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6 mM KH_2PO_4 , 0.3 mM $CaCl_2$, 6 mM glucosa, 20 mM Hepes, y 6mM

HCO₃⁻). Evaluamos la formación de especies reactivas, en condiciones basales, es decir en ausencia de activador, con el péptido activador fMLP (50 µM) y en presencia del inhibidor difenileneiodonio (DPI, inhibidor de NOX, 50 µM Sigma-Aldrich). Todas las condiciones experimentales se incubaron con Amplex-Red (50 µM, Thermo Scientific) y HRP (2µg/mL, Sigma-Aldrich). Seguimos la oxidación del Amplex-Red mediante un lector de fluorescencia en placa (Varioskan) a 37 °C a una longitud de onda (λ) de excitación = 540 nm y λ de emisión= 590 nm, durante 1 hora.

Purificamos células leucocitarias del semen para valorar el número de estas células que producen niveles significativos de ROS. Se prepararon dos soluciones de densidades diferentes, una de 1.077g/mL y otra de 1.095 g/mL a partir de la solución comercial OptiPrep (Sigma-Aldrich). El gradiente se generó en un tubo de centrifuga cónico de 15 mL, colocando 4 mL de la solución de mayor densidad seguido del agregado de 4mL de la solución de menor densidad, teniendo la precaución de que no se mezclen. Sobre este gradiente armado se agregó la muestra de semen y se centrifugó a 400 x g a RT por 20 minutos. Colocamos el tubo cónico en posición vertical para extraer la interfase entre ambos gradientes, donde se localizan principalmente las células leucocitarias. Una vez realizada la extracción, las células se resuspendieron en medio HAM-F10. Se realizó el recuento de células leucocitarias extraídas en cámaras de conteo. Se evaluó la formación de ROS por Amplex Red .

5.8 Desarrollo de un modelo de daño mitocondrial mediante el uso de un agente oxidante

Para desarrollar el modelo de daño usamos 3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1) como fuente de ONOO⁻ (100). Este compuesto a pH fisiológico se descompone espontáneamente y libera O₂^{•-} y [•]NO, los que reaccionan y formar ONOO⁻. La formación de ONOO se siguió midiendo la oxidación de la sonda DHR-123 como fue descrita en el apartado 5.4. Las células espermáticas se incubaron con SIN-1 y se evaluó la integridad mitocondrial, la vitalidad y motilidad espermática en forma simultánea a diferentes tiempos de incubación. La integridad mitocondrial se evaluó con la sonda rodamina, esta sonda es diferente a la DHR-123 utilizada anteriormente,

ya que esta sonda no necesita oxidarse para emitir fluorescencia. Se trata de una sonda de naturaleza catiónica y lipofílica que se emplea comúnmente como indicador de la funcionalidad mitocondrial, ya que sólo se acumula en mitocondrias metabólicamente activas cuya potencial de membrana es negativo (101). Por lo tanto, si se produce un daño en la mitocondria, la RH no permanecerá en la mitocondria y difunde, en consecuencia la fluorescencia detectada será de menor intensidad. Además del daño mitocondrial evaluamos si este modelo genera un impacto en la motilidad espermática, para ello analizamos cambios en dicho parámetro mediante el sistema CASA. Se controló la vitalidad espermática para asegurarnos que el SIN-1 no provoca un efecto tóxico sobre las células que pueda afectar la motilidad espermática. La vitalidad se evaluó con ioduro de propidio (IP), este compuesto solamente difunde hacia el interior de la células cuando se desencadena un proceso de muerte celular evidenciando así un deterioro en la membrana.

Detección de la producción de ONOO^- en el modelo de daño

En un placa apta para el lector de fluorescencia se colocó 1000 μL de medio BWW y se le agregó a 50 μM o 200 μM final del compuesto SIN-1 conjuntamente con la DHR-123 a una concentración de 50 μM final. Se incluyó también un control en ausencia de SIN-1. Seguimos la oxidación de la DHR-123 por los derivados del ONOO^- mediante el lector de placas a 37 °C durante 1 hora 40 min, aproximadamente con una $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$

Evaluación del daño mitocondrial y vitalidad espermática mediante citometría de flujo

Al igual que en los procedimientos anteriores las células espermáticas se lavaron en PBS y se resuspendieron en medio BWW. Posteriormente se incubó las células con 50 μM y 200 μM de SIN-1. La integridad mitocondrial, la vitalidad y la motilidad espermática se monitorearon a diferentes tiempo, $t=0\text{h}$, $t=1\text{h}$, $t=2\text{h}$ y $t=3\text{h}$ postratamiento con SIN-1. La motilidad espermática se evaluó mediante el sistema CASA. La integridad mitocondrial se evaluó incubando las muestras con 50 μM de RH 30 min a 37 °C, como control de daño mitocondrial se utilizó FCCP. La vitalidad se

evaluó incubando con IP (1 μ M final) durante 5 min a 37 °C, como control positivo para la incorporación de IP una alícuota de la muestra se fijó en metanol durante 10 min. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo (FACS Calibur), evaluando 30.000 células por condición experimental. La integridad mitocondrial y la vitalidad se analizaron utilizando un láser de excitación de $\lambda = 488$ nm y un detector de filtro de banda de 530nm/30nm (FL-2), razón por la cual dichos parámetros se midieron en alícuotas diferentes. Los datos obtenidos se analizaron con el software Cell Quest.

5.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en base al paquete estadístico GraphPad Software, Inc., (San Diego, CA). Los valores se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media. La media de cada variable de análisis del semen se comparó con la test t de Student. La fluorescencia RH en diferentes condiciones se analizó con un test de varianza (ANOVA de una vía) seguido por prueba de Tukey. Se aplicó la prueba de correlación de rangos de Spearman para correlacionar el RCR y las variables espermáticas. Para evaluar el efecto de la concentración de ONOO⁻ sobre la vitalidad y motilidad espermática se realizó un test de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba de Dunnett's. Para el efecto del tiempo y la concentración en la motilidad espermática se usó un test de ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni's. Las diferencias se consideraron significativas para un $P < 0,05$.

5.10 Consideraciones éticas

Los ensayos se ajustaron a las normativas del protocolo de Investigación aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Exp. N° 071140-001181-12). Para la elaboración del mismo nos basamos en pautas éticas propuestas en el manual de "Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos" por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud en Ginebra, 2002 {de Ciencias, 2002 #91}. Siguiendo las pautas establecidas en el mencionado manual, previo a la recolección del material biológico se informó a cada donante sobre el estudio a realizar

y se les solicitó un consentimiento informado. Destacamos que se conservó el anonimato del donante mediante el uso de números para cada muestra.

6.

RESULTADOS

6.1 Características de las muestras analizadas

En la tabla 2 se detallan la media, la mediana y el rango de la edad de los donantes de semen. Se describen también los parámetros seminales de la población estudiada: concentración, motilidad, vitalidad, morfología y los valores de referencia (OMS). Los valores de los parámetros seminales observados en las muestras abarcaron tanto valores mayores como menores a los puntos de corte indicados por OMS. Estos representan indicadores de buen y mal pronóstico de fertilidad respectivamente. El rango de motilidad progresiva fue desde 0% hasta 95%.

Tabla 2. Edad de los donantes y características de las muestras analizadas junto a valores de referencia (OMS 2010) n = 130

Parámetros	Media $\pm$ EEM	Mediana	Rango	Valores de referencia
Edad (años)	33.8 $\pm$ 0.8	33	1	---
Concentración Espermática (millones/mL)	63.6 $\pm$ 4.7	55	0.05-231.9	≥ 15
Viabilidad (%)	92.1 $\pm$ 0.7	93	66-99	≥ 58
Morfología (% de formas normales)	10.6 $\pm$ 0.8	11	0-19	≥ 4
Motilidad progresiva rápida (a)(%)	22.7 $\pm$ 1.4	22	0-63	---
Motilidad progresiva (a+b) (%)	59.1 $\pm$ 1.8	62	0-95	≥ 32
Motilidad total (%) (a+b+c)	66.2 $\pm$ 1.6	69	0-99	≥ 40

Nota: EEM (error estándar de la media)

El estudio morfológico de los espermatozoides realizado mediante microscopía óptica, también refleja la gran diversidad de muestras estudiadas. Según los criterios estrictos Kruger-Tygeberg, se considera como normal la cifra de al menos 14 % de espermatozoides morfológicamente normales, según la OMS en el 2010 este límite descendió a 4%. El trabajo incluyó un rango de muestras que fue desde 0 %

de morfología normal hasta muestras con valores mayores a ambos valores de referencia (19 % morfología). Se descartaron las muestras con leucocitospermia ($> 1.000.000$ de leucocitos/mL de semen). El porcentaje de vitalidad espermática de todas las muestras estuvo siempre por encima de los valores de referencia.

6.2 La motilidad espermática se correlaciona con la disfunción mitocondrial

Las muestras espermáticas se sometieron a los ensayos de consumo de oxígeno ya descritos. De forma representativa en la figura 14 se muestran dos del total de los registros obtenidos por oximetría. En estos registros observamos que la muestra con alto porcentaje de motilidad progresiva (70 % a+b, curva roja) presenta una respiración basal mayor respecto a la muestra de menor motilidad progresiva (22% a+b, curva en verde). Luego de la inyección de oligomicina, al inhibir la ATPsintasa, el consumo de O_2 en ambas curvas disminuyó. Esta disminución fue más marcada en la muestra de mayor motilidad. Se prosiguió el registro con la cuidadosa titulación de FCCP, evidenciando que en la muestra de motilidad progresiva alta se alcanzó mayor consumo de O_2 . Por último, al incorporar AA, (inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria), ambas muestras se comportaron de manera semejante disminuyendo el consumo de O_2 hasta un valor cercano a cero.

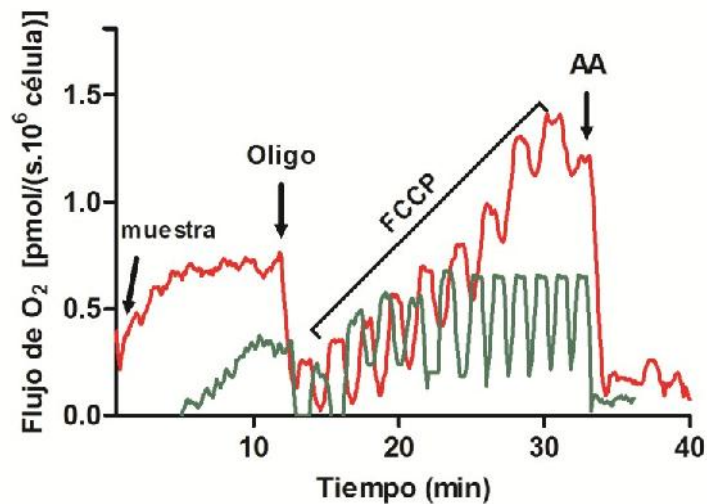


Figura 14. Registro representativo del consumo de oxígeno mitocondrial de espermatozoides intactos. Muestras con motilidad progresiva alta (a+b 70 %, curva roja) presentan mejor acople mitocondrial en comparación con muestra de motilidad progresiva baja (a+b 22%, curva verde). AA: antimicina-A, Oligo:oligomicina, FCCP Carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone.

A partir de este tipo de registros podemos calcular el RCR que indica el estado funcional mitocondrial. En el total de las muestras analizadas se encontró que la media del RCR fue significativamente mayor en las muestras de motilidad progresiva $\geq$ al 32% que en las muestras de motilidad inferior al 32% (Figura 15A). Existe también, una correlación positiva entre la motilidad progresiva y el RCR (Figura 15B).

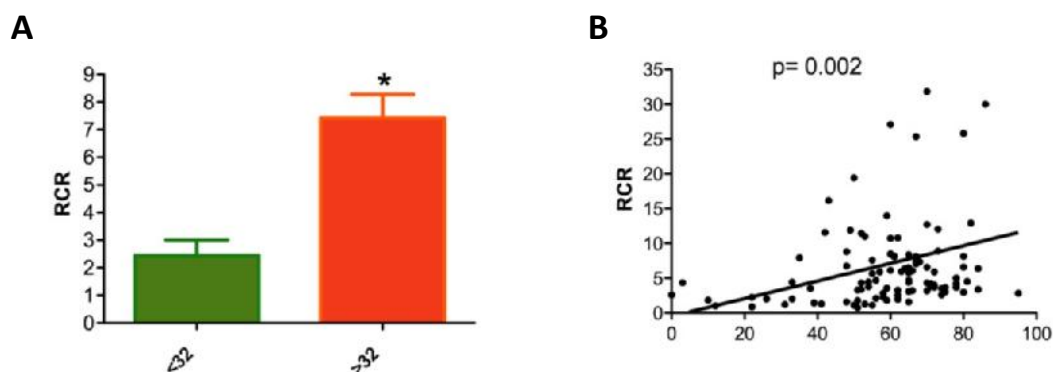


Figura 15. Estudio de la función mitocondrial en función de la motilidad progresiva. A) Medias del RCR para muestras con motilidad progresiva $<32\%$ (barra verde) y $\geq$ al 32% (barra roja). Los datos de se expresan como la media + error estándar de la media * $p<0.05$. **B)** Correlación entre motilidad progresiva y el RCR $r_s=0.3$, $p=0.002$. (n= 130 donantes).

Se analizó la respiración basal, la cual tuvo menores valores absolutos en las muestras espermáticas con bajo porcentaje de células motiles (Figura 16). Sin embargo, esto no se tradujo en diferencias significativas.

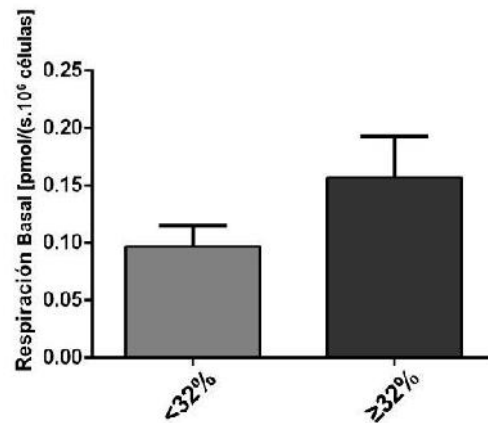


Figura 16. Análisis de la respiración basal A) Medias de la respiración basal. En todos los casos los datos se expresan como la media + error estándar de la media con un valor $p > 0.05$. ($n = 130$ donantes).

Los parámetros cinéticos de motilidad también mostraron una correlación positiva con el RCR (Figura 17).

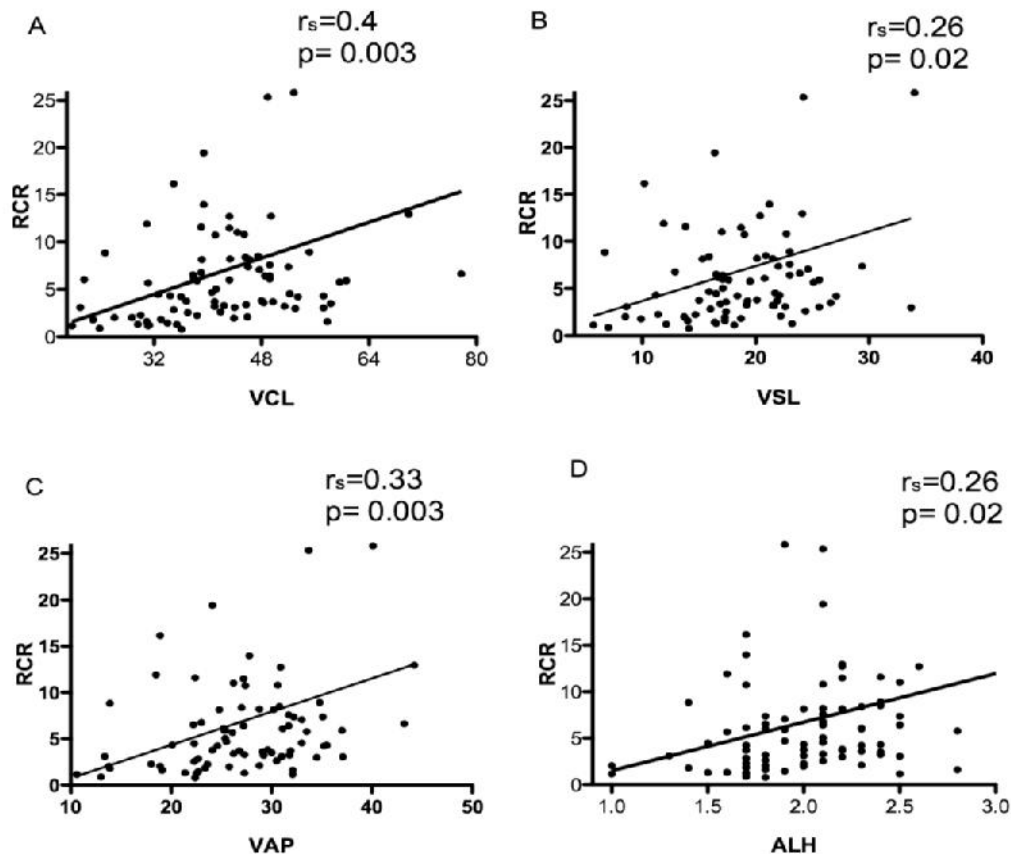


Figura 17. Correlación entre la cinética espermática y RCR. A) Velocidad curvilínea (VCL) $p=0.003, r_s=0.4$, B) velocidad lineal (VSL) $p=0.02, r_s=0.26$, C) velocidad promedio (VAP) $p=0.003, r_s=0.33$ y D) amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) $p=0.02, r_s=0.26$.

Otros parámetros seminales como morfología y vitalidad también se correlacionaron positivamente con el RCR (datos no mostrados).

6.3 Las mitocondrias espermáticas aisladas son capaces de producir peroxinitrito

Para mostrar el enriquecimiento de la fracción purificada de mitocondrias de espermatozoides se midió la actividad SDH en las tres 3 fracciones obtenidas durante la purificación de las mismas. En los primeros dos pasos de purificación, que resultaron en los sobrenadantes 1 (S1) y 2 (S2), la actividad específica de la SDH fue de 5.1 ± 0.40 y $3.8 \pm 1 \mu\text{moles}/(\text{min mg})$. En el paso final de la purificación en el cual se obtuvo la fracción enriquecida en mitocondrias, la actividad de la SDH alcanzó valores de 13.8 ± 0.47 . La actividad entre las diferentes fracciones fue diferente (Figura 18).

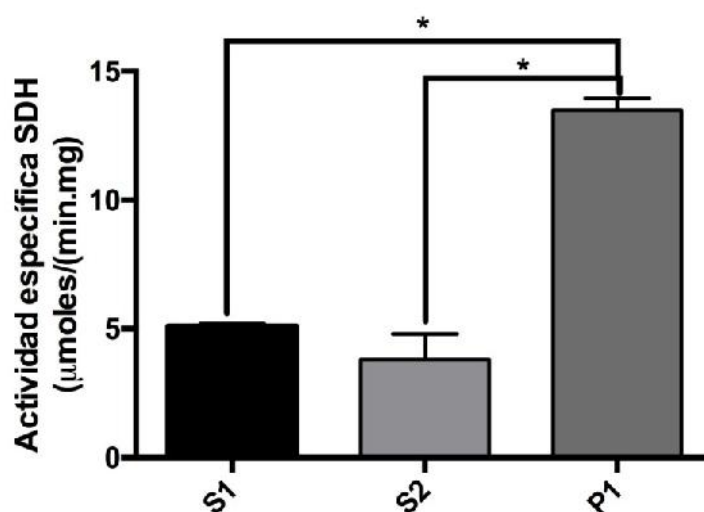


Figura 18. Actividad específica de la SDH en las diferentes fracciones de purificación de mitocondrias. Se midió la actividad en presencia de succinato (15 mM), cianuro de potasio (2 μ M) y DCPIP (20 μ M). Los valores se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (*= $p < 0.05$)

En mitocondrias aisladas se evaluó la formación de ONOO^- a través de la oxidación de DHR-123. Para ello, se expuso a las mitocondrias aisladas al inhibidor de la cadena respiratoria AA y a un flujo de $\cdot\text{NO}$ (NOC-7, dador de $\cdot\text{NO}$) en presencia de sustrato mitocondrial (succinato). Se utilizaron dos concentraciones diferentes de NOC-7 (10 y 30 μ M) para establecer la equimolaridad de los flujos de $\text{O}_2\cdot^-$ y $\cdot\text{NO}$. En presencia de AA y succinato se observó una mayor formación de RH en la condición con 30 μ M de NOC-7 (Figura 19). En esta condición la formación de RH fue mayor respecto a las condiciones de control, realizadas únicamente con AA o AA y succinato (Figura 19). Para confirmar que la oxidación de DHR-123 es medida por ONOO^- se realizó un control pre-incubando las mitocondrias con metionina, scavenger del ONOO^- . La metionina reacciona con el ONOO^- reduciendo los concentración de este oxidante (Figura19).

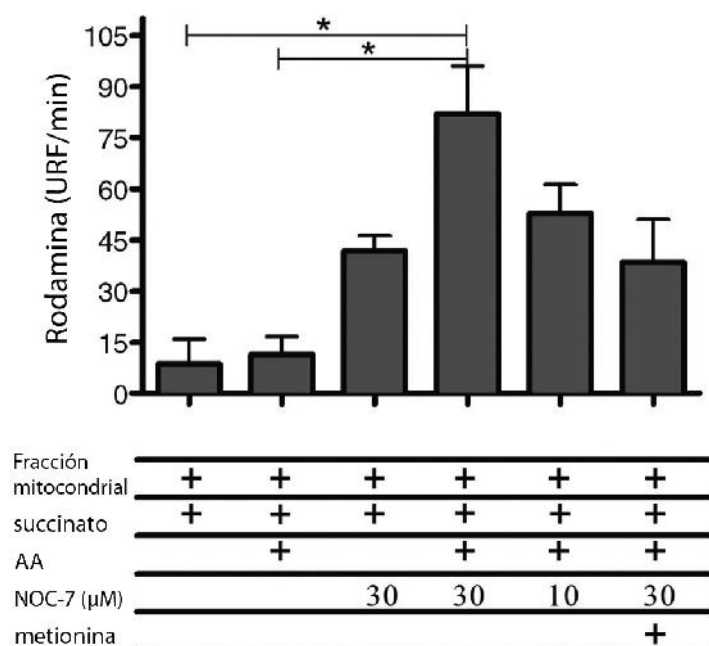


Figura 19. Evidencia de la formación de peroxinitrito en mitocondrias espermáticas aisladas expuestas a un flujo de $\cdot\text{NO}$. La fracción enriquecida de mitocondrias (0.7 mg/mL) se incubó con la sonda DHR-123 (50μM). Valoramos la oxidación de la sonda a RH mediante un lector de fluorescencia en placa. La fluorescencia de RH se midió en presencia de succinato (6 μM), AA (2 μM) y NOC-7 (10 y 30 μM). Los datos de cuatro experimentos independientes y por duplicado se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media,* $p<0.05$.

6.4 La fuente principal de oxidantes *in vivo* son las mitocondrias de las células espermáticas.

Luego se estudió la producción de ONOO^- en células espermáticas intactas utilizando la misma estrategia experimental que en la sección anterior. En este caso al ser células intactas no se requiere del uso de sustratos mitocondriales exógenos. Encontramos que la mayor formación del oxidante se detectó cuando las células se incubaron en presencia de AA y NOC-7 (30 μM) (Figura 20A). Se encontraron diferencias significativas respecto a los controles correspondientes: espermatozoides solos o con células en presencia únicamente de AA o NOC-7 (Figura 20A).

En las muestras espermáticas humanas, otra posible fuente de ROS pueden ser las células leucocitarias. Para confirmar que las células espermáticas son las responsables

de la producción de ROS, se analizó la formación de ONOO^- en células espermáticas purificadas por gradiente de densidad, que separan los espermatozoides de otros tipos celulares. Pudimos demostrar que las muestras de espermatozoides purificados y los no purificados mantienen los mismos niveles de producción de ONOO^- . (Figura 20B).

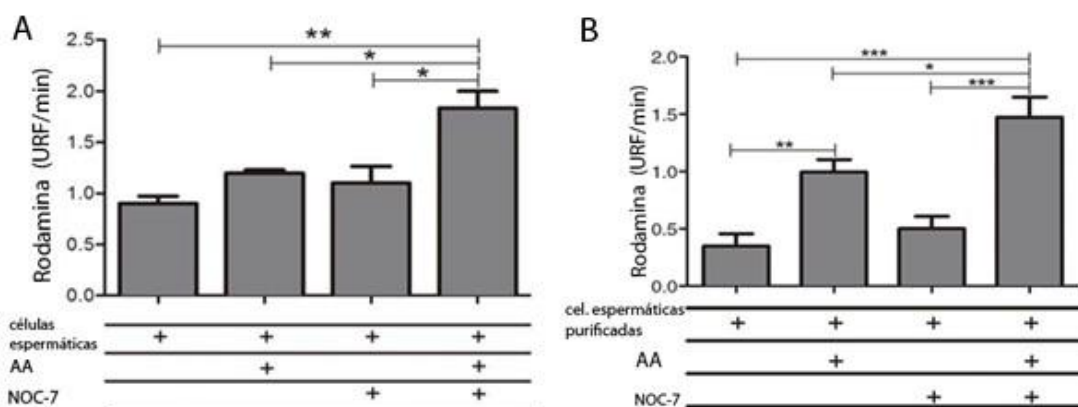


Figura 20. Evidencia de la formación de peroxinitrito en células espermáticas intactas. Oxidación de DHR-123 (50 μM) a RH por los radicales derivados del ONOO^- . Valoramos la formación de RH luego de exponer las células espermáticas a AA (2 μM) y NOC-7 (30 μM). **A)** Seguimos la formación de RH mediante fluorescencia en placa, los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media de las unidades relativas de fluorescencia (URF) medida para 3 experimentos independientes realizados por duplicado, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. **B)** Valoramos la formación de RH en células espermáticas purificadas por gradiente por densidad. Los valores se expresan como las medias $\pm$ error estándar de la media de las URF de 3 experimentos independientes y por duplicado, ** $p < 0.005$. *** $p < 0.01$

Para localizar la formación de ONOO^- en estas condiciones, acompañamos estos ensayos con la observación de las células espermáticas bajo microscopía confocal utilizando la misma sonda. La fluorescencia se detectó en la pieza intermedia de los espermatozoides, región donde se localiza las mitocondrias (Figura 21A). No se detectó la formación del oxidante en las condiciones de control (Figura 21B, células en ausencia de AA o NOC-7).

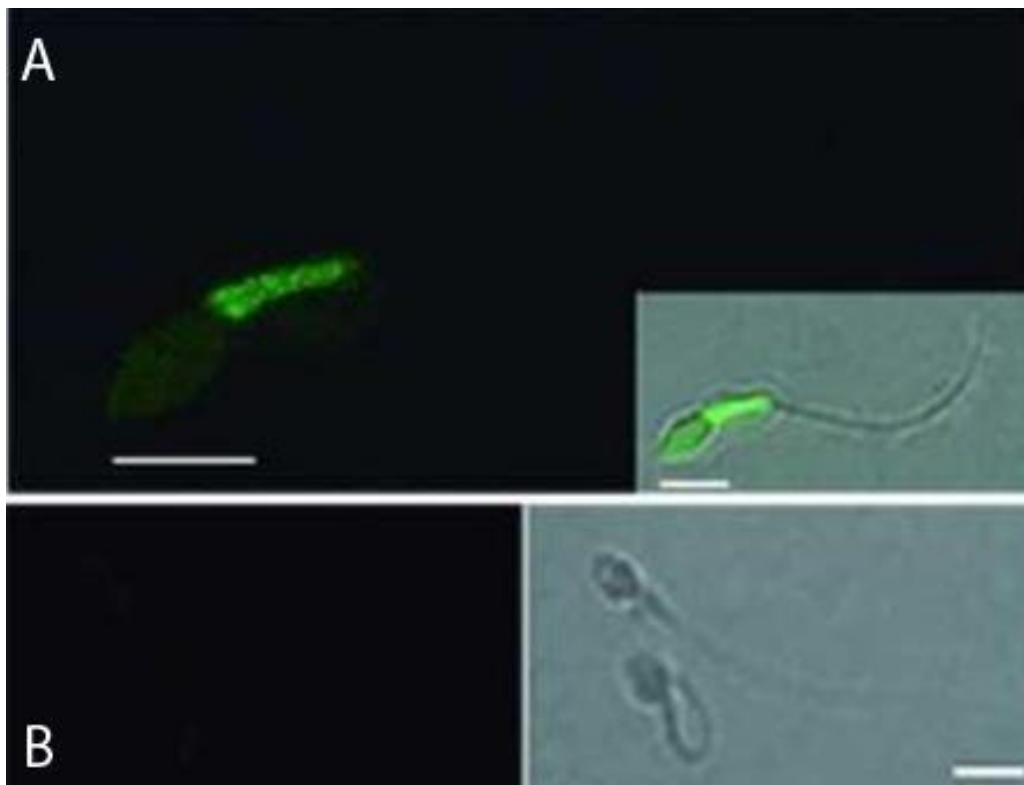


Figura 21. Localización de peroxinitrito *in vivo* en espermatozoides. **A)** Observación de las células bajo microscopía confocal utilizando el láser de argón ($\lambda = 488 \text{ nm}$) barra de calibración= $10 \mu\text{m}$, recuadro: superposición de la micrografía tomada con el láser de argón y su correspondiente micrografía de luz transmitida, barra de calibración= $10 \mu\text{m}$. **B)** Control en el cual las células se incubaron con DHR-123 y NOC-7, izquierda: micrografía tomada a $\lambda = 488 \text{ nm}$ y su correspondiente micrografía de luz transmitida.

Utilizamos la citometría de flujo como forma de evaluar la producción de ONOO^- exclusivamente por los espermatozoides de la muestra, utilizando la misma sonda DHR123 y las mismas condiciones experimentales. Se observó que el 90% de la población espermática incubada con AA y NOC-7 muestran mayores niveles de fluorescencia respecto a los controles (Figura 22A histograma rosado). La cuantificación reveló que el incremento en los niveles de fluorescencia fue de dos veces más en relación a los controles (Figura 22B). Bajo microscopía confocal se puede observar que la fluorescencia se localiza en la pieza intermedia de la mayoría de los espermatozoides (Figura 22C).

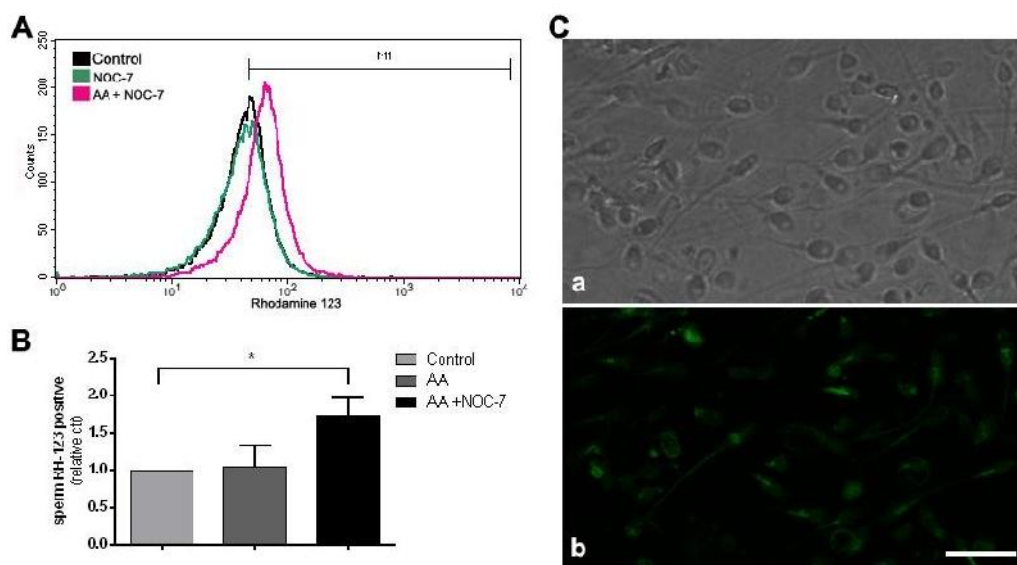


Figura 22. Detección de la formación de peroxinitrito mediante citometría de flujo. En todos los casos la células se incubaron con DHR-123 (50 μ M) **A)** se observan los histogramas de la fluorescencia obtenidos mediante citometría de flujo utilizando el láser de excitación de longitud de onda $\lambda = 488$ nm, los cuales evidencia la distribución de la población celular espermática en función a la formación de RH en las condiciones controles (histograma negro y verde) y en los tratados con AA y NOC-7 (30 μ M). **B)** Cuantificación de la fluorescencia relativa al control de la formación de RH. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media de 3 tres experimentos independientes; * $p < 0.05$. **C,a)** Observación *in vivo* de la formación de RH en células espermáticas bajo microscopía confocal usando el láser de argón y en **C,b)** micrografía confocal de luz transmitida. Barra de calibración = 15 μ m.

6.5 Los espermatozoides representan la fuente principal de especies reactivas del oxígeno.

Para estudiar a la muestra espermática en el estado que representa mejor su contexto fisiológico, los abordajes experimentales se realizan en muestras espermáticas separadas únicamente del plasma seminal (lavado). Es decir que en las muestras estudiadas, además de espermatozoides pueden existir otros tipos celulares como leucocitos (hasta un millón por mL, ya que se descartaron en este trabajo aquellas con

un conteo mayor). Se evaluó la posible formación de ROS, en ausencia y en presencia de un activador específico de la NADPHoxidasa de leucocitos (fMLP). De esta manera, se induce la producción de ROS en leucocitos existentes en la muestra. No se encontró diferencias en la producción de ROS entre la condición control (sin fMLP) y la estimulada con el fMLP (Figura 23A). Como control de la activación específica de la NADPHoxidasa se utilizó en conjunto con fMLP un inhibidor de esta enzima (DPI, Figura 23A).

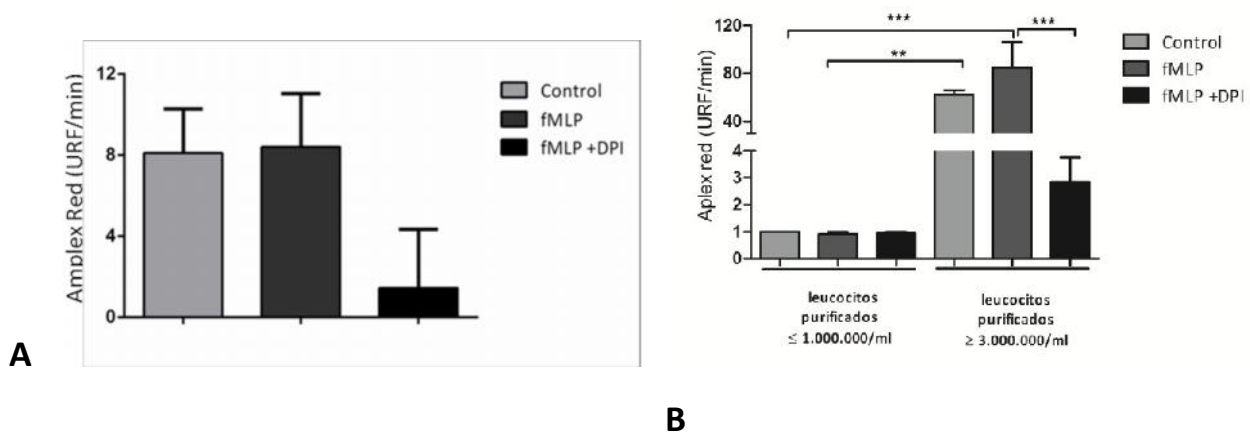


Figura 23. Estudio de la formación de ROS por los leucocitos. **A)** Medias de los valores de fluorescencia de amplex red (50 μM) obtenidos de muestras espermáticas incubadas con fMLP (50 μM) junto con los controles: en ausencia de fMLP y con fMLP más DPI (50 μM). **B)** Medias de los valores de fluorescencia de amplex red obtenida de leucocitos purificados con concentración 1×10^6 cel/mL y 3×10^6 cel/mL tratados con el activador, fMLP y los correspondientes controles. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media de 3 experimentos independientes realizados por duplicado $p > 0.005$.

Posteriormente se purificaron y concentraron leucocitos de muestras de semen a 1×10^6 y 3×10^6 células/mL, en ambas poblaciones inducimos la activación de la NADPHoxidasa con fMLP. En estas condiciones, la muestra de leucocitos con una mayor concentración mostró una mayor producción de ROS respecto a la de menor concentración (Figura 23B). Sin embargo las diferencias entre estas dos poblaciones en estudio no fueron significativas ($p > 0.05$). De esta forma pudimos realizar un control de la técnica y corroboramos que la cantidad de leucocitos que se encuentran presente

en las muestras seleccionada para nuestros trabajo ($< 1 \times 10^6$ células/mL) no son una fuente relevante de formación de ROS (Figura 23B).

6.6 Muestras con bajo porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva muestran mayor estrés nitro-oxidativo

Los ensayos de inmunodetección de proteínas nitradas (anti-3-Tyr-NO₂), marcador ampliamente utilizado para evidenciar daño nito-oxidativo, mostraron que las muestras de baja motilidad presentan mayores niveles de nitración proteica que las muestras de alta motilidad (Figura 24 A). La cuantificación de las bandas confirman estos resultados, las muestras de motilidad baja (a+b de 13% y 29%) presentaron valores de densidad de la banda relativa al control de 45% y 42% respectivamente. Los valores de densidad cuantificados en las muestras de motilidad alta (a+b 34% y 52%) fueron de 27% y 29% respectivamente. También se utilizó el marcador 4-HNE para evidenciar daño oxidativo inducido por lipoperoxidación. En el mismo sentido que la nitración de proteínas, el análisis con el anticuerpo anti-4-HNE mostró un mayor número de bandas marcadas y de mayor densidad en muestras de baja motilidad (Figura 24B). En la muestra de motilidad progresiva baja, a+b 6%, la densidad relativa al control fue de 39% mientras que los valores de densidad fueron más bajos de 26% y 14% en muestras de motilidad progresiva alta , a+b de 26% y 39%.

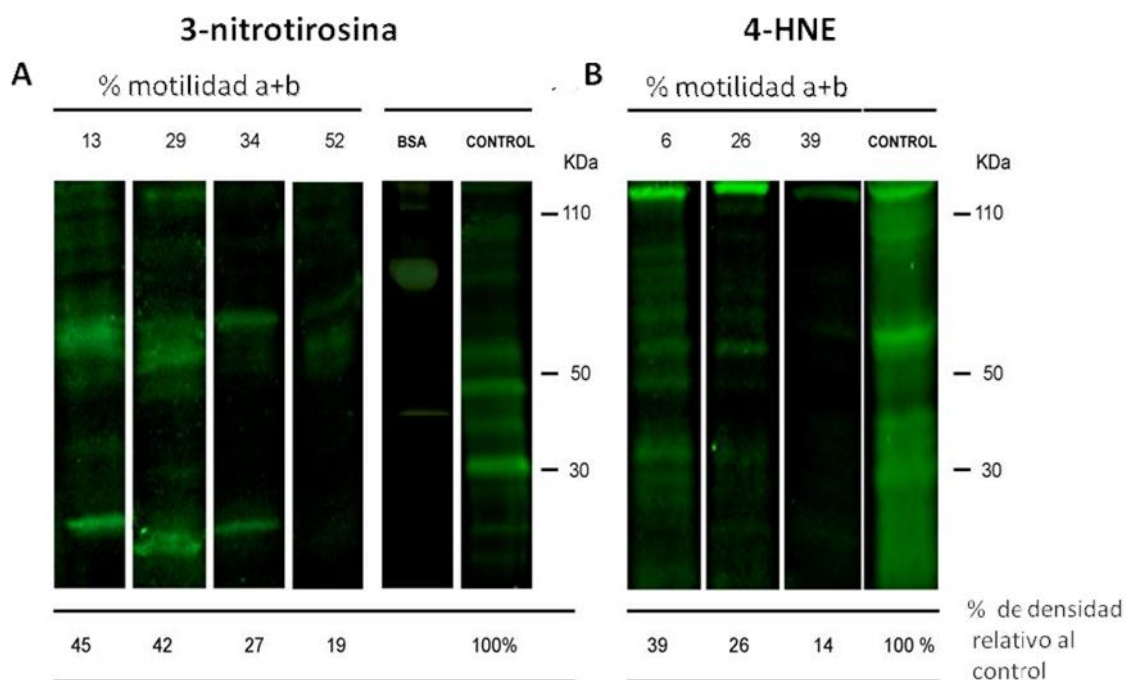


Figura 24. Detección del daño oxidativo. **A)** Evidenciamos proteínas nitradas mediante inmunodetección anti-3-Tyr-NO₂ en muestras con diferente motilidad, la albúmina (BSA) nitrada con un bolo de ONOO⁻ (1mM) corresponde al control de la técnica. **B)** Inmunodetección anti-4-HNE para analizar el daño inducido por lipoperoxidación en muestras con porcentaje de motilidad baja y alta. La muestra referenciada como Control para ambos marcadores de daño (anti-3-Tyr-NO₂ y anti-4-HNE) corresponde a una muestra nitrada con un bolo de ONOO⁻ (1mM) a partir de la cual se realizó la cuantificación de densidad de cada muestra, los valores de la cuantificación de las muestras observadas en el western blot se exponen al final de cada corrida.

6.7 Los mayores niveles de nitración espontánea se detectan en la pieza intermedia y en la cabeza del espermatozoide

Se realizaron ensayos de inmunolocalización de proteínas nitradas con el anticuerpo anti-3-Tyr-NO₂. Como se evidencia en la figura 25 A y B (motilidad a+b de 80% y 60% respectivamente) la inmunomarcación con anti-3-Tyr-NO₂ se observa en la región de la cabeza del espermatozoide. En una muestra con menor porcentaje de células motiles (a+b 56%) la señal se detectó tanto en la cabeza del espermatozoide como en la pieza intermedia, región donde se localizan las mitocondrias (Figura 25C).

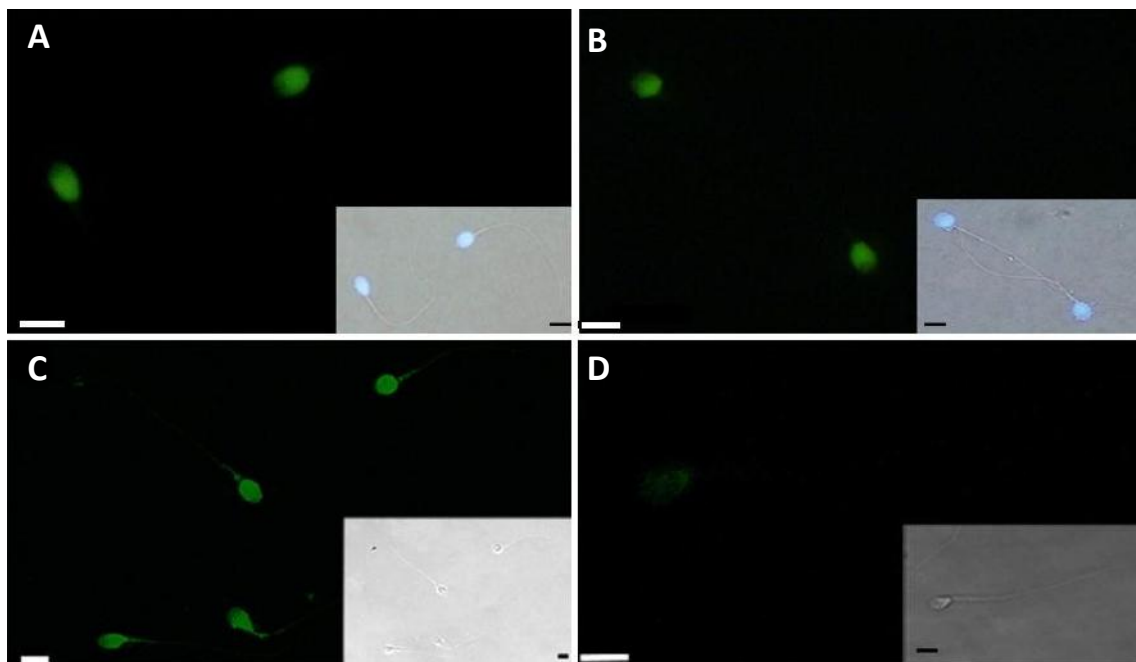


Figura 25. Inmunolocalización de proteínas nitradas fisiológicamente en células espermáticas. A-B) Imágenes confocales de muestras espermáticas de motilidad a+b de 60% (A) y 80% (B) incubados el anticuerpo anti-3-Ty-NO₂ (verde, láser de argón, $\lambda=488$ nm). Los recuadros internos corresponden a la superposición de imágenes de luz transmitidas y de fluorescencia marcada con DAPI (UV $\lambda=405$ nm). **C)** Imagen confocal de una muestra con motilidad a+b de 56% revelada con el marcador anti-3-Tyr-NO₂. **D)** Control en el cual se omitió el anticuerpo primario. Recuadro interno C y D: imagen de luz trasmitida. Barras de calibración: 5 μ m.

Luego nitramos los espermatozoides con un bolo de ONOO⁻ exógeno donde se detectó la nitración de proteínas localizadas en la región de la cabeza y también a lo largo del flagelo (Figura 26). El nivel de nitración de células espermáticas expuesta a un bolo de ONOO⁻, como era esperable, fue mayor a la nitración espontánea de la célula (en condiciones fisiológica) (Figura 26).

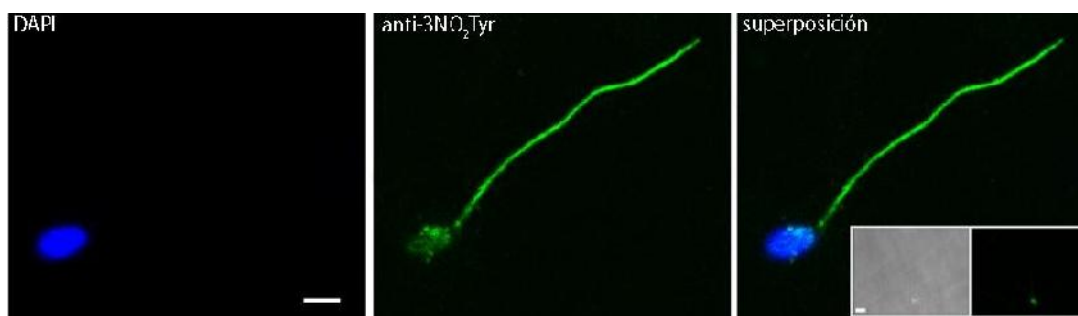


Figura 26. Inmunolocalización de proteínas nitradas en células espermáticas expuestas a un bolo de peroxinitrito. Inmunofluorescencia confocal de espermatozoides incubados con el anticuerpo anti-3-Tyr-NO₂r (verde, láser de argón, $\lambda=488$ nm). Los núcleos se marcaron con una sonda fluorescente DAPI (azul, UV $\lambda=405$ nm). El recuadro corresponde a la condición control en ausencia de anticuerpo primario, imagen de luz transmitida (izquierda) y la composición con la imagen de fluorescencia (derecha). Barra de calibración: 10 μ m.

6.8 Desarrollo de un modelo de daño mitocondrial

Logramos poner a punto un modelo de daño mitocondrial en espermatozoides humanos. Este modelo nos permitirá estudiar los mecanismos que conllevan al compromiso de la motilidad espermática producida por la disfunción mitocondrial. Se utilizó el SIN-1 como fuente de ONOO⁻ el cual a pH = 7 libera O₂^{•-} y [•]NO. Mediante el uso de la sonda DHR-123 logramos detectar la formación de ONOO⁻ por el compuesto SIN-1. Observamos que la formación de ONOO⁻ aumenta en forma exponencial y es directamente proporcional a la concentración de SIN-1 (50 μ M y 200 μ M). A su vez en ausencia de SIN-1, no observamos la formación de RH. Este resultado permite confirmar que el SIN-1 es capaz de producir ONOO⁻, oxidante de interés para desarrollar nuestro modelo experimental de daño mitocondrial (Figura 27).

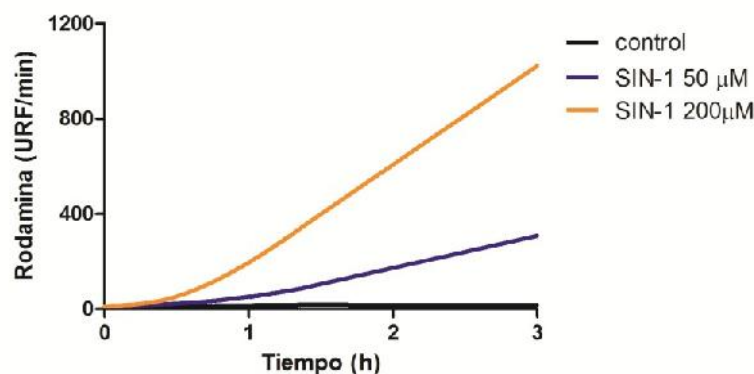


Figura 27. Detección de la formación de ONOO^- por el compuesto SIN-1. Oxidación de DHR-123 (50 μM) a RH por los radicales derivados del ONOO^- . Las curvas corresponden a las diferentes concentraciones de SIN-1, las cuales se indican a la derecha de la gráfica.

Evaluamos el efecto de la exposición a SIN-1 sobre la vitalidad, la motilidad y el daño mitocondrial en espermatozoides. El porcentaje de células espermáticas vitales se mantuvo sin variación en todas las condiciones de experimentales. Al inicio de la incubación ($t = 0$ horas) con 50 μM o 200 μM de SIN-1 la vitalidad espermática fue de $54 \pm 0.5 \%$ y $57\% \pm 1.2 \%$ respectivamente manteniéndose igual luego de 3 horas de incubación ($58 \pm 1 \%$ y $60 \pm 2.5 \%$ para 50 μM y 200 μM respectivamente). Por el contrario la motilidad progresiva de las células espermáticas decayó en función del tiempo de exposición al SIN-1 y en forma dosis dependiente (figura 28). Luego de 3 horas de incubación con SIN-1 50 μM la motilidad progresiva decayó de un 36% a un 20%. El tratamiento con 200 μM de SIN-1 produjo que la motilidad progresiva de espermatozoides, decayera de 36% a 0%. En la condición control, células espermáticas sin tratar con SIN-1, la motilidad progresiva se mantuvo en 36 % a lo largo del tiempo del experimento.

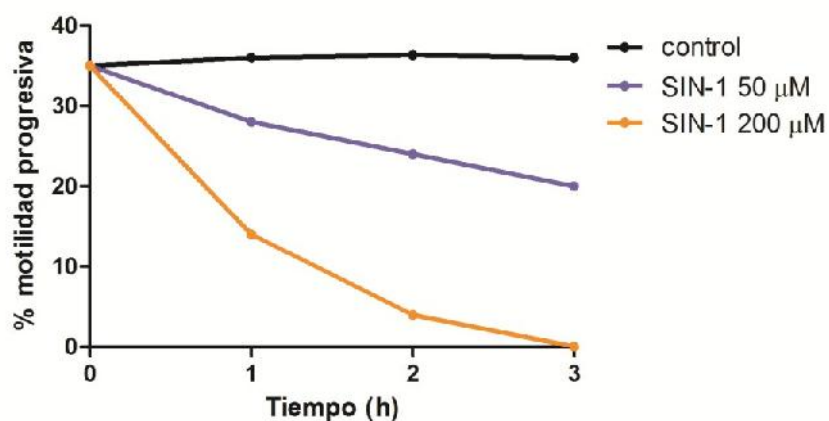


Figura 28. Efecto del peroxinitrito sobre la motilidad espermática. Evaluamos la motilidad para diferente concentración de SIN-1 (0, 50 y 200 μ M). Se tomó una alícuota de la muestra cada hora postratamiento y se evaluó la motilidad mediante el sistema CASA durante un total de 3 horas.

Con el fin de evaluar el daño mitocondrial en las condiciones experimentales antes descritas se utilizó la sonda RH y las muestras se analizaron por citometría de flujo. El tratamiento con SIN-1 (50 μ M) mostró una disminución en la acumulación de RH en función del tiempo de incubación como se detalla en la tabla 3 y Figura 29, evidenciando una alteración en la función mitocondrial. El tratamiento con SIN-1 200 μ M mostró ser más agresivo y presentó un comportamiento errático (tabla 3).

Tabla 3: Daño mitocondrial mediante la exposición a SIN-1

Tiempo	% RH (50 μ M SIN-1)	% RH (SIN-1 200 μ M)
0	95	93
1	88	66
2	80	65
3	70	100

Una muestra de espermatozoides se incubó con FCCP (desacoplante mitocondrial) como control de daño mitocondrial. (Figura 29 registro fucsia).

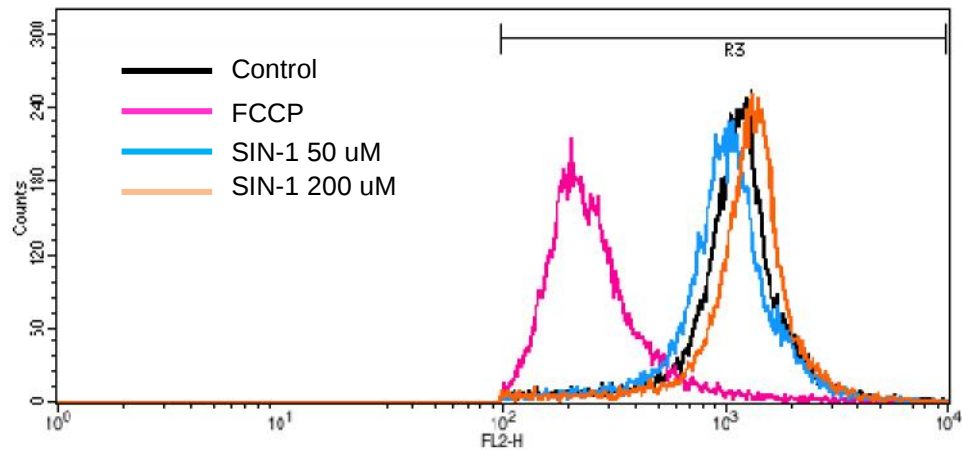


Figura 29. Efecto del peroxinitrito en la integridad de la mitocondria. Se observan los histogramas de la población espermática con los diferentes tratamientos a las 3 horas de incubación con SIN-1, en negro la condición control, fucsia el control del daño mitocondrial con FCCP, en celeste y anaranjado el tratamiento con SIN-1 50 μ M y 200 μ M respectivamente. Para el análisis de la fluorescencia de la sonda RH se utilizó el láser de excitación de longitud de onda $\lambda = 488$.

7 DISCUSIÓN

En este trabajo, mediante el uso de oximetría de alta resolución (Oroboros) hemos logrado analizar la función mitocondrial en espermatozoides vivos. Este tipo de análisis, es realizado en un equipo con electrodos de Clark convencionales dispuestos en cámaras optimizadas que permiten registrar exclusivamente el consumo de la muestra biológica. Esto se combina con software que permiten analizar con alta precisión pequeños cambios en el consumo de O_2 celular. Esta metodología ha sido utilizada previamente en varios tejidos y tipos celulares (102–104), siendo en este trabajo la primera vez que se emplea en el metabolismo mitocondrial espermático. El estudio de la actividad mitocondrial en células intactas brinda información más relevante en cuanto a las condiciones fisiológicas de células y tejidos que en mitocondrias aisladas. Permite el análisis de la actividad mitocondrial y por lo tanto de la disfunción del organelo en su propio ambiente fisiológico, expuestas a sustratos e iones en concentraciones adecuadas a la fisiología celular y en interacción con el citoplasma, membrana plasmática y demás organelos celulares (105). Poder evaluar la función mitocondrial de espermatozoides intactos significó un gran avance porque nos permitió ahondar en la comprensión de los mecanismos fisiológicos vinculados a la adquisición de la capacidad fecundante espermática. Además, en un futuro podría permitir el desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento y diagnóstico de la infertilidad masculina.

Se analizó el estado respiratorio de los espermatozoides utilizando el RCR. En células intactas, la inhibición con oligomicina representa la fracción del consumo de O_2 mitocondrial basal utilizado para la síntesis de ATP. La titulación con FCCP (desacoplante de la ETC) representa la tasa de respiración máxima. El índice RCR, obtenido como la relación entre ambos estados luego de sustraer el consumo de O_2 no mitocondrial (inhibición con AA), es un excelente marcador de la función mitocondrial en las células intactas cuando es medido por respirometría de alta resolución (105).

Nosotros encontramos que los RCR fueron significativamente más bajos en las muestras con motilidad progresiva inferior al 32%, muestras que según los criterios de la OMS se asocian a problemas de fertilidad. Estos resultados coinciden con datos reportados previamente por Ferramosca y col. en 2007, quienes también evaluaron la función mitocondrial mediante el consumo de O_2 pero en células espermáticas lisadas (células expuesta a una solución hipotónica) (106). Nuestros ensayos mostraron ser un método efectivo y altamente reproducible, hecho que se vio reflejado en la cantidad de muestras analizadas (n=130).

En este trabajo evaluamos la motilidad, que aunque no es el único parámetro que refleja la función espermática, es uno de los más relevantes ya que la célula debe recorrer un largo trayecto en el tracto reproductor femenino para lograr el encuentro con el ovocito y la fecundación *in vivo*, para lo cual la motilidad no debe estar comprometida. Gracias al uso del sistema computarizado CASA pudimos incluir el estudio cinético del movimiento espermático. Estos parámetros se han convertido en buenos indicadores de la fertilidad del espermatozoide *in vivo* (107). También se correlacionan con altas tasas de fecundación *in vitro* (108). Todos los parámetros estudiados, VCL, VSL, VAP y ALH, se correlacionan positivamente con el índice RCR, es decir que ante la depresión de la función mitocondrial estos parámetros se ven comprometidos.

Pudimos demostrar que las mitocondrias del espermatozoide humano forman ROS, que en presencia de RNS pueden llevar a un estrés nitro-oxidativo. El tratamiento de las mitocondrias espermáticas aisladas, en presencia de sustratos (succinato) y el agregado del inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria (AA) favorecen la formación de $O_2^{\bullet-}$. El $O_2^{\bullet-}$ en presencia del flujo exógeno de $^{\bullet}NO$ (NOC-7) en una reacción mediada por difusión forma $ONOO^-$, detectado por el incremento significativo en los niveles de fluorescencia de la RH (producto de oxidación de la DHR-123) (Figura 19). Frente al agregado de metionina que neutraliza al $ONOO^-$, los niveles de fluorescencia de la RH bajan. Los experimentos en mitocondrias aisladas determinaron el flujo de $^{\bullet}NO$ que permitió la mayor formación de $ONOO^-$ medida por la oxidación de DHR-123.

Esta primera aproximación demuestra que las mitocondrias espermáticas aisladas tienen el potencial de producir especies nitro-oxidativas. Cuando realizamos el mismo diseño experimental en espermatozoides intactos (Figura 20) los resultados fueron similares: se produjo formación de $ONOO^-$ en presencia de AA y NOC-7. Estos resultados coinciden con lo reportado por Koppers & col. (107) quienes evaluaron

indirectamente la formación de $O_2^{\bullet-}$, el cual dismuta por la posible acción de la SOD a H_2O_2 y difunde hacia afuera del espermatozoide. En estos experimentos los autores utilizaron una sonda que se localiza extracelularmente (luminol). Siendo la sonda extracelular, resulta difícil asegurar que la formación del oxidante proviene exclusivamente de la mitocondria espermática, ya que la misma puede reaccionar con oxidantes provenientes de la NADPH-oxidasa o de otras células (110). Nosotros utilizamos una sonda catiónica y lipofílica (DHR-123) lo que facilita su internalización a las células. Esto nos permite demostrar que el oxidante se está produciendo intracelularmente. Como se aprecia en Figura 21, demostramos claramente que las especies nitro-oxidativas se concentran en la pieza intermedia del espermatozoide, región donde se localizan las mitocondrias. Esto fue confirmado por la inmunolocalización de anti-3-Tyr- NO_2 en el mismo sitio y fundamentalmente en las muestras de baja motilidad (Figura 25). Complementando estos resultados, encontramos que cuando se estimuló la NADPH-oxidasa específica de los leucocitos no se encontró un incremento en la formación de ROS en ausencia de leucocitospermia. Los estudios con citometría de flujo no solo nos permitieron cuantificar la cantidad de espermatozoides capaces de producir ROS sino que contribuyeron a sustentar la hipótesis de que son las células productoras de éstos. Esto se debe a que en el análisis por citometría de flujo se selecciona exclusivamente la población correspondiente a los espermatozoides excluyendo del análisis otros contaminantes.

En conjuntos nuestros datos apoyan el concepto de que las propias mitocondrias espermáticas son la fuente principal de producción de ROS.

Como se describió anteriormente, diversos oxidantes ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $^{\bullet}NO$) están involucrados en procesos fisiológicos del espermatozoide (71,74). Sin embargo, la producción excesiva de oxidantes puede inducir efectos adversos a través de la oxidación de blancos celulares como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las células espermáticas son muy vulnerables al ataque de las especies nitro-oxidativas dada su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y la carencia de antioxidantes (111,112). La presencia de residuos de proteínas nitrados evidencian la formación de $ONOO^-$ *in vivo*. En este trabajo se observó (además de la correlación entre RCR y parámetros cinéticos espermáticos) que las muestras con alto porcentaje de espermatozoides con baja motilidad presentan niveles mayores de nitración y de aductos de 4-HNE (indicadores de lipoperoxidación) que las muestra de alta motilidad. Es decir, muestras de baja motilidad exhiben un mayor daño nitro-oxidativo.

Un resultado interesante fue que la inmunolocalización de la nitración espontanea se limitó a la pieza intermedia mientras que al exponer a las células a un flujo externo de $ONOO^-$ (Figura 26) observamos que la nitración se extiende a lo largo de todo el flagelo. Estos datos sugieren que los oxidantes se forman en la mitocondria espermática y frente a un exceso de $ONOO^-$ podrían difundir hacia otros blancos nitrables de la célula.

Estudios realizados *in vitro* mostraron que en presencia de $ONOO^-$ la motilidad espermática decae significativamente (113). No se conocen en profundidad los mecanismos por los cuales el exceso de las ROS podría alterar la motilidad espermática. Algunas evidencias recientes muestran que en condiciones de estrés oxidativo se forman aductos de 4-HNE en la cadena pesada de la dineína, esto conduce a una alteración en funcionalidad de la proteína motora que impulsa la movilidad, llevando a una alteración en la motilidad espermática (114). El $ONOO^-$ puede reaccionar con los grupos tioles de residuos de cisteína formando el correspondiente ácido sulfénico el cual es capaz de reaccionar con otro grupo tiol generando un grupo disulfuro (113). Las proteínas estructurales en el axonema se caracterizan por contener gran cantidad de grupos tioles, lo cual sugiere que el $ONOO^-$ puede afectar la motilidad a través de un

daño en el centro regulador del movimiento espermático (113). La nitración de proteínas en el espermatozoide también puede alterar los patrones de fosforilación y la desregulación del calcio, ambos procesos fundamentales para la capacitación (115,116). Finalmente, las propias enzimas mitocondriales de la MMI pueden ser blanco de estrés nitro-oxidativo aumentando la disfunción mitocondrial en un ciclo que se perpetúe hasta producir la muerte del espermatozoide.

Tomados en conjunto estos últimos resultados, concluimos que la disfunción mitocondrial induce la producción excesiva de oxidantes que desencadena un daño nitro-oxidativo, alterando la motilidad espermática y por lo tanto su capacidad fecundante.

Las muestras espermáticas humanas se caracterizan por ser muy heterogéneas, apreciándose subpoblaciones de espermatozoides con características fisiológicas y bioquímicas diferentes. Esta característica dificulta el estudio de los mecanismos que subyacen la disfunción mitocondrial. Por lo cual comenzamos a desarrollar un modelo de daño mitocondrial mediante el uso de oxidantes que homogenice las muestras. En base a las evidencias observadas decidimos utilizar el ONOO^- como oxidante. El compuesto SIN-1 puede fácilmente ingresar en la célula y generar flujos de $\text{O}_2^{\bullet -}$ y $\bullet\text{NO}$ intracelular y así formar ONOO^- (117,118). Al exponer las células al SIN-1 observamos una disminución dosis dependiente en la motilidad. Esto se vio acompañado de la disminución en el potencial de membrana observada por el descenso en la fluorescencia de la RH por citometría de flujo. Es importante observar que la vitalidad espermática no se vio afectada por el tratamiento con el compuesto, aunque la vitalidad fue un poco más baja (50%) de lo esperado (70%) (119). Estos datos revelan que el modelo con SIN-1 es eficiente en generar un daño mitocondrial inducido por ONOO^- lo que conlleva a la alteración en la motilidad. Durante el desarrollo del modelo el grupo del Uribe & col. (2015) reportó la posibilidad de utilizar el daño producido por oxidantes externos como modelo experimental de daño espermático, intentando replicar algunas de las posibles condiciones a la que se enfrentan los espermatozoides de pacientes infértiles (120). Este modelo podrá ser utilizado en el futuro para probar

drogas que permitan recuperar la función mitocondrial en muestras con espermatozoides dañados por ROS.

8 CONCLUSIONES

En el trabajo demostramos que las muestras espermáticas con bajo porcentaje de células con motilidad progresiva se correlaciona con una menor función mitocondrial. Además, las células espermáticas son capaces de producir ONOO^- , un potente agente oxidante. Más aun, la nitración proteica y la formación de aductos 4-HNE, que indica la participación de ONOO^- , incrementan en muestras con baja motilidad. Estos resultados indican que la disfunción mitocondrial presenta una importante asociación con la motilidad espermática. Esta disfunción mitocondrial se evidencia en el aumento en la formación de especies oxidantes que llevan a la disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide a través de mecanismos aún no conocidos pero que incluyen la nitración de proteínas claves en el movimiento espermático y la lipoperoxidación de lípidos de membrana del espermatozoide.

9 PERSPECTIVAS

Como se planteó en nuestro trabajo, la disfunción mitocondrial induce la producción excesiva de oxidantes que desencadena un daño nitro-oxidativo. Una estrategia para evitar el daño por parte de los oxidantes es utilizar antioxidantes que neutralicen los efectos adversos de los mismos. Hasta ahora el uso de antioxidantes para tratar la infertilidad masculina ha dado resultados contradictorios y estos no han sido muy prometedores (121–123). Siendo la mitocondria espermática clave en la formación patológica de oxidantes, la concentración de drogas antioxidantes en la misma podría aumentar las posibilidades de interrumpir el proceso de daño espermático. Recientemente se han desarrollado novedosos antioxidantes conjugados a un catión lipofílico (trifenilfosfonio) lo cual asegurara la difusión a través de la membrana de las células y su concentración en la mitocondria (124,125). Resultará interesante utilizar el modelo de daño mitocondrial desarrollado en el trabajo para probar si el tratamiento con estos antioxidantes logra prevenir el estrés nitro-oxidativo. De ser así, estaríamos

demostrando que el restablecimiento de la función mitocondrial tendría efectos beneficiosos para el tratamiento de la disfunción espermática. La mitocondria puede transformarse en un blanco valioso para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar la infertilidad masculina.

10 REFERENCIAS

1. Chachamovich JR, Chachamovich E, Ezer H, Fleck MP, Knauth D, Passos EP. Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review. *J Psychosom Obstet Gynecol* [Internet]. 2010 Jun 5 [cited 2017 Feb 6];31(2):101–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20443659>
2. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.
3. Cui W. Mother or nothing: the agony of infertility. *Bull World Health Organ* [Internet]. World Health Organization; 2010 Dec 1 [cited 2017 Feb 6];88(12):881–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124709>
4. Fisher JRW, Hammarberg K. Psychological and social aspects of infertility in men: an overview of the evidence and implications for psychologically informed clinical care and future research. *Asian J Androl* [Internet]. 2012 Jan 19 [cited 2017 Feb 7];14(1):121–9. Available from: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2011.72>
5. Nacional de Endocrinología I, Luis Calero Felipe Santana J. Trabajos originales La infertilidad como evento de frustración personal. Reflexiones de un grupo de varones de parejas infértiles.
6. Jiménez-Reina L, Maartens PJ, Jimena-Medina I, Agarwal A, du Plessis SS. Overview of the Male Reproductive System. In: *Exercise and Human Reproduction* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [cited 2017 Feb 7]. p. 1–17. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3402-7_1
7. Serrano RT. Artículo de revisión Una visión actual de la infertilidad masculina. 2012;4(3).
8. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep* [Internet]. 2016 Oct 9 [cited 2017 Feb 7];17(10):70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11934-016-0627-x>
9. Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Feb 7];61(4):261–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19745794>
10. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1985 Dec 14 [cited 2017 Feb 7];291(6510):1693–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3935248>

11. Heineman MJ. Manual de Análisis Básico de Semen.
12. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* [Internet]. 1990 Jul [cited 2017 Feb 7];5(5):586–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2394790>
13. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 1986 Dec [cited 2017 Feb 7];46(6):1118–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946611>
14. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Feb 7];16(3):231–45. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmp048>
15. Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* [Internet]. NIH Public Access; 2011 Mar 1 [cited 2017 Feb 7];95(3):1025–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122845>
16. Eisenberg ML. Invited Commentary: The Association Between Marijuana Use and Male Reproductive Health. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2017 Feb 7];182(6):482–4. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwv137>
17. Klaiber EL, Broverman DM, Dalen JE. Serum estradiol levels in male cigarette smokers. *Am J Med* [Internet]. 1984 Nov [cited 2017 Feb 7];77(5):858–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6496540>
18. Eisenberg ML. Invited Commentary: The Association Between Marijuana Use and Male Reproductive Health. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2017 Feb 7];182(6):482–4. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwv137>
19. Kumar S, Kumari A, Murarka S. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian J Exp Biol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Feb 7];47(8):615–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775067>
20. Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2010 [cited 2017 Feb 7];(198):99–115. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02062-9_7
21. Lamb DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian J Androl* [Internet]. 2010 Jan [cited 2017 Feb 7];12(1):64–70. Available from: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2009.4>
22. Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2017 Feb 7];17(10):839–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-2042.2010.02619.x>

23. Agarwal A, Roychoudhury S, Bjugstad KB, Cho C-L. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Ther Adv Urol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2017 Feb 7];8(5):302–18. Available from: <http://tau.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1756287216652779>
24. Aitken RJ. Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2017 Feb 7];33(12):1691–2. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10815-016-0791-4>
25. Ho H-C, Wey S. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Feb 7];70(8):719–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20457>
26. Espermiogénesis [Internet]. [cited 2017 Feb 7]. Available from: <https://www.emaze.com/@AOQRTIRF/Espermiogénesis>
27. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario [Internet]. [cited 2017 Feb 7]. Available from: <http://www.serida.org/>
28. Olson GE, Winfrey VP. Identification of a cytoskeletal network adherent to the mitochondria of mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Mol Struct Res* [Internet]. 1986 Feb [cited 2017 Feb 7];94(2):131–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782926>
29. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* [Internet]. 1999 Aug 27 [cited 2017 Feb 7];285(5432):1393–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10464096>
30. FAWCETT B 1995. Tratado de histología. 12th ed.
31. Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2017 Feb 7];214(1):11–20. Available from: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JOE-12-0072>
32. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* [Internet]. 2003 Oct 15 [cited 2017 Feb 7];552(2):335–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561818>
33. Nelson DL, Lehninger AL CM. LEHNINGER. PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA. 4th ed. 2008.
34. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* [Internet]. 1999 Mar 5 [cited 2017 Feb 7];283(5407):1488–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066163>
35. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* [Internet]. 2001 Apr 20 [cited 2017 Feb 7];495(1–2):12–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322939>
36. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2017 Feb 7];

- 7];47(4):333–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158490900269X>
37. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2013 Feb 25 [cited 2017 Feb 7];6(1):19. Available from: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-6-19>
 38. La membrana plasmática. orgánulos membranosos 2013 [Internet]. [cited 2017 Feb 7]. Available from: <http://es.slideshare.net/Alberkar/la-membrana-plasmtica-orgnulos-membranosos-2013>
 39. Quijano C, Trujillo M, Castro L, Trostchansky A. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Feb 7];8:28–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231715300112>
 40. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Feb 7];417(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061483>
 41. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2017 Feb 7];82(1):47–95. Available from: <http://physrev.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physrev.00018.2001>
 42. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* [Internet]. 1973 May 25 [cited 2017 Feb 7];248(10):3582–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4702877>
 43. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1986 May 1 [cited 2017 Feb 7];246(2):501–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3010861>
 44. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Oct 19 [cited 2017 Feb 7];276(42):38388–93. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M105395200>
 45. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1995 Jun [cited 2017 Feb 7];64(1):97–112. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
 46. Mitozo PA, de Souza LF, Loch-Neckel G, Flesch S, Maris AF, Figueiredo CP, et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2017 Feb 7];51(1):69–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584911001742>
 47. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* [Internet]. 1990 [cited 2017 Feb 7];186:1–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172697>
 48. Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria

- and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Feb 7];4:381–98. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231715000178>
49. Centelles JJ, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico. *Offarm*. Elsevier; :96–102.
 50. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Mar 23 [cited 2017 Feb 7];101(12):4003–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307446101>
 51. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1991 Aug 1 [cited 2017 Feb 7];288(2):481–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654835>
 52. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2017 Feb 7];33(11):1451–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446202>
 53. R R. Evolución del concepto de “Estrés oxidativo.” *Anales de la Facultad de Medicina*. Montevideo, Uruguay; 2014;1(2):9-22.
 54. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Feb 9];6(8):662–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2222>
 55. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2017 Feb 9];45(4):357–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584908002128>
 56. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Mar 23 [cited 2017 Feb 9];101(12):4003–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020765>
 57. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep 13 [cited 2017 Feb 9];288(37):26464–72. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R113.472936>
 58. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* [Internet]. 2002 Jan 12 [cited 2017 Feb 9];383(3–4):401–9. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2002.383.issue-3-4/bc.2002.044/bc.2002.044.xml>
 59. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2017 Feb 9];22(37):5734–54. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206663>
 60. de Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Feb 9];46(4):502–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584908007089>

61. de Lamirande E, Lamothe G, Villemure M. Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2017 Feb 9];46(10):1420–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584909001245>
62. Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2015 Apr 3 [cited 2017 Feb 9];32(4):509–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10815-014-0425-7>
63. Mortimer ST. CASA--practical aspects. *J Androl* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];21(4):515–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901437>
64. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];3(5):403–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528908>
65. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Feb 9];32(1):1–17. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
66. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2006 May 16 [cited 2017 Feb 9];250(1–2):66–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720705004727>
67. Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl* [Internet]. 1984 [cited 2017 Feb 9];13(2–3):153–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6537743>
68. Kozlovsky P, Gefen A. The relative contributions of propulsive forces and receptor-ligand binding forces during early contact between spermatozoa and zona pellucida of oocytes. *J Theor Biol* [Internet]. 2012 Feb 7 [cited 2017 Feb 9];294:139–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519311005649>
69. Arenas Ríos E, Ruiz AC, García DA, Pablo PJ, Rubio Z, Tobón AR, et al. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide.
70. Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2017 Feb 9];143(13):2325–33. Available from: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.136499>
71. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* [Internet]. 1995 May [cited 2017 Feb 9];2017–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544800>
72. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* [Internet]. 1995 Apr [cited 2017 Feb 9];121(4):1129–37.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743926>

73. de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* [Internet]. 1993 Feb [cited 2017 Feb 9];16(1):21–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385650>
74. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* [Internet]. 1994 Dec [cited 2017 Feb 9];17(6):300–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744509>
75. 'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2017 Feb 9];41(4):528–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584906002887>
76. Buzadzic B, Vucetic M, Jankovic A, Stancic A, Korac A, Korac B, et al. New insights into male (in)fertility: the importance of NO. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Feb 9];172(6):1455–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12675>
77. Kameshwari DB, Siva AB, Shivaji S. Inhibition of in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* [Internet]. 2003 May [cited 2017 Feb 9];49(3):421–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887095>
78. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];16(5):424–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575982>
79. Salvolini E, Buldreggini E, Lucarini G, Vignini A, Di Primio R, Balercia G. Nitric oxide synthase and tyrosine nitration in idiopathic asthenozoospermia: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Feb 9];97(3):554–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211029062>
80. Davila MP, Muñoz PM, Bolaños JMG, Stout TAE, Gadella BM, Tapia JA, et al. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction* [Internet]. 2016 Dec 21 [cited 2017 Feb 9];152(6):683–94. Available from: <http://www.reproduction-online.org/lookup/doi/10.1530/REP-16-0409>
81. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2008 Feb 15 [cited 2017 Feb 9];14(3):243–58. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmn004>
82. Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *J Androl* [Internet]. 2006 Oct 4 [cited 2017 Feb 9];28(2):229–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.106.001362>
83. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm

- motility. *J Androl* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];13(5):379–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331007>
84. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* [Internet]. 2003 Apr [cited 2017 Feb 9];79(4):829–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749418>
 85. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* [Internet]. 1997 Apr [cited 2017 Feb 9];20(2):61–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292315>
 86. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];10(3):214–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501260>
 87. Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod* [Internet]. 1992 Apr [cited 2017 Feb 9];7(4):517–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1522196>
 88. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod* [Internet]. 1995 Jul [cited 2017 Feb 9];10(7):1736–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582971>
 89. Zini A, Defreitas G, Freeman M, Hechter S, Jarvi K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril* [Internet]. 2000 Sep [cited 2017 Feb 9];74(3):461–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973638>
 90. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2017 Feb 9];75(2):291–302. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2007.04.024>
 91. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1996 Apr 15 [cited 2017 Feb 9];328(2):309–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986196901782>
 92. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* [Internet]. 2005 Dec 31 [cited 2017 Feb 9];65(2–3):45–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X05001454>
 93. Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2005 Jan 15 [cited 2017 Feb 9];38(2):262–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584904008457>
 94. Valez V, Cassina A, Batinic-Haberle I, Kalyanaraman B, Ferrer-Sueta G, Radi R.

- Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2017 Feb 9];529(1):45–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986112003803>
95. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Feb 9];1852(5):826–38. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915000241>
 96. Alvarez MN, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol* [Internet]. 2002 [cited 2017 Feb 9];359:353–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481586>
 97. Edwards ML, Stemerick DM, Sabol JS, Diekema KA, Dinerstein RJ. Inhibition of myeloperoxidase release from rat polymorphonuclear leukocytes by a series of azachalcone derivatives. *J Med Chem* [Internet]. 1994 Dec 9 [cited 2017 Feb 9];37(25):4357–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996547>
 98. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* [Internet]. 1993 Jun 15 [cited 2017 Feb 9];617–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391253>
 99. Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2006 Mar 18 [cited 2017 Feb 9];534(1–3):1–11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299906000628>
 100. Blanco Garcia J, Aldinucci C, Maiorca SM, Palmi M, Valoti M, Buonocore G, et al. Physiopathological effects of the NO donor 3-morpholinomethylsydnimine on rat cortical synaptosomes. *Neurochem Res* [Internet]. 2009 May 8 [cited 2017 Feb 9];34(5):931–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-008-9854-y>
 101. Amaral A, Ramalho-Santos J. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl* [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 Feb 9];33(1):e180–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x>
 102. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2010 Apr 15 [cited 2017 Feb 9];12(4):537–77. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2009.2531>
 103. Scaglia F. The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Dev Disabil Res Rev* [Internet]. 2010 Aug 27 [cited 2017 Feb 9];16(2):136–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ddrr.115>
 104. Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, et al. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Feb 9];32(3):528–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996108002192>

105. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* [Internet]. 2011 Apr 15 [cited 2017 Feb 9];435(2):297–312. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20110162>
106. Ferramosca A, Focarelli R, Piomboni P, Coppola L, Zara V. Oxygen uptake by mitochondria in demembranated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl* [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Feb 9];31(3):337–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2605.2007.00775.x>
107. Chan SY, Wang C, Chan ST, Ho PC, So WW, Chan YF, et al. Predictive value of sperm morphology and movement characteristics in the outcome of in vitro fertilization of human oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* [Internet]. 1989 Jun [cited 2017 Feb 9];6(3):142–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2677189>
108. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];12(4):231–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1917688>
109. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2008 Aug [cited 2017 Feb 9];93(8):3199–207. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2007-2616>
110. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, et al. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Mar 16 [cited 2017 Feb 9];287(12):9376–88. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.314955>
111. Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TIS, Liao T-L, Wei Y-H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* [Internet]. 2008 May [cited 2017 Feb 9];89(5):1183–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028207011399>
112. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* [Internet]. 1995 Oct [cited 2017 Feb 9];10 Suppl 1:15–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592032>
113. Cabrillana ME, Uribe P, Villegas J V, Álvarez J, Sánchez R, Fornés MW. Thiol oxidation by nitrosative stress: Cellular localization in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2016 Oct 2 [cited 2017 Feb 9];62(5):325–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19396368.2016.1208782>
114. Baker MA, Weinberg A, Hetherington L, Villaverde A-I, Velkov T, Baell J, et al. Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biol Reprod* [Internet]. 2015 Apr 30 [cited 2017 Feb 9];92(4):108. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.126680>

115. Monteiro HP. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2002 Sep 15 [cited 2017 Feb 9];33(6):765–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208365>
116. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2003 Jun 6 [cited 2017 Feb 9];305(3):776–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763060>
117. Fiuza B, Subelzú N, Calcerrada P, Stralioetto MR, Piacenza L, Cassina A, et al. Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free Radic Res* [Internet]. 2015 Feb 28 [cited 2017 Feb 9];49(2):122–32. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2014.983096>
118. Swintek AU, Christoph S, Petrat F, de Groot H, Kirsch M. Cell type-dependent release of nitric oxide and/or reactive nitrogenoxide species from intracellular SIN-1: effects on cellular NAD(P)H. *Biol Chem* [Internet]. 2004 Jul 5 [cited 2017 Feb 9];385(7):639–48. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2004.385.issue-7/bc.2004.079/bc.2004.079.xml>
119. Highland HN, Rishika AS, Almira SS, Kanthi PB. Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. *J Hum Reprod Sci* [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 9];9(3):194–9. Available from: <http://www.jhrsonline.org/text.asp?2016/9/3/194/192070>
120. Uribe P, Boguen R, Treulen F, Sánchez R, Villegas J V. Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2017 Feb 9];21(3):237–43. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gau107>
121. Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Feb 9];83(3):399–407. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X14005457>
122. Ma H, Liu D, Wang W, Wang L, Fu B, Li Z, et al. EFFECT OF SEMEN EXTENDER SUPPLEMENTATION WITH TREHALOSE, VITAMIN C AND E ON POST-THAW MIN PIG SPERM QUALITIES. *Cryo Letters* [Internet]. [cited 2017 Feb 9];36(5):308–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574677>
123. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2009 Aug 19 [cited 2017 Feb 9];26(8):427–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10815-009-9343-5>
124. Murphy MP, Smith RAJ. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Feb 9];47(1):629–56. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105110>
125. Ross MF, Kelso GF, Blaikie FH, James AM, Cochemé HM, Filipovska A, et al. Lipophilic

triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 Feb 9];70(2):222–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807662>

