

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Óxido nítrico y fertilidad masculina: relación directa con los parámetros seminales



Yulieth Catherine Quintero Quinchia y Walter D. Cardona Maya*

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 11 de julio de 2016; aceptado el 31 de octubre de 2016

Disponible en Internet el 1 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Óxido nítrico;
Espermatozoide;
Movilidad;
Viabilidad;
Reacción acrosomal;
Mitocondria;
Ácido
desoxirribonucleico

KEYWORDS

Nitric oxide;
Spermatozoa;
Motility;
Viability;
Acrosome reaction;
Mitochondria;
Deoxyribonucleic acid

Resumen El óxido nítrico es una molécula gaseosa producto de la conversión de L-arginina a L-citrulina por una familia de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintasas presentes en diferentes partes del cuerpo, incluyendo los órganos reproductivos. En el espermatozoide las concentraciones de óxido nítrico bajas derivan en el mantenimiento de las funciones fisiológicas, mientras que las concentraciones altas repercuten negativamente sobre la calidad espermática. © 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Nitric oxide and male fertility: Direct relationship with sperm parameters

Abstract Nitric oxide is a gas molecule, and a product of converting L-arginine to L-citrulline by a family of nitric oxide synthases, isoenzymes expressed in different parts of the body, including the reproductive organs. In the sperm cells, the lower concentrations of nitric oxide arise from maintaining physiological functions, while high concentrations have a negative impact on sperm quality.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El óxido nítrico (ON) fue reseñado por primera vez en 1980 en los trabajos de los profesores Furchgott y Zawasky, aunque con el nombre de factor relajante derivado del endotelio¹. Fue en 1987 cuando se acuñó el nombre de ON^{2,3}. El ON es

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co
(W.D. Cardona Maya).

Tabla 1 Evidencia de la asociación del efecto positivo o negativo del óxido nítrico sobre los parámetros seminales

| Parámetro seminal | Efecto del óxido nítrico | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | Positivo | Negativo |
| Movilidad | 9, 51, 55, 58 | 38, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60 |
| Viabilidad | 51, 55 | 52, 54, 55 |
| ADN | 70 | 8, 71, 72, 73, 74, 75 |
| Capacitación | 77, 78, 79, 81 | 77, 80 |
| Mitocondria | 85 | 86 |
| Reacción acrosomal | 88, 89, 90 | 88, 89 |

un gas altamente reactivo y lipofílico con una vida media corta², producto de la conversión de L-arginina a L-citrulina en presencia de oxígeno por la familia de isoenzimas ON sintasas (ONS)⁴. Las ONS incluyen las enzimas constitutivas dependientes del calcio, que se encuentran presentes en células endoteliales (ONS_e)⁵ y neuronales (ONS_n)^{6,7}. Además, se ha reportado su presencia en el testículo, el epidídimo⁸, los espermatozoides⁹, el ovario¹⁰ y el útero de los mamíferos¹¹. De manera similar, existe otro tipo de isoenzima, denominada ON sintasa inducible (ONS_i), la cual produce mayores niveles de ON¹², que es expresada en las células únicamente después de la estimulación inmunológica e inflamatoria¹³⁻¹⁸.

El ON está implicado en diversos procesos fisiológicos como la apoptosis¹⁹, la inhibición de la agregación plaquetaria²⁰, la inflamación²¹⁻²³, la respuesta inmune²⁴, la diferenciación celular²⁵, la producción de hormonas²⁶, la regulación del tono vascular², la neurotransmisión²⁷, la erección del pene²⁸⁻³¹ y la modulación de las funciones reproductivas³²⁻³⁵. Además, está involucrado en algunas funciones espermáticas que afectan tanto positiva como negativamente los parámetros seminales convencionales y funcionales de manera dependiente de las dosis y del tiempo de exposición³⁶⁻³⁸, y que cumplen, por lo tanto, un papel importante en la reproducción (tabla 1).

A pesar de los múltiples beneficios, los efectos perjudiciales del ON se originan al combinarse con el anión superóxido (O²⁻) formando peroxinitrito (ONOO⁻)³⁹, una especie reactiva del nitrógeno que conduce a apoptosis, necrosis⁴⁰, oxidación de proteínas⁴¹, además del daño del ADN^{42,43}, de las mitocondrias⁴⁴ y de los lípidos⁴⁵. De otro lado, en algunas alteraciones médicas como las afecciones renales, disfunción inmune⁴⁶, hipertensión arterial⁴⁷ y disfunción endotelial⁴⁸, los niveles de antagonistas competitivos de la ONS (N-monometil-L-arginina [L-NMMA] y N-N-dimetil-L-arginina asimétrica [L-ADMA]) aumentan y favorecen la disminución de la síntesis de ON⁴⁹.

El objetivo de esta revisión es describir el efecto del ON sobre algunos parámetros espermáticos convencionales y funcionales.

El óxido nítrico: efectos sobre la movilidad y la viabilidad espermática

Los espermatozoides son producidos en los testículos en un proceso celular que tarda alrededor de 64 días. Cuando son

eyaculados, poseen un movimiento característico de desplazamiento, el cual les permite viajar en busca del oocito por el tracto reproductivo femenino, lugar en el que sufren una serie de modificaciones en las proteínas conocido como capacitación espermática⁵⁰.

En las primeras investigaciones sobre la relación entre el ON, la movilidad y la viabilidad espermática se utilizaron compuestos liberadores de ON. Aunque los hallazgos reportados son contradictorios^{38,51,52}, las discrepancias no repercuten en la calidad de los estudios, debido a que obedecen, más que a errores metodológicos, a diferencias en las condiciones experimentales. Hellstrom et al., en 1994, indicaron que los niveles bajos de nitroprusiato de sodio (NPS) eran beneficiosos para el mantenimiento de la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides hasta 6 h después de la descongelación. Las muestras de espermatozoides criopreservados tratadas con 50 y 100 nM de NPS mantenían la velocidad curvilínea y reducían la lipoperoxidación de la membrana plasmática respecto al control⁵¹.

En contraste, Roselli et al.⁵² y Weinberg et al.³⁸, un año después, concluyeron que los donantes de ON reducen el movimiento espermático. Roselli et al. evaluaron el efecto del NPS (0,25 a 2,5 mM) y la S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP, 0,012 a 0,6 mM) sobre la movilidad celular, evidenciando un aumento de los espermatozoides inmóviles de manera dependiente de la concentración y una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides muertos. Además, lograron comprobar que la inhibición de ON mediante NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) conserva la movilidad y la viabilidad⁵². Por su parte, Weinberg et al. reportaron que el ON reduce el desplazamiento de los espermatozoides, quizás por un mecanismo que implica la inhibición de la respiración celular independiente de una elevación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) intracelular. La exposición de los espermatozoides con NPS (1 mM), linsidomina (100 a 125 μM) y ON puro (25 a 125 μM) indujo la inhibición de la movilidad de forma dependiente de la dosis. Lo contrario ocurrió con la exposición a los agentes que elevan el GMPc³⁸.

A partir de estos resultados discordantes sobre el papel fisiológico del ON en el movimiento del espermatozoide se realizaron otros interesantes estudios³⁴⁻⁵⁶. Por ejemplo, Nobunaga et al. trataron muestras de semen de 108 individuos infértiles y 15 hombres fértiles con NPS (10 μM) en presencia o ausencia de oxihemoglobina y observaron que en los individuos infértiles las concentraciones de nitrito (NO₂), un producto final del ON, fueron mayores, especialmente en las muestras seminales con leucocitos. Además, observaron una correlación negativa entre los niveles de NO₂ y el movimiento espermático, y propusieron las elevadas concentraciones de ON como una posible causa de astenozoospermia⁵³. De manera similar, en 2006, Amiri et al. ratificaron las conclusiones anteriores en ausencia de donantes de ON: en las muestras seminales de los pacientes infértiles, la producción de ON fue mayor (5,47 ± 1,01 μmol/l) que en el grupo control (3,88 ± 0,53 μmol/l), lo que corrobora el efecto perjudicial sobre la movilidad y la viabilidad en hombres infértiles. Sin embargo, no se encontró relación entre la presencia de leucocitos y la concentración de ON⁵⁴.

Continuando con los experimentos en pacientes astenozoospermicos, Zhang et al. investigaron los efectos de NPS en diferentes concentraciones (25-400 nM). La concentración de 100 nM fue más efectiva para la conservación de la movilidad, la viabilidad, la reducción de la lipoperoxidación y el aumento del GMPc, tanto en muestras de semen de hombres fértiles como infértiles. El efecto contrario fue observado con las concentraciones más altas (200-400 nM), por lo tanto, el movimiento de los espermatozoides puede ser mediado por la reducción de la lipoperoxidación y el aumento de GMPc, lo que señala al ON como una molécula relevante en el tratamiento de los individuos astenozoospermicos⁵⁵.

Adicionalmente, se ha estudiado la implicación del ON con algunas alteraciones médicas reproductivas como el varicocele: se ha descubierto en el plasma seminal de voluntarios con varicocele mayor concentración de ON en comparación con los controles, concentración que repercute negativamente sobre la movilidad, la morfología y la concentración espermática. Es importante resaltar que dentro del grupo de pacientes con varicocele, los niveles de ON fueron similares en los individuos oligozoospermicos (32 $\mu\text{mol/l}$) y astenozoospermicos (30,15 $\mu\text{mol/l}$), lo que asocia el aumento de ON con una posible causa de daño en los espermatozoides de hombres con varicocele⁵⁶. Incluso las concentraciones de ON en el plasma seminal de hombres infértiles antes de la varicolectomía fueron más altas que después del procedimiento quirúrgico. Esto permite argumentar que el ON serviría junto con otros parámetros seminales para evaluar a hombres con varicocele y aplicar una posible respuesta terapéutica⁵⁷.

De otro lado, Lewis et al. analizaron el comportamiento del ON endógeno y demostraron que los espermatozoides poseen las enzimas ONSe y ONSn debido a las concentraciones basales de ON encontradas en el plasma seminal sin ninguna estimulación (1,6-2,9 $\mu\text{mol}/10^6$ espermatozoides viables). Esta enzima se localiza en la cabeza y en la pieza intermedia de los espermatozoides y regula la movilidad de manera autocrina. Además, evidenciaron que en los espermatozoides de hombres astenozoospermicos, en comparación con hombres normozoospermicos, la expresión de ONSe y ONSn y la concentración de ON eran más bajas, lo que justifica que el ON puede mejorar o preservar la movilidad espermática. No obstante, en presencia de FNT- α , la concentración de NO_2^- fue menor en muestras de individuos normozoospermicos, aunque la viabilidad de los espermatozoides no se redujo en presencia de FNT- α y L-NAME⁹.

Posteriormente, el mismo grupo describió la estimulación e inhibición de la enzima ONS, la cual fue activada a través de la estimulación con ionóforo de calcio en espermatozoides seleccionados mediante la técnica de *swim-up*. Los resultados indicaron que existe un aumento del ON basal en los espermatozoides provenientes de hombres normozoospermicos en comparación con astenozoospermicos y que la estimulación con ionóforo de calcio produce un aumento del ON, lo cual es perjudicial para la movilidad, y confirma el papel beneficioso del ON en el desplazamiento del espermatozoide solo en concentraciones basales y la reducción de dicho parámetro al preincubar las muestras seminales con antagonistas competitivos de la ONS (L-NAME, L-NMMA y N-nitro-L-arginina [L-NNA])⁵⁸.

Otro estudio que corrobora la presencia de la ONSe es el presentado por O'Bryan et al., quienes agregan a los trabajos anteriores la localización de la isoenzima en la zona posacrosomal y zona ecuatorial de la cabeza de los espermatozoides morfológicamente normales, mientras que los espermatozoides anormales exhiben una expresión aberrante de la ONSe, lo cual se relacionaba con una alta producción de ON y con la reducción de la movilidad espermática⁵⁹.

La actividad de ONS también está aumentada en pacientes infértiles positivos para anticuerpos antiespermatozoides. Dichos anticuerpos pueden perjudicar la función espermática solo cuando el grado de unión es muy alto (>50%). La infertilidad causada por anticuerpos antiespermatozoides en el plasma seminal puede estar causada por cambios en la enzima acrosomal de los espermatozoides, la superóxido dismutasa (SOD) y la actividad de la ONS⁶⁰.

Sin embargo, es interesante señalar la existencia de una investigación publicada en el 2001 en la cual no se demuestra relación entre la concentración de NO_2^- , la movilidad y la concentración de espermatozoides, ni tampoco, entre los niveles de NO_2^- y los leucocitos en semen, independientemente de la contaminación microbiana. Por otra parte, las concentraciones de nitrito en el plasma seminal de hombres normozoospermicos (17.092 nmol/mL) eran comparables con la concentración de nitrito de los individuos diagnosticados como oligozoospermicos leves (17.006 nmol/mL) y graves (17.243 nmol/mL), lo que postula que los espermatozoides tal vez no son la fuente principal de ON en el plasma seminal, o que puede existir un inhibidor no competitivo insensible al calor, o un producto de la vía metabólica no detectable por la reacción de Griess (prueba indirecta para la detección de ON)⁶¹.

El óxido nítrico y la integridad del ácido desoxirribonucleico

Durante los últimos estadios de la espermatogénesis ocurre un remodelamiento y condensación nuclear⁶², lo cual involucra la sustitución de una gran proporción de las histonas, proteínas encargadas del empaquetamiento de la cromatina en células somáticas, a proteínas de transición nuclear⁶³. Posteriormente, estas son remplazadas por protaminas, un tipo característico de proteínas que favorecen la compactación y la estabilización del núcleo espermático⁶⁴.

Los espermatozoides con ADN fragmentado son normalmente eliminados durante la espermatogénesis, sin embargo, pueden persistir en el eyaculado debido a una falla en el mecanismo de apoptosis⁶⁵ o como resultado de daño oxidativo⁶⁶. El daño en el ADN de los espermatozoides podría resultar en una incapacidad para embarazar a la pareja⁶⁷ o en una anormal fecundación y desarrollo embrionario^{68,69}.

Zini et al. publicaron el primer reporte sobre la expresión de ONSe en el citoplasma de las células de Sertoli y las células de Leydig en todas las etapas de la espermatogénesis, al igual que en los conductos deferentes y el epidídimo. Sin embargo, la enzima estaba ausente en las células germinales normales, pero presente en células germinales apoptóticas⁸. Los datos señalan un papel primordial

de la ONSe en la espermatogénesis y en el daño de las células germinales⁸. No obstante, Roessner et al., en el 2010, encontraron que el aumento de la actividad de ONS se asociaba con madurez de los espermatozoides y la inactivación de señales apoptóticas, que las células presentaban menor porcentaje de fragmentación del ADN y alteración del potencial de la membrana mitocondrial y que las señales apoptóticas fueron correlacionadas negativamente con la producción de ON, por lo cual, el ON podría tener un efecto antiapoptótico de manera fisiológica⁷⁰, pero la generación de ON exógeno en concentraciones altas (NPS > 30 μ M) causaba un incremento en la apoptosis, incluso con la adición de L-NAME (0,7 mM). Por lo tanto, las altas concentraciones de ON podrían estar relacionadas con la infertilidad⁷¹.

Previamente, Amiri et al. evidenciaron correlaciones positivas entre las concentraciones de ON y el daño en el ADN aunque solo para el grupo de individuos infértiles, lo que señala la sobreproducción de ON en el tracto genital de los hombres infértiles como un agente perjudicial en la reducción de la integridad del ADN espermático. Sin embargo, es importante aclarar que seguramente no es el único factor asociado al daño: deben existir otros factores que están, en conjunto, afectando la calidad seminal y, por ende, la fertilidad⁷².

Recientemente, Kavita et al. informaron sobre los altos índices de fragmentación del ADN (IFA $46,12 \pm 12,21\%$) y las altas concentraciones de ON ($7,33 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$), sumados a los bajos niveles de la capacidad antioxidante total (CAT $14,97 \pm 3,97 \text{ mmol trolox Eq/l}$) en pacientes infértiles comparados con hombres fértiles. Los hallazgos demuestran una correlación positiva del ON con el IFA y la morfología anormal. Así mismo, demuestran una correlación negativa con la movilidad y la concentración⁷³. El daño oxidativo al ADN medido mediante la formación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG) en el plasma seminal de hombres diabéticos es elevado ($4,86 \pm 0,67 \text{ pg/mL}$) al igual que las concentraciones de nitrito/nitrato ($6,16 \pm 1,93 \mu\text{M}$) en comparación con los niveles de 8OHdG y nitrito/nitrato del grupo control ($3,75 \pm 0,54 \text{ pg/mL}$ y $4,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$, respectivamente). Sin embargo, no hubo correlación entre las concentraciones de los metabolitos de ON y algunos parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología). En contraste, una correlación positiva fue observada entre la concentración de nitrito/nitrato y la 8OHdG; por lo tanto, el daño celular elevado puede conducir a una baja fertilidad en hombres diabéticos con un análisis seminal normal⁷⁴.

La asociación entre el ON y la infertilidad masculina involucra la participación de polimorfismos en el gen de la ONSe (cromosoma 7q36), como el T786 C (región promotora), que está fuertemente vinculado en los casos de astenozoospermia, oligozoospermia y azoospermia, y afecta la estabilidad del ARN o la interacción del ARN con otras macromoléculas. Igualmente este gen junto con el 4a4b (número variable de repeticiones en tándem, intrón 4) podría contribuir al riesgo de infertilidad masculina en la población asiática y caucásica. Estos polimorfismos pueden influir en la expresión o actividad funcional de la enzima; sin embargo, otros estudios de polimorfismos de la ONSe y sus funciones biológicas son necesarios para comprender el papel en el desarrollo de la infertilidad masculina⁷⁵.

Papel del óxido nítrico en la capacitación espermática

Después de ser depositados en la vagina y durante su viaje hasta el oocito, los espermatozoides sufren una serie de modificaciones celulares y bioquímicas conocidas como capacitación espermática, proceso que les permite adquirir la habilidad para interactuar con la zona pelúcida, fecundar y generar un nuevo individuo⁷⁶.

Zini et al. analizaron los efectos del ON sobre la capacitación, mediante 2 donadores de ON (esperminanonoato y dietilaminanonoato) y observaron un aumento de 2 veces en la capacitación espermática comparada con el control en la concentración de 0,1 mM, mientras que en las concentraciones de 0,3 y 1 mM observaron una reducción de la movilidad espermática. Por otro lado, la incubación de los 2 donadores en combinación con la enzima superóxido dismutasa (SOD) y catalasa por separado no mostró ningún efecto sobre la hiperactivación y la capacitación con SOD. Lo contrario ocurrió con la enzima catalasa, la cual aumentó la hiperactivación en presencia de esperminanonoato, aunque bloqueó la capacitación, lo que demostró que el peróxido de hidrógeno es necesario para la actividad biológica del ON. Los resultados sostienen que los compuestos liberadores de ON están involucrados en la capacitación espermática y se relacionan directamente con el ON, debido a que los productos finales de descomposición como la espermina, la dietilamina, los nitritos y nitratos no influyeron en la capacitación. De otro lado la adición de L-NAME no bloqueó la capacitación espermática inducida por el suero de cordón fetal ultrafiltrado, por lo cual concluyeron que el espermatozoide humano no poseía la enzima⁷⁷.

Sin embargo, en los trabajos posteriores se demuestra la existencia de la ONS en espermatozoides capacitados y la influencia del ON en la modulación del AMPc intracelular. Herrero et al. realizaron la medición de ON con N-metil-D-glucamina ditiocarbamato de sodio (MGD) en presencia de Fe^{+2} para formar el complejo hidrosoluble ($\text{Fe}^{+2}\text{-MGD}_2$), el cual presenta gran afinidad por el ON, y obtuvieron un aumento de señal hasta 8 veces mayor en condiciones capacitantes en forma dependiente del tiempo, mientras en condiciones no capacitantes la producción es baja y constante. También se realizaron experimentos para determinar la influencia del ON en la vía del AMPc intracelular y, por ende, en la capacitación, cuando los espermatozoides se incubaron en solución *tyrode* suplementada con albúmina sérica bovina y compuestos liberadores de ON: las concentraciones de AMPc intracelular fueron más elevadas que cuando los espermatozoides eran incubados sin donadores de ON, sumado a una reducción de la concentración de AMPc en los espermatozoides en presencia de antagonistas competitivos, L-NAME y L-NMMA.

La concentración de AMPc intracelular en espermatozoides aumentó cuando eran incubados con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), un inhibidor de las enzimas fosfodiesterasas, y fue aún mayor la concentración en presencia de IBMX combinado con compuestos liberadores de ON. Estos resultados indirectamente señalan que el ON aumenta los niveles de AMPc espermático, probablemente por la modulación de la actividad de adenilato ciclasa⁷⁸.

Durante la capacitación, el ON regula específicamente la doble fosforilación de los motivos de treonina, glutamato y tirosina en las proteínas de 80 y 105 kDa del espermatozoide sin la mediación del anión superóxido o del peróxido de hidrógeno. La adición exógena de estos 2 radicales no afectó los niveles de fosforilación bajo condiciones de capacitación, pero el ON generado por esperminanonoato incrementó significativamente la fosforilación ($11,5 \pm 0,8$ vs. $4,5 \pm 0,3\%$), al igual que la L-arginina que, además, invertía el proceso inhibitorio de la L-NAME sobre la fosforilación⁷⁹. Sin embargo, el ON no es un importante inductor de S- glutationilación: los niveles mostrados en los espermatozoides tratados con un liberador de óxido nítrico (0,1-1 mM) fueron similares a los del control y nunca superiores a los generados con peróxido de hidrógeno (0,25 mM)⁸⁰.

Wang et al. encuentran que los espermatozoides del grupo de hombres con parámetros seminales alterados comparados con el control necesitaban un tiempo basal más largo para alcanzar la concentración apropiada de ON para la capacitación *in vitro* y tenían un menor porcentaje de viabilidad y movilidad progresiva. Adicionalmente, en experimentos de muestras de semen con parámetros seminales anormales a las cuales se les agregaban SNP y L-NMMA de forma controlada y en función del tiempo, se logró observar un aumento en el porcentaje de espermatozoides progresivos, además de mejorar la capacitación espermática⁸¹.

El óxido nítrico y las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos celulares que poseen una morfología heterogénea y cantidad diversa de acuerdo con el estado funcional y el tipo de célula en que se encuentren⁸². En los espermatozoides, la funcionalidad de las mitocondrias está asociada positivamente con la movilidad, la viabilidad, la capacitación, la reacción acrosomal, la integridad de la cromatina y el potencial de fecundación⁸³.

El ON está involucrado en la hiperpolarización de la membrana mitocondrial⁸⁴, donde los altos niveles de ON conducen a un aumento de la expresión de componentes de la cadena transportadora de electrones (CTE) que se correlaciona positivamente con la movilidad espermática⁸⁵.

De otro lado, el peroxinitrito disminuye el potencial de membrana mitocondrial entre 0,2 y 1 mmol e inhibe la mayoría de los componentes de la CTE, debido a que causa oxidación de la cisteína, la nitración de tirosina y daño a las proteínas hierro-azufre, por lo cual la inhabilitación de la CTE podría estar implicada en el decrecimiento del potencial de la membrana mitocondrial⁸⁶.

El óxido nítrico y la reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es un proceso especializado de fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática, que produce la liberación de enzimas almacenadas en esta vesícula y la exposición de la membrana acrosomal interna. Los anteriores mecanismos facilitan la adherencia del espermatozoide al oocito⁸⁷.

El ON está involucrado en la habilidad del espermatozoide de fusionarse con el oocito, pero no tiene ningún efecto en la adhesión a la zona pelúcida. La incubación con

diferentes concentraciones de L-NAME inhibió la fusión del espermatozoide con el oolema de manera dependiente de la dosis, condición restablecida con la adición de L-arginina⁸⁸. En contraste, Sengoku et al. observaron que el tratamiento de espermatozoides con bajas concentraciones de NPS (10^{-7} y 10^{-8} M) en medio capacitante presentaba un mayor número de espermatozoides adheridos a la hemizona comparado con los espermatozoides expuestos a 10^{-5} M de NPS, sin mostrar un efecto dependiente de la dosis, mientras que, en la prueba de penetración a los oocitos de hámster libres de zona pelúcida, no se observaron diferencias⁸⁹.

De otro lado, la reacción acrosomal de los espermatozoides inducida por fluido folicular disminuye significativamente con la administración de L-canavanina y de hemoglobina. Así mismo, la incubación con compuestos liberadores de ON aumenta el porcentaje de espermatozoides reactivos sin afectar la movilidad y la viabilidad, y la incubación de NPS aumentó el porcentaje de espermatozoides reactivos, con un mayor número en la concentración de $10 \mu\text{M}$ ⁹⁰.

La RA inducida por ON requiere la presencia de calcio extracelular y es mediada por la síntesis de GMPc y la activación de las proteínas cinasas G y C, debido a que la incubación de los espermatozoides con NPS ($100 \mu\text{M}$) aumenta el nivel de GMPc intracelular y el porcentaje de células positivas para la RA que, a su vez, es reducida por un inhibidor de guanilato ciclasa⁹¹.

Conclusiones

La comprensión de los mecanismos moleculares del ON en los procesos reproductivos posibilitará la intervención y tratamiento de la infertilidad masculina, una enfermedad que tiene múltiples causas y de la que, quizás, un protagonista central sea el ON, debido a que los bajos niveles mantienen las condiciones necesarias para el buen funcionamiento del espermatozoide y la normalidad en los procesos reproductivos, mientras que las concentraciones altas repercuten en una baja calidad seminal. Estos efectos son dependientes del tiempo de acción y de la concentración del gas, y también de la capacidad antioxidante de la célula, que altera los parámetros espermáticos convencionales y funcionales.

La conducta dual del ON permitirá su utilización como un biomarcador de la infertilidad y blanco terapéutico mediante la inhibición o estimulación de la ONS según el trastorno reproductivo específico, aunque aún falta por describir de forma detallada los procesos de señalización celular en las cuales el ON interviene, la concentración límite que define su papel y la relación entre factores externos y el comportamiento del gas a nivel reproductivo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Estrategia de Sostenibilidad de la Universidad de Antioquia y al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI, 2014-862) de la Universidad de Antioquia.

CQQ fue joven investigadora de la Universidad de Antioquia.

Bibliografía

- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:9265-9.
- Twort CHC, van Breemen C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of calcium by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1988;62:961-4.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-6.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 1991;351:714-8.
- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992;267:14519-22.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:6348-52.
- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Repr*. 1996;55:935-41.
- Lewis SEM, Donnelly ET, Sterling ESL, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: Evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod*. 1996;2:873-8.
- Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H, Shimamura K, Nakamura Y, et al. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod*. 1996;11:2484-7.
- Telfer JF, Lyall F, Norman JE, Cameron IT. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum Reprod*. 1995;10:19-23.
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:3491-5.
- Recoquillon S, Carusio N, Lagrue-Lakhal A-H, Tual-Chalot S, Filippelli A, Andriantsitohaina R, et al. Interaction in endothelium of non-muscular myosin light-chain kinase and the NF- κ B pathway is critical to lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity. *Clin Sci*. 2015;129:687-98.
- Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, et al. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med*. 1992;176:261-4.
- Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Minakata Y, Kikuchi T, Morishita Y, et al. TLR3 activation augments matrix metalloproteinase production through reactive nitrogen species generation in human lung fibroblasts. *J Immunol*. 2014;192:4977-88.
- Kapral M, Wawszczyk J, Sośnicki S, Węglarz L. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase expression by inositol hexaphosphate in human colon cancer cells. *Acta Pol Pharm*. 2015;72:705-11.
- Mohsenzadegan M, Fayazi MR, Abdolmaleki M, Bakhshayesh M, Seif F, Mousavizadeh K. Direct immunomodulatory influence of IFN-beta on human astrocytoma cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37:214-9.
- Zhang H, Li ZL, Ye SB, Ouyang LY, Chen YS, He J, et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell proliferation in human extranodal NK/T cell lymphoma: A novel prognostic indicator. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64:1587-99.
- Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology*. 2000;32:770-8.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;2:1057-8.
- Curran RD, Billiar TR, Stueh DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med*. 1989;170:1769-74.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*. 1995;96:2357-63.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 1992;51:1219-22.
- Hoffman RA, Langreth JM, Billiar TR, Curran RD, Simmons RL. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol*. 1990;145:2220-6.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 1991;7:615-24.
- Magrinat G, Mason SN, Shami PJ, Weinberg JB. Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression. *Blood*. 1992;80:1880-4.
- Welch C, Watson ME, Poth M, Hong T, Francis GL. Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis. *Metabolism*. 1995;44:234-8.
- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;170:843-50.
- Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, Saenz de Tejada I. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest*. 1991;88:112-8.
- Pickard RS, Powell PH, Zar MA. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1991;104:755-9.
- Holmquist F, Hedlund H, Andersson KE. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J Physiol*. 1992;449:295-311.
- Vignini A, Turi A, Giannubilo SR, Pescosolido D, Scognamiglio P, Zanconi S, et al. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: The relationship to embryo grading. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;277:229-32.
- Bergandi L, Basso G, Evangelista F, Canosa S, Dalmaso P, Aldieri E, et al. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reprod Sci*. 2014;21:1370-7.
- Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Letters*. 1995;360:291-3.

35. Valenti S, Cuttica CM, Fazzuoli L, Giordano G, Giusti M. Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. *Int J Androl.* 1999;22:336-41.
36. Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, et al. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J Androl.* 2004;25:245-9.
37. Lefievre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WC, et al. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: an alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics.* 2007;7:3066-84.
38. Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney AF. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril.* 1995;64:408-13.
39. Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 1992;281 Pt 2:419-24.
40. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: 2 distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:7162-6.
41. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991;266:4244-50.
42. Inoue S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Letters.* 1995;371:86-8.
43. Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide.* 2006;14:109-21.
44. Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308:89-95.
45. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288:481-7.
46. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-5.
47. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:518-23.
48. Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, Obayashi S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 1995;115:1001-4.
49. Masuda H, Tsujii T, Okuno T, Kihara K, Goto M, Azuma H. Accumulated endogenous NOS inhibitors, decreased NOS activity, and impaired cavernosal relaxation with ischemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* [Internet]. 2002;282:R1730-8.
50. Cardona W, Cadavid A. Complementariedad intergametos: breve revisión. *Arch Esp Urol.* 2004;10:1107-12.
51. Hellstrom WJ, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril.* 1994;61:1117-22.
52. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod.* 1995;10:1786-90.
53. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kubota Y, Sawai K, Kimura T, et al. Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: Nitric oxide inhibits sperm motility. *Am J Reprod Immunol.* 1996;36:193-7.
54. Amiri I, Sheike N, Nafaji R. Nitric oxide level in seminal plasma of fertile and infertile males and its correlation with sperm parameters. *J Pharmacol Sci.* 2006;14:197-202.
55. Zhang H, Zheng RL. Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free Radic Res.* 1996;25:347-54.
56. Aksoy H, Aksoy Y, Özbey I, Altuntas I, Akçay F. The relationship between varicocele and semen nitric oxide concentrations. *Urol Res.* 2000;28:357-9.
57. Keyhan H, Dadvar A, Ansari M, Rafiee K. Comparison of before and after varicocelectomy levels of nitric oxide in seminal fluid of infertile men. *Nephrourol.* 2012;4:629-32.
58. Donnelly ET, Lewis SE, Thompson W, Chakravarthy U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:755-62.
59. O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil Steril.* 1998;70:1143-7.
60. Zhao Y, Zhao E, Zhang C, Zhang H. Study of the changes of acrosomal enzyme: Nitric oxide synthase, and superoxide dismutase of infertile patients with positive antisperm antibody in seminal plasma. *Cell Biochem Biophys.* 2015;73:639-42.
61. Revelli A, Bergandi L, Massobrio M, Lindblom B, Bosia A, Ghigo D. The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration, sperm motility, leukocytospermia, or sperm culture. *Fertil Steril.* 2001;76:496-500.
62. Zini A, Gabriel MS, Zhang X. The histone to protamine ratio in human spermatozoa: Comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril.* 2007;87:217-9.
63. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod.* 2005;20:1298-306.
64. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:25-94.
65. Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod.* 2004;19:607-10.
66. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl.* 1999;20:718-23.
67. Mayorga-Torres BJM, Cardona-Maya W, Cadavid Á, Camargo M. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol Esp.* 2013;37:221-7.
68. Rodríguez E, Gil-villa AM, Aguirre-acevedo DC. Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia. *Biomédica.* 2011;31:100-7.
69. Gil Villa AM, Cardona Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: Do antioxidants have any effect? *Fertil Steril.* 2009;92:565-71.
70. Roessner C, Paasch U, Glander HJ, Grunewald S. Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia.* 2010;42:132-7.
71. Lampiao F, Huussen J, Plessis SD. Effects of nitric oxide exposure on human sperm function and apoptosis markers. *Open Reprod Sci J.* 2014:17-20.
72. Amiri I, Sheikh N, Najafi R. Nitric oxide level in seminal plasma and its relation with sperm DNA damages. *Iran Biomed J.* 2007;11:259-64.
73. Kavita M, Badade Z, Narshetty J, Sabrani M. Association of Sperm DNA Integrity and Nitric Oxide in Infertile Men With Abnormal Semen Quality. *Indian J Appl Res.* 2015;5:758-60.
74. Amiri I, Karimi J, Piri H, Goodarzi MT, Tavilani H, Khodadadi I, et al. Association between nitric oxide and

- 8-hydroxydeoxyguanosine levels in semen of diabetic men. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57:292–5.
75. Chang J, Pan F, Tang Q, Wu W, Chen M, Lu C, et al. eNOS gene T786C, G894T and 4a4b polymorphisms and male infertility susceptibility: A meta-analysis. *Andrologia*. 2016;(April):1–9.
 76. Du Plessis SS, Page C, Franken DR. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation. *Andrologia*. 2001;33:337–42.
 77. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl*. 1995;16:424–31.
 78. Belen Herrero M, Chatterjee S, Lefievre L, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:522–36.
 79. Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Repr*. 2003;68:1291–8.
 80. Morielli T, O'Flaherty C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*. 2015;149:113–23.
 81. Wang J, He Q, Yan X, Cai Y, Chen J. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility in vitro. *Biol Res*. 2014;47:44.
 82. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J*. 2002;21:1616–27.
 83. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrin P, et al. Not all sperm are equal: Functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One*. 2011;6:e18112.
 84. Mishra DP, Shaha C. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: Role of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 2005;280:6181–96.
 85. Otasevic V, Korac A, Vucetic M, Macanovic B, Garalejic E, Ivanovic-Burmazovic I, et al. Is manganese (II) pentaazamacrocyclic superoxide dismutase mimic beneficial for human sperm mitochondria function and motility? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:170–8.
 86. Uribe P, Boguen R, Treulen F, Sanchez R, Villegas JV. Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2015;21:237–43.
 87. Cardona Maya WD, Olivera Angela M, Cadavid Agela P. Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Arch Esp Urol*. 2006;59:501–10.
 88. Francavilla F, Santucci R, Macerola B, Ruvolo G, Romano R. Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol Repr*. 2000;63:425–9.
 89. Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1998;69:522–7.
 90. Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, et al. Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: A possible role for NO in acrosomal reaction. *J Cell Physiol*. 1999;178:85–92.
 91. Revelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti S, Bosia A, et al. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Repr*. 2001;64:1708–12.