

Capacidad antioxidante, lipoperoxidación y calidad seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos

Luis Óscar González Bustamante¹, Raquel Retana Ugalde² y Elia Roldán Reyes¹

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, L-2 PA1; Unidad de investigación en Gerontología, L-6, PA2

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ).

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad de México, CDMX; México

luis21.06.LG@gmail.com. [retanara, eliar]@unam.mx

Abstract— At low concentrations, free radicals play an important role in biological processes of great importance. When these concentrations are in excess, coupled with a deficient antioxidant system can cause potential damages to the cell. The present study shows the relationship between seminal quality, antioxidants in seminal fluid and lipoperoxidation of human sperm membrane. Seminal quality of 43 individuals was evaluated, 25 samples with good seminal quality and 18 samples with poor seminal quality, between 18 and 35 years old. The degree of lipoperoxidation of the spermatid membranes and the antioxidant capacity of the seminal fluid were determined by spectrophotometry. The concentrations of malondialdehyde and total antioxidants in both groups of donors showed no significant differences.

Keyword— *Total antioxidants, seminal quality, spermatobioscopy, human spermatozoa, malondialdehyde.*

Resumen— En concentraciones bajas, los radicales libres juegan un papel relevante en procesos biológicos de gran importancia. Cuando estas concentraciones se encuentran en exceso, aunado a un sistema antioxidante deficiente puede ocasionar daños potenciales a la célula. El presente estudio muestra la relación entre calidad seminal, antioxidantes en plasma seminal y lipoperoxidación de la membrana del espermatozoide humano. Se evaluó la calidad seminal de 43 individuos, 25 con buena calidad seminal y 18 con mala calidad seminal, de edades entre 18 y 35 años. El grado de lipoperoxidación de las membranas espermáticas y la capacidad antioxidante del líquido seminal se determinaron mediante espectrofotometría. Las concentraciones de malondialdehído y de antioxidantes totales en ambos grupos de donadores no mostraron diferencias significativas.

Palabras claves— *antioxidantes totales, calidad seminal, espermatobioscopia, espermatozoide humano, malondialdehído.*

I. INTRODUCCIÓN

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis, sus componentes principales son la cabeza, la pieza media y el flagelo. En la cabeza se encuentra el núcleo, el cual contiene a la cromatina altamente condensada y está limitada anteriormente por el acrosoma, que favorecerá la unión con el ovocito. En la pieza media se encuentra el axonema y rodeando a éste se encuentra la capa de mitocondrias, maquinaria encargada principalmente de la generación de energía.

El espermatozoide, al igual que otras células, obtiene energía por medio del metabolismo aeróbico, el cual se lleva a cabo dentro de la mitocondria donde se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) y algunos radicales libres (RL), que pueden ser potencialmente dañinos para la misma célula. No obstante, se ha comprobado que a condiciones fisiológicas son de gran importancia para la adquisición de la capacidad fertilizante y están relacionadas con procesos de señalización celular [[1], [2], [3], [4], [19]].

En el líquido seminal, las ERO se producen por diversas razones: por espermatozoides inmóviles o con problemas de movilidad, leucocitos, y, por espermatozoides normales morfológicamente pero funcionalmente anormales [[5]].

Las ERO pueden alterar, reversible o irreversiblemente, al espermatozoide. Se ha postulado que el aumento de las ERO y la disminución de las defensas antioxidantes inducen daño a las proteínas, incluyendo al ADN, carbohidratos y los lípidos presentes en la membranas de los espermatozoides, causándole disminución en la movilidad, viabilidad y alteraciones en la pieza intermedia, los cuales finalmente producen cambios funcionales en las células espermáticas [[6],[6]].

Cuando hay un desequilibrio entre la generación de ERO y la capacidad de un sistema biológico de desintoxicar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante se dice que hay estrés oxidativo (EOx) [[7], [19]].

El estrés oxidativo puede originar daños o deformidades a los espermatozoides y eventualmente infertilidad masculina. Entre estos daños, se registran la peroxidación lipídica a la membrana espermática. El proceso de lipoperoxidación consiste en el ataque de radicales libres a lípidos insaturados, dando como resultado una reacción en cadena que finaliza en la formación de productos lipídicos: alcoholes lipídicos, aldehídos, o pequeños fragmentos como el malondialdehído (MDA) [[5]]. La membrana del espermatozoide humano contiene una elevada proporción de ácidos grasos poli-insaturados, por lo tanto su susceptibilidad a la peroxidación lipídica es muy elevada [[7]]. En el presente estudio se evaluó la calidad seminal, el nivel de lipoperoxidación de la membrana espermática y la capacidad antioxidante del plasma seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos con el objetivo de hallar la relación entre la calidad seminal de individuos clínicamente sanos con los niveles de MDA, así como de la capacidad antioxidante del plasma seminal.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron 43 muestras, 25 con buena calidad seminal (NL) y 18 con mala calidad seminal (NN), de individuos clínicamente sanos de edades entre 18 y 35 años. Los donadores llenaron un cuestionario en el cual se les pidió que proporcionaran información acerca de su estado de salud, hábitos alimenticios, estilo de vida, se aplicaron criterios de inclusión y exclusión. Los criterios de exclusión para la selección de los donadores, tales como: no padecer cáncer, no presentar vasectomía, no estar bajo algún tratamiento médico, quimioterapia o radioterapia, no presentar enfermedades hormonales o endócrinas. Algunos criterios de inclusión como: estar dentro del rango de edad establecido, tener de 3 a 5 días de abstinencia sexual.

El análisis seminal se realizó siguiendo los lineamientos previamente establecidos por la Organización Mundial de la Salud en 1999 [[9]], mediante el cual se evaluaron los parámetros físicos: apariencia (color), olor, licuefacción, viscosidad o consistencia, volumen y pH; así como los parámetros citológicos: concentración de espermatozoides (densidad), la movilidad (progresión o motilidad), la viabilidad (vitalidad) espermática, morfología y células redondas. De acuerdo al manual de la OMS, los parámetros determinantes de la calidad seminal son densidad y morfología. En las espermatobioscopías ambos parámetros deben de cumplir con los valores establecidos por el manual, de no ser así, la muestras seminal se considera de mala calidad.

Los donadores dieron su consentimiento informado para el aprovechamiento de la muestra, con fines solo de investigación.

Una vez realizada la espermatobioscopia, las muestras seminales fueron almacenadas en un congelador a -20°C hasta su utilización. Cuando la muestra se utilizó para las siguientes pruebas, se descongeló a temperatura ambiente (25°C aproximadamente).

Para la determinación de lipoperoxidación por TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), se utilizó el método descrito por Jentzsch [[10]]. La muestra seminal, una vez descongelada, se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm, con el propósito de obtener únicamente el plasma seminal libre de espermatozoides. Se trataron 400 μl de plasma seminal con ácido tiobarbitúrico (TBA); en la

reacción el MDA reacciona con TBA, produciendo un pigmento rosado. Se midió la absorbancia a 535 nm y 572 nm, obteniendo el delta de ambas lecturas. La concentración de ácido tiobarbitúrico que reacciona se calculó por medio de una curva estándar de MDA, generada con un estándar de 1, 1, 3,3-Tetrametoxipropano (TMP), de la cual se obtuvo una recta de calibración [[11]].

La concentración de los antioxidantes totales (total antioxidant status o TAS) del líquido seminal se realizó con ayuda de un analizador químico automático SELECTRA JUNIOR. Se utilizó un kit Randox® (Cat No. NX2332, Randox laboratories, Ltd, Crumlin, UK). Se utilizaron 300 µl de plasma seminal que, al igual que en la determinación de MDA, la alícuota estuvo libre de células espermáticas.

Se aplicó una prueba U de Mann-Whitney *($p < 0,05$.) para observar si existen diferencias de MDA y TAS entre los donadores estándares y no estándares. Así como un análisis de componentes principales (ACP) para poder relacionar todas las variables (densidad espermática, morfología del espermatozoide, niveles de malondialdehído y capacidad antioxidante del plasma seminal), utilizando el software Statgraphics Centurion 16.1.11.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. *Espermatobioscopías.*

En la tabla 1 se muestran los resultados (media, error estándar y diferencias significativas) del volumen, pH y de los cuatro valores citológicos, así como del conteo de células redondas que se realizaron en la espermatobioscopía tanto de donadores estándares y donadores no estándares. Así mismo se presentan los valores de referencia de la OMS [[9]], los cuales se utilizaron en el estudio.

Tanto el color como la viscosidad son dos de los parámetros físicos cualitativos, es por eso que no se incluyen dentro de la tabla. Los resultados muestran que existe relación entre la calidad seminal de los donadores y los valores de referencia del manual de la OMS, ya que el 58% de las muestras concuerdan con lo establecido.

La densidad promedio mostrada por los donadores estándar (73.31×10^6 espermatozoides por mililitro) está por encima de lo reportado por Axelsson, Rylander, Rignell-Hydbom y Giwercman [[12]]. Mendiola, Jorgensen, Miguez-Alarcon, Sarabia-Cos y Lopez-Espin [[13]], reportaron 71 y 52.1×10^6 /ml, respectivamente. Sin embargo, Rao et al., en 2015, reportaron en sujetos estándar una media de 148.1×10^6 /ml. Dichos estudios, siguieron los valores de referencia del manual de la OMS [[9]].

Aún con las referencias establecidas por el manual de la OMS y con el aporte de otras investigaciones, es difícil asegurar que nuestros donadores tienen buena calidad seminal, los valores establecidos por la OMS no reflejan con claridad una buena calidad seminal, pues son el promedio de varios análisis seminales que se hace a nivel mundial, es decir, incluye distintos resultados. Cada población tiene diferentes estilos de vida que potencialmente se ve reflejado en la calidad seminal, la cual puede ser afectada por la contaminación, horas de sueño, alimentación. Determinada población puede tener una muy buena calidad seminal y otras no tanto, pero al final todas son promediadas para obtener valores de referencia.

Incluso, si se tuvieran valores de referencia a un nivel más local, México no cuenta con dicho estudio, por tal motivo, se tienen que comparar los resultados obtenidos con los del manual de la OMS, aún si estos últimos incluyen valores seminales más bajos que los obtenidos en nuestro estudio.

Tabla 1. Valores de las espermatobioscopías de sujetos clínicamente sanos.

Valores	NL ($\bar{X} \pm ee$)	NN ($\bar{X} \pm ee$)	Valores de Referencia (OMS, 1999)
Volumen (ml)	3.34 \pm 0.29	3.52 \pm 0.42	2 – 6
pH	7.63	7.32*	7.2 - 7.8
Densidad ($\times 10^6$ esperm/ml)	73.31 \pm 8.34*	107.97 \pm 27.95	20 – 200
Progresión (% rápidos + lentos)	63.63 \pm 3.09	60.94 \pm 4.86	> 50
Viabilidad (% cel. No teñidas)	64.63 \pm 2.48	60.88 \pm 4.21	> 75
Morfología (% formas normales)	28.86 \pm 2.04	14.19 \pm 1.62*	> 15
Células redondas ($\times 10^6$ células/ml)	7.03 \pm 1.40	6.80 \pm 1.60	< 5

B. Antioxidantes totales y malondialdehído.

Las concentraciones de TAS y MDA fueron determinadas en 25 sujetos estándares y en 18 no estándares (tabla 2). No hubo diferencias significativas para las concentraciones de TAS y MDA en ambos grupos de donadores.

Tabla 2. Concentraciones de malondialdehído y antioxidantes totales en sujetos clínicamente sanos.

Concentración ($\mu\text{mol/l}$)	NL ($\bar{X} \pm ee$)	NN ($\bar{X} \pm ee$)	Referencia en plasma sanguíneo ($\mu\text{mol/l}$)
MDA	0.23 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01	0.33
TAS	1.81 \pm 0.06	2.0 \pm 0.09	0.5 - 1.4

C. Relación TAS-MDA y espermatoescopía

Con el fin de establecer la relación entre la calidad seminal y la concentración de MDA y antioxidantes totales, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), donde se estableció la relación entre 6 variables: densidad, morfología, viabilidad, progresión, antioxidantes, malondialdehído y de los 43 donadores. Las variables se agruparon en 6 componentes. El propósito del análisis es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. En la tabla 3 se muestran los pesos de cada componente elegido. En cada uno de los componentes, se pueden apreciar las relaciones directa e inversamente proporcional de cada una de las variables.

Tabla 3. Pesos de los componentes principales de las muestras seminales.

Variables	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Densidad	0.0376353	0.183006	0.572293
Morfología	-0.452181	0.49703	-0.0346051
Viabilidad	0.634416	0.297976	-0.231199
Progresión	0.48813	0.530287	0.15578
TAS	0.391414	-0.584948	0.060825
MDA	0.0125537	-0.0855049	0.768025

En la figura 1, el ACP muestra a cada uno de los donadores representados por círculos; los negros para donadores NL y los círculos naranjas para donadores NN, y se obtiene de la suma de las variables del individuo, y los vectores representan las sumas de las variables en el grupo total de individuos. Los ángulos de los vectores permiten establecer las relaciones entre las variables, en este caso, los parámetros citológicos, TAS y MDA. Los ángulos de 90° entre las variables indican que éstas no se correlacionaban; los ángulos agudos o menores de 90° indican que la correlación era positiva o directamente proporcional y los ángulos obtusos o mayores de 90° indican una relación negativa o inversamente proporcional; y, cuando el ángulo de la variable y el componente principal seleccionado como eje, es cercano a 90°, la variable no adquiere ningún peso en la correlación con las demás variables.

Se observa que hay una relación directamente proporcional entre: TAS-viabilidad; TAS-MDA; progresión-viabilidad; progresión-densidad; densidad-morfología. Hubo una relación inversamente proporcional entre MDA y morfología, es decir, que a menor MDA hay una mayor o mejor morfología; TAS-morfología; TAS-densidad; MDA-densidad; MDA-progresión; MDA-viabilidad; morfología-viabilidad. Quienes no mostraron tener relación alguna fueron TAS-progresión y morfología-progresión (figura 1).

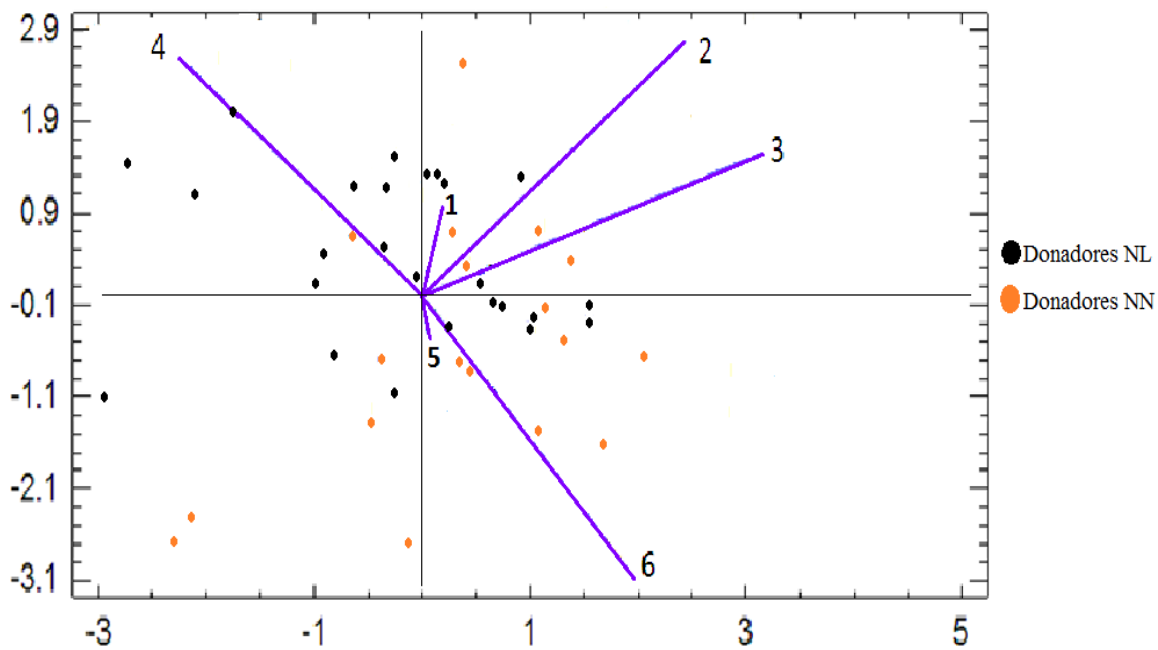


Fig. 1. ACP: 1 densidad, 2 progresión, 3 viabilidad, 4 morfología, 5 MDA, 6 antioxidantes totales.

Tavilani, Mohamad, Vaisi, Salimi y Hassanzadeh [[15]], estudiaron la relación entre la actividad enzimática de SOD, CAT y GPX con la astenozoospermia (baja movilidad espermática), de ahí proponen que la lipoperoxidación podría estar provocando la pérdida en la movilidad de los espermatozoides. Estos autores reportan que los hombres con astenozoospermia no tienen actividad enzimática deficiente, comparados con los normozoospermicos; sin embargo, encontraron un alto contenido de malondialdehído (MDA), en los espermatozoides de individuos astenozoospermicos. Los donadores mostraron una relación inversamente proporcional entre progresión y MDA (a menor MDA, mayor movilidad).

En las muestras de individuos normozoospermicos se encontró una relación inversa entre la actividad enzimática de CAT, GPX y SOD con la producción de MDA, lo que muestra que existe una correlación y coordinación en la actividad de estas tres enzimas para proteger a la célula. Los autores concluyen que bajo condiciones normales las enzimas protegen los espermatozoides de la lipoperoxidación, mientras que cuando hay una patología las enzimas no pueden proteger al espermatozoide adecuadamente, y esto causa lipoperoxidación de la membrana plasmática del espermatozoide [[15]].

De acuerdo con el análisis de componentes principales (figura 1), la relación directamente proporcional de TAS-viabilidad, y viabilidad-progresión, parece concordar. Pues quiere decir que al haber mayor cantidad de antioxidantes, habrá mayor número de espermatozoides vivos y, por ende, mayor cantidad de espermatozoides móviles que eventualmente estarán generando ERO por su actividad metabólica. Se observó que existe una relación inversa entre MDA con densidad.

TAS y MDA muestran una relación directamente proporcional. Cuando el malondialdehído aumenta, los antioxidantes totales aumentan. Los antioxidantes se ven aumentados cuando hay un exceso de radicales libres. Sin embargo, trabajos muestran que existe una correlación negativa entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de MDA, y que esto repercute principalmente en la movilidad espermática, además se ha visto en pacientes con oligoteratozoospermia que la actividad de estas enzimas esta disminuida significativamente [[16], [17]].

Se ha reportado que en patologías como astenozoospermia (baja movilidad espermática), oligozoospermia (baja concentración espermática) y teratozoospermia (deformaciones de los espermatozoides), la actividad de las enzimas SOD y CAT se incrementa sobretodo en oligozoospermicos, comparado con los sujetos normales. En individuos con astenozoospermia la actividad de SOD se vio aumentada comparada con los normales mientras que no se registró actividad de CAT excepto en teratozoospermicos [[18]].

A diferencia los resultados obtenidos, los donadores no mostraron relación entre la concentración de antioxidantes con la movilidad. Morfología y progresión; TAS-densidad; MDA y morfología guardan una relación inversa; se observó que a mejor morfología, hay menor concentración de MDA. Esto es de suponerse, pues al tener una mejor morfología, la membrana espermática y el espermatozoide en general no sufrieron de lipoperoxidación, manteniéndose íntegra la membrana espermática.

IV. CONCLUSIONES

De las 43 muestras seminales analizadas, el 58% fueron estándares, mientras que el 42% resultaron ser no estándares, lo que indica que no importa si se trata de jóvenes clínicamente sanos, siempre hubo la presencia de donadores con mala calidad seminal.

De acuerdo al análisis de componentes principales, a mejor calidad seminal, menor cantidad de MDA y TAS.

Tanto viabilidad como progresión son las variables de mayor peso estadístico, y las que mayor relación directa guardan entre sí.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero de PAPIIT/UNAM clave IN-213013-3. También se agradece especialmente a la Dra. Mirna Ruiz Ramos y a la Dra. Juana Rosado Pérez de la Unidad de Investigación en Gerontología (Lab. 6 p.a.) de la UMIEZ por el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo. Así como al Dr. Justo Salvador Hernández Avilés.

REFERENCIAS

- [1] Agarwal, A., Saleh, R., Bedaiwy, M. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, (79), 829-843.
- [2] Agarwal, A., Prabakaran, S., Sikka, S. (2007). Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series*, (26), 1–12.
- [3] Agarwal A, Makker K, Sharma R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol*, (59), 2-11.
- [4] Makker K., Agarwal, A., Sharma, R. (2009). Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res*, (129), 357-367.
- [5] Jomova, K., Valkob, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Elsevier Ireland Ltd. *Toxicology*, (283), 65–87.
- [6] Koca, Y., Ozdal, O., Celik, M., Unal, S., Balaban, N. (2003). Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch Androl*, (5), 355–359.
- [7] Agarwal, A. (2003). Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility. En S. De Vriese, A. Christophe (Ed.), *Male fertility and lipid metabolism*. (pp.157-183). Champaign, IL USA: AOCS Press.
- [8] Mallok, A., Flores, R., Alonso, C., Martínez, G. (2011). Desbalance redox en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Farm*, (45), 283-296.
- [9] World Health Organization. (1999). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge, U.K. World Health Organization. 4th edition.
- [10] Jentsch, M., Bachman, H., Furst P, Biesalki, K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radicals. Biol Med*, (20), 251-256.
- [11] Mendoza, V., Retana, R. (2009). *Estrés oxidativo e inflamación: Medición e interpretación diagnóstica*. México: DGAPA.
- [12] Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A. 2011. No secular trend over the last decade in sperm counts among Swedish men from the general population. *Hum Reprod*, (26), 1012–1016.
- [13] Mendiola, J., Jorgensen, N., Minguez-Alarcon, L., Sarabia-Cos, L., Lopez-Espin, JJ. 2013. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Androlo*, (1), 408–413.
- [14] Rao, M., Meng, T., Hu, S., Guan, H., Wei, Q., Xia, W., Zhu, C., Xiong, C. 2015. Evaluation of semen quality in 1808 university students, from Wuhan, Central China. *Asian J Androl*, (17), 111–116.
- [15] Tavilani, H., Mohamad, T., Vaisi, A., Salimi, S., Hassanzadeh, T. (2008). Activity of Antioxidant Enzymes in Seminal Plasma and their Relationship with Lipid Peroxidation of Spermatozoa. *Int Braz J Urol*, (34), 485-91.
- [16] Shiva, M., Gautam, A., Verma, Y., Shugotra, V., Doshi, H., Kumar, S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry* (44), 319-324.
- [17] Atig, F., Kerkeni, A., Saad, A., Ajina, M. (2013). Effect of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *J. Asist. Reprod. Genetic*, (30), 1-9.
- [18] Sanocka D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Chelmonska-soyta, A., Kurpisz, M. (1997). Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems in human semen, association with male infertility. *Int J Androl*, (20), 255-264.

- [19] Roldán, E. (2016). Respuestas coordinadas a la toxicidad. En: Introducción a la Toxicología, FESZ-UNAM. Recuperado el 4 de Enero de 2017 de <http://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxico-ago18.pdf>