



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA

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

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

Presenta:

Luis Óscar González Bustamante

Directora de tesis

ELIA ROLDÁN REYES



Ciudad de México, Octubre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **GONZÁLEZ BUSTAMANTE LUIS ÓSCAR**, con número de cuenta **307097013**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **25 de octubre de 2016** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL Dra. ELIA ROLDÁN REYES

SECRETARIO Dra. RAQUEL RETANA UGALDE

SUPLENTE M. en B.E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ

E. Mendieta Márquez

SUPLENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

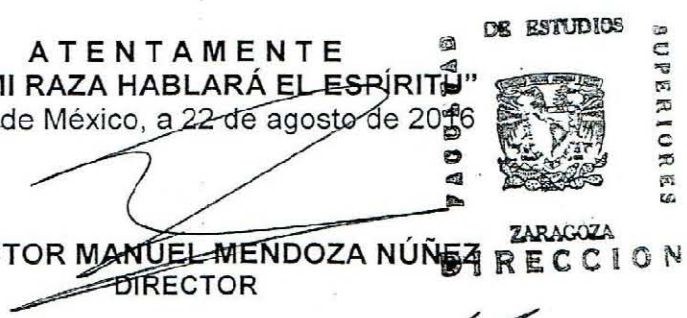
El título de la tesis que presenta es: **Capacidad antioxidante, lipoperoxidación y calidad seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 22 de agosto de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA



Esta tesis se realizó en la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM**, en el Laboratorio de **Citogenética y Mutagénesis (LI-FESZ-350115)** (Lab. 2, planta alta) de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (**UMIEZ**), bajo la dirección de la **Dra. Elia Roldán Reyes**.

Y la asesoría de la **Dra. Raquel Retana Ugalde** de la **Unidad de Investigación en Gerontología** (Lab. 6, planta alta) de la **UMIEZ**.

Agradecemos el apoyo financiero de PAPIIT/UNAM clave IN-213013-3.



¿Este es el fin del principio...o el principio del fin? ¿Estás perdiendo el control o lo estás ganando? ¿Es tu vida real o solo finges?

La reanimación de la secuencia rebobina el futuro al pasado. Para encontrar el origen de la solución, el sistema tiene que ser reparado.

Libera tu mente. Avanza rápido a los secretos de tu alma...tu vida esta sobrecargada

Borra o guarda las unidades que hacen que una entidad...esa es tu identidad

Si no sabes qué camino seguir, puedes estar perdido y confundido; es una segunda oportunidad, no hay tiempo que perder.

La regeneración de tu alma cibersónica está transformando el tiempo y el espacio más allá del control.

Levántate y resiste a ser el dueño de tu destino.
No mires atrás hasta hoy, mañana será demasiado tarde...

No quieres ser un robot fantasma hospedado en un cuerpo humano analizado y clonado implacablemente, sintetizado hasta que ellos te dejen libre.

Black Sabbath. "End of the begining". 13. 2013.



“Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfarán sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir, sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad”.

Louis Pasteur

(1822-1895)

DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado a todas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera y en el proceso de elaboración de la tesis. Principalmente, va dedicado a toda, toda mi familia, que siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas. Dedicada a mis padres y a mis hermanas: Sam, faltas tú, espero algún día logres cosas mucho mejores que yo...Angelita, gracias por ser como un ángel de la guarda, y por eso va dedicada a ti, hasta allá arriba...con todo mi ser...es por ustedes, es para ustedes.

A esas personas que alguna vez los ví como unos extraños y que se convirtieron en mis mejores amigos y en parte fundamental de mi vida.

Dedicada a los amigos que no he visto en muchos años, pero que sé que me desearon la mejor de las suertes...a mi FURIA CANIVAL, con la que inicié mi vida universitaria, los extraño.

También, quiero dedicar esto al BIOCRIKET, a ese equipo que me ha dado valentía y fortaleza. Equipo que a lo largo de este tiempo he vivido experiencias de vida que nos han fortalecido de todas las formas...a ese grupo de inadaptados sociales que sólo yo podría tener de amigos y que, difícilmente, cualquier otra persona en su sano juicio podría entenderlos...

A mis amigos de toda la vida, que no entendían muy bien mis deberes y en varias ocasiones me aparté ellos, pero que al final del día, comprendían que tenía cosas que atender...Lalo, Javier, Ale; ya saben qué onda...



AGRADECIMIENTOS

Creo que no me alcanzarán las palabras, ni esta vida, ni las que vienen para agradecer a todas las personas que hicieron posible que este sueño se volviera realidad; sueño que con el paso del tiempo se convirtió en una obligación, en una meta... y al final, cuando menos me di cuenta, en un objetivo a corto plazo.

A pesar de que en un principio no me emocionó para nada el hecho de dedicarme a la Biología, ya que iba en contra de mis sueños, metas y expectativas que el mundo tenía sobre mí, acepté el reto porque preferí contar una historia que estuviera llena de obstáculos y aventuras, que se caracterizó desde un principio por ser confusa, carente de sentido alguno y hasta difícil, que al final del día pudiera decir que fue todo un reto; contar una historia aburrida y vacía, carente de aventuras.

En primer lugar, agradezco infinitamente a mis padres que me han dado tanto como han podido desde toda la vida, pues siempre han procurado todas mis necesidades, desde la más efímera hasta la más compleja, incluso hasta la más ridícula. Todas esas palabras consejos y ánimos que me han dado me han servido para poder vencer a todos mis demonios y superar mis miedos, los agradezco y de verdad, no saben cuánto me han servido, y me seguirán sirviendo... como ustedes, no hay otros. Doy gracias a la vida por tener a los mejores papás del universo; porque han hecho de mí esto que soy, les he aprendido demasiado, tanto de sus errores como de sus aciertos y eso ha forjado mi personalidad. Obviamente esta tesis también es de ustedes, son parte de ella, ustedes son los autores principales. Ojalá todos los papás del mundo se preocuparan tanto por sus hijos como ustedes lo han hecho por mí, LOS AMO, sé que no se los digo, pero lo demuestro a mi manera, y la única manera que encuentro para decirles el infinito amor, respeto y admiración que siento por ustedes es así, cumpliendo con mis obligaciones y aprovechando todo lo que me dan. Sin ustedes jamás hubiera llegado hasta donde estoy y créanme, sería un completo desastre sin ustedes dos. Espero y haya cumplido con sus expectativas y estén orgullosos de lo que he hecho hasta el día de hoy. Abraham, Itandehui... LOS AMO.

Agradezco a mi familia que de una forma u otra han estado conmigo y me han apoyado en todos los aspectos. En especial a mi abuela Silvana porque, al igual que mis padres, siempre me ha dado todo y ha procurado de mí desde siempre. A mis tías: Mariana y Dolores, tío Raymundo y a mis primos: Gabriel y Michelle.

Agradezco a mis amigos que han estado conmigo gran parte de la carrera y durante este proceso de tesis que fue bastante delicado por todo lo que implicó realizarla. Agradezco infinitamente a ustedes que se volvieron como mis hermanos, gracias por todas esas risas, consejos, enseñanzas... quiera Dios y siempre nos mantenga unidos como hasta ahora y, que de verdad, hicieron que estos últimos años sean hasta ahora, lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias Arturo, Arantza, Alberto, Marino, Aline, Cesar, Raúl, Sebastián, David, Karla... son los mejores.

Ángel, Víctor, César Alfredo, Agustín Alberto, Dieter, Pablo, Saúl, Paty, Sole, Shaid, Tayra; gracias por hacer más amena mi estancia en la facultad... y a mis compañeros de laboratorio: Galo, Gael, Ale, Manuel, por hacer más fácil y divertido el trabajo en laboratorio.



Gracias a todos esos profesores que cambiaron mi visión, que cambiaron mi forma de ver a la vida, de ver a la ciencia, a la Biología. Gracias a la Dra. Bertha, Dra. Lucila, Mtro. Enrique, Dra. Hortensia.



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Gracias al laboratorio de Citogenética y Mutagénesis por abrirme las puertas y darme todo lo necesario desde el primer día en que trabajé ahí. Gracias a la doctora Elia Roldán Reyes por confiar en mí y darme lo necesario para realizar mi tesis, espero y haya cumplido con sus expectativas.

Un agradecimiento especial a la doctora Raquel Retana Ugalde y al laboratorio de Gerontología por permitirme trabajar en sus instalaciones, gracias por los recursos, tanto humanos como materiales que se me proporcionaron a lo largo de mi estancia en su laboratorio. Gracias a la Dra. Juana y a la Dra. Mirna.

Al doctor Justo Salvador Hernández Avilés, gracias por el apoyo brindado en la parte estadística de mi trabajo.

A mis sinodales, por guiarme y ayudarme a mejorar este trabajo, agradezco enormemente por sus observaciones y atenciones brindadas, gracias por aceptar ser parte de mi tesis y por el tiempo dedicado a esto.

Y por último, y no menos importante, gracias a la U.N.A.M. porque hace 10 años, le abrió sus puertas a un chico que lo único que quería era comerse el mundo y llenarse de conocimiento de verdad, por permitir que ése jovencito se bañara de gloria al poder presumir que él estaba en la universidad más importante de México...gracias por darme conocimiento y poder para tratar de cambiar el mundo.



LISTA DE ABREVIATURAS

- ACP:** Análisis de componentes principales
- 2n:** Diploide
- CAT:** Catalasa
- CH₂-:** Metileno
- EOx:** Estrés oxidativo
- ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- FSH:** Hormona folículo estimulante
- GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- GPx:** Glutación peroxidasa
- GSH:** Glutación reducido
- GSSG:** Glutación oxidado
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HNE:** 4-hidroxinonenal
- HO₂•:** Hidroperóxido radical
- L•:** Radical alquílico:
- LH:** Hormona luteinizante
- LOO•:** Peroxil lípido
- LOOH:** Lipoperóxido
- MDA:** Malondialdehído
- n:** Haploide
- NADPH:** Nicotidamina adenina dinucleotido fosfato
- NL:** Donador estándar
- NN:** Donador no estándar
- NO₂⁻:** Ion nitrito



$^1\text{O}_2$: Oxígeno singulete

O_2 : Oxígeno

$\text{O}_2^{\bullet-}$: Anión superóxido

O_3 : Ozono

OH^- : Anión hidróxido

OH^\bullet : Radical hidroxilo

ONOO^- : Peróxido nítrico

RL: Radicales libres

RO^\bullet : Alcohoxilo

RO_2 : Peroxilo

RO_2^\bullet : Alquil peroxil

RS-: Tiol

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico



ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	13
• Espermatogénesis y espermiogénesis	13
• Biología del espermatozoide humano	17
• Generación de ERO en el espermatozoide	18
• Líquido seminal	20
• Espermatobioscopia	21
• Radicales libres y estrés oxidativo	21
• Lipoperoxidación	27
• Antioxidantes	30
• Antioxidantes enzimáticos	31
• Antioxidantes no enzimáticos	35
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
III. HIPÓTESIS	39
IV. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES	39
V. MATERIAL Y MÉTODO	40
• Espermatobioscopias	40
• Determinación de la lipoperoxidación	47
• Capacidad antioxidante	49
• Análisis estadístico	51
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS	52
VII. DISCUSIÓN	65
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. PERSPECTIVAS	77
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78



RESUMEN

El estrés oxidativo (EOx), es el resultado del desequilibrio entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la capacidad de un sistema biológico de eliminar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. 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). Los espermatozoides son muy susceptibles al daño inducido por el estrés oxidativo gracias al alto contenido de lípidos poli-insaturados presentes en su membrana, y una baja o moderada concentración de enzimas antioxidantes en el plasma seminal.

Se determinó la relación entre la calidad seminal de individuos clínicamente sanos con los niveles de MDA, así como la capacidad antioxidante del plasma seminal de 43 individuos aparentemente sanos de edades entre 18 y 35 años, siguiendo los lineamientos de la OMS (1999; 2010). 25 individuos con buena calidad seminal (estándares o NL) y 18 con baja calidad seminal (no estándares o NN). El grado de lipoperoxidación de la membrana espermática y la capacidad antioxidante del líquido seminal se determinaron mediante pruebas colorimétricas. El MDA se determinó con TBA por el método descrito por Jentzsch (1996) y la capacidad antioxidante (TAS) se evaluó con el kit Randox®.

Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para probar si existía diferencia significativa entre las concentraciones de MDA y TAS entre los grupos NL y NN, así como un análisis de componentes principales, para correlacionar las variables de la espermatobioscopia, MDA y TAS.

Las concentraciones de MDA tanto en individuos NL y NN no mostraron diferencias significativas (0.23 ± 0.03 y 0.21 ± 0.02 $\mu\text{mol/l}$ respectivamente, $p \geq 0,05$) Con respecto a los antioxidantes totales, se presentó la misma situación, con valor de 1.81 ± 0.06 y 2.01 ± 0.10 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente, $p > 0,05$. De acuerdo al análisis de componentes principales, MDA-densidad; MDA-morfología guardan una relación inversamente proporcional, al igual que morfología-TAS. No existe relación entre las concentraciones de TAS con la densidad.

Palabras clave: antioxidantes totales, calidad seminal, espermatobioscopia, espermatozoide humano, malondialdehído.



INTRODUCCIÓN

▪ Espermatogénesis y espermiogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo de maduración y diferenciación celular, mediante el cual las células germinales indiferenciadas se transforman en espermatozoides (Karp, 2010; López *et al.*, 2012). La espermatogénesis se produce en el testículo, a nivel de túbulos seminíferos. En el testículo ocurre la producción de hormonas sexuales (esteroidogénesis), que se produce a nivel de tejido intersticial. Ambos procesos están interrelacionados, con el objetivo de conseguir la correcta producción de espermatozoides (López *et al.*, 2012). La espermatogénesis es un proceso continuo que comienza en la pubertad y perdura toda la vida. La duración de un ciclo completo de espermatogénesis es de 60 días en el hombre (Fina, 2014).

La espermatogénesis comienza con la transformación de las espermatogonias ($2n$). Las espermatogonias se encuentran en la base del epitelio y proliferan por mitosis. Existen dos tipos de espermatogonias la tipo A y B. Las espermatogonias tipo A se encargan de dividirse por mitosis y dan origen a espermatogonias tipo B que son las que van a diferenciarse en espermatozoides. Las descendientes de las espermatogonias tipo B son las que entran a la primera división meiótica duplicando su material genético y son los espermatocitos primarios; siendo su material genético $2n$. Cuando se completa la primera división meiótica el resultado son dos espermatocitos secundarios cuyo complemento cromosómico es $1n$. Por cada espermatocito secundario que entra a meiosis II se obtienen dos espermátides, que madurarán para formar espermatozoides (Carlson, 2005), (figura 1) (Toro, 2009).

La espermatogénesis se divide en tres fases:

- a) Fase proliferativa: Se produce la continua repoblación de espermatogonias; son células diploides situadas en la base del tejido germinal.
- b) Fase de maduración: Se lleva a cabo la Meiosis. Es un proceso de división celular en el cual una célula diploide ($2n$) experimenta dos divisiones nucleares y citoplasmáticas sucesivas. La primera conocida como Meiosis I y la segunda



como Meiosis II, generando al final cuatro células $1n$. Previo a la meiosis ocurre un proceso preparatorio similar a la mitosis. Tanto la Meiosis I como la II están a su vez divididas en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase.

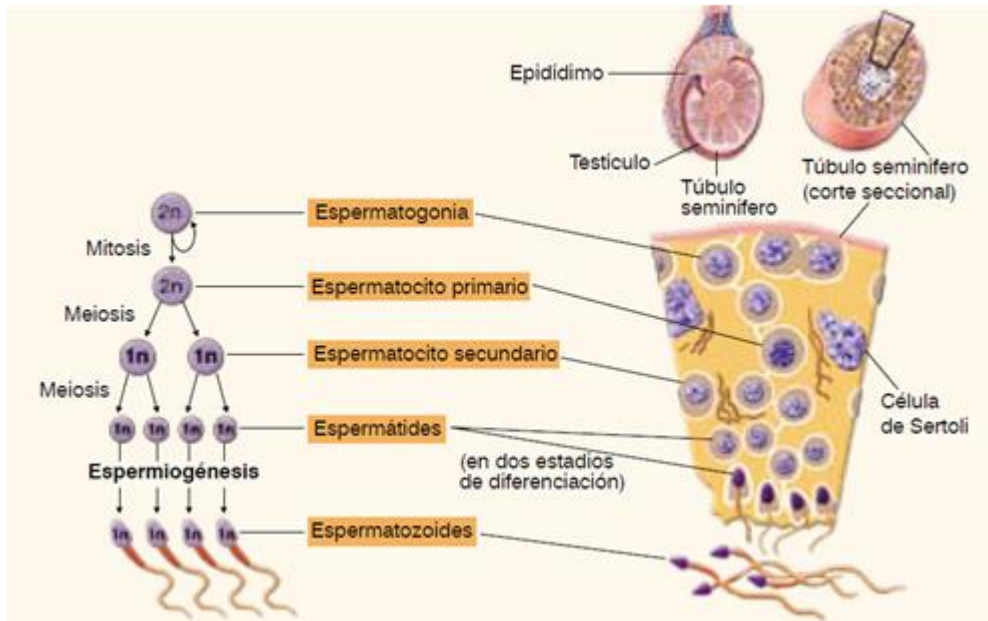


Figura 1. Las espermatogonias se dividen por mitosis para generar los espermatocitos primarios. Los espermatocitos primarios inician su división meiótica para dar origen a dos espermatocitos secundarios, los cuales a su vez se dividen nuevamente por meiosis para generar dos espermátidas. Posteriormente comienzan el proceso de maduración de la espermátide (Espermiogénesis): el citoplasma se reduce, el núcleo se alarga y queda en la cabeza del espermatozoide, las mitocondrias se ubican en el cuello y los centriolos dan origen al flagelo (Toro, 2009).

c) Fase de diferenciación: En ésta fase comienza un proceso de transformación sin división celular conocido como espermiogénesis, donde las espermátidas se transforman en espermatozoides. Durante la espermiogénesis se producen una serie de cambios: desarrollo del acrosoma, desarrollo del flagelo, reorganización del núcleo y reorganización del citoplasma (López *et al.*, 2012; <https://wikis.engrade.com>) (figura 2), el cual puede durar varias semanas y consiste en una serie de eventos (tabla 1) (Toro, 2009).

Al completarse la maduración del espermatozoide, el citoplasma de las células de Sertoli se retracta de alrededor del espermatozoide, liberándolo a la luz de los túbulos. Los espermatozoides dentro de los testículos tienen poca o ninguna movilidad y son incapaces de fertilizar el ovocito, adquieren su funcionalidad sólo



después de atravesar el epidídimo, donde finalizan su proceso de maduración. Ésta etapa tiene una duración de 10 a 15 días (Toro, 2009).

Tabla 1. Eventos que suceden en la espermiogénesis

Formación del acrosoma
Formación del flagelo
Reorganización de las mitocondrias alrededor de la pieza media
Condensación del núcleo al 10% de su tamaño inicial
Pérdida de gran parte del citoplasma

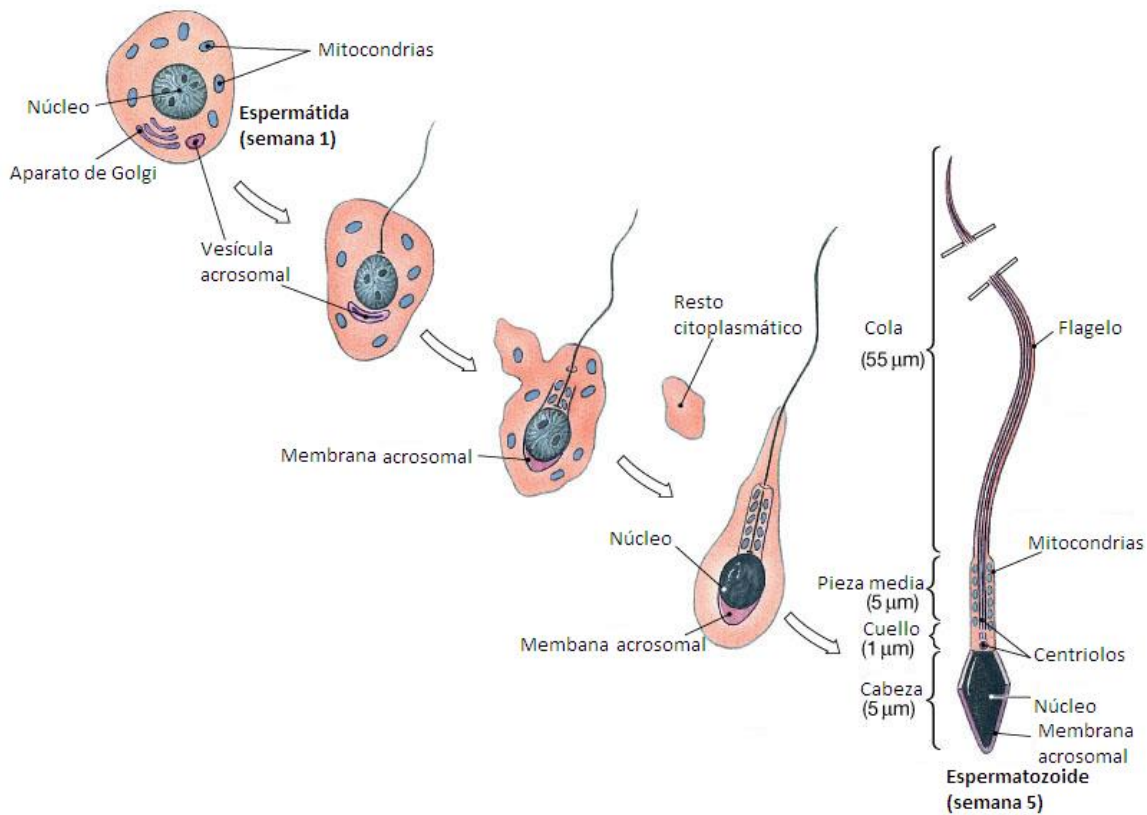


Figura 2. La serie de cambios que experimentan las espermátidas para su transformación en espermatozoides. Se caracteriza por 4 acontecimientos; 1) Formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad anterior de la superficie nuclear; 2) Condensación del núcleo; 3) Formación del cuello, cuerpo y cola del espermatozoide; 4) Eliminación de la mayor parte del citoplasma (modificado de www.studyinukraine.eu).

Una vez terminado el proceso de maduración, el espermatozoide consta de 23 cromosomas (n) y se divide en 3 regiones:



Cabeza: contiene el núcleo 1n cubierto por el acrosoma y un par de centriolos detrás del núcleo. El acrosoma contiene enzimas como la hialuronidasa y la acrosina que facilitan la penetración del espermatozoide al ovocito (Toro, 2009). Es de forma oval al observarla frontalmente, y piriforme cuando la observación es lateral, siendo más gruesa en la base y adelgazando hacia la punta. Su tamaño aproximado oscila entre 3.7 y 4.7 micras de longitud y 2.5 a 3.2 μm de anchura, por 1 a 1.5 μm de espesor. La razón longitud/anchura varía entre 1.3 y 1.8 μm (López *et al.*, 2012).

Pieza media: región que une a la cabeza con la cola y que contiene la carga mitocondrial que provee la energía necesaria (ATP) para la movilidad del espermatozoide (Toro, 2009). Tiene una longitud de 10-12 μm (López *et al.*, 2012).

Flagelo: es una larga estructura filiforme de aproximadamente 50 μm de longitud. Está recubierto por una vaina fibrosa en su primera fracción y luego solo por la membrana flagelar (López *et al.*, 2012). Da la movilidad al espermatozoide (Figura 3) (Eddy, 2005).

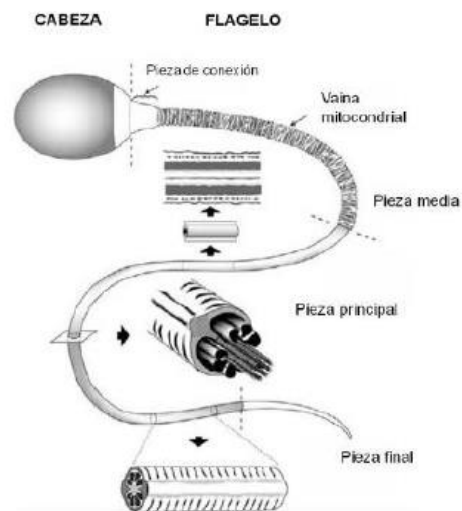


Figura 3. Representación esquemática de un espermatozoide con sus componentes estructurales (Eddy, 2005).



Para que se lleven a cabo éstos dos procesos, primero deben ocurrir ciertos eventos hormonales que permitirán una buena formación, desarrollo del espermatozoide y del semen en general.

- **Biología del espermatozoide humano**

La función testicular no es autónoma, sino que está controlada por el eje hipotálamo hipófisis-testicular (figura 4). En el hipotálamo se segrega la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula la producción hormonal por el lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis): la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Sánchez *et al.*, 2010; Mostaghel, 2014).

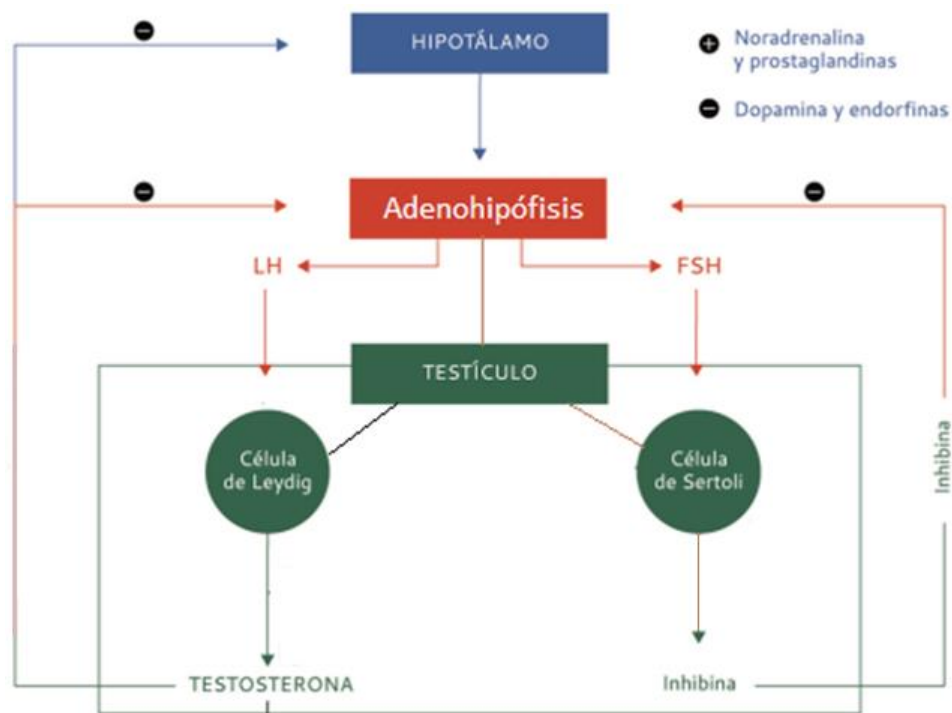


Figura 4. Control del eje hipotálamo-hipófisis-testicular (<http://www.aeu.es>).

La secreción de la GnRH y su ritmo son modulados por numerosos neurotransmisores. Los impulsos alfa-adrenérgicos estimulan la secreción de GnRH. La noradrenalina y las prostaglandinas aumentan la secreción



hipotalámica. Los impulsos beta-adrenérgicos y dopaminérgicos poseen una acción inhibitoria de la secreción de GnRH. Las endorfinas, la testosterona, la progesterona y la prolactina, segregada en situaciones de estrés, disminuyen la secreción de GnRH. La LH estimula la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig, localizada en el intersticio testicular; la FSH estimula la espermatogénesis al actuar sobre las células de Sertoli, localizadas en los túbulos seminíferos (Sánchez *et al.* 2010, Mostaghel, 2014).

La testosterona ejerce un efecto depresor sobre la función hipotalámica e hipofisaria, sobre la producción de gonadotropinas (FSH y LH); la FSH estimula la producción de varias proteínas en las células de Sertoli, como la inhibina, importante para el feedback, que frena o suprime la producción de FSH y así iniciar otra vez el ciclo de control del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Este control hormonal permitirá una adecuada formación del espermatozoide y del líquido seminal (Sánchez *et al.*, 2010; Mostaghel, 2014).

La testosterona ejerce un efecto depresor sobre la función hipotalámica e hipofisaria, sobre la producción de gonadotropinas (FSH y LH); la FSH estimula la producción de varias proteínas en las células de Sertoli, como la inhibina, importante para el feedback, que frena o suprime la producción de FSH y así iniciar otra vez el ciclo de control del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Éste control hormonal permitirá una adecuada formación del espermatozoide y del líquido seminal (Sánchez *et al.*, 2010; Mostaghel, 2014).

▪ **Generación de ERO en el espermatozoide**

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.



Para la obtención de energía en el metabolismo aeróbico de los espermatozoides, se producen en la mitocondria especies reactivas de oxígeno (ERO) y algunos radicales libres (RL), que pueden ser potencialmente dañinos para la misma célula. Sin embargo, se ha podido comprobar, que bajo condiciones fisiológicas son de gran importancia para la adquisición de la capacidad fertilizante (Agarwal *et al.*, 2003; Agarwal, *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008; Makker, 2009).

La primer ERO que se produce en la mitocondria espermática es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual se reduce convirtiéndose en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que también sufre reducción, convirtiéndose en radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el cual es la ERO más reactiva (Koppers *et al.*, 2008).

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 $O_2^{\bullet-}$, y el H_2O_2 , en mínimas cantidades, están involucrados en el control de la fisiología espermática a nivel de la hiperactivación, la reacción acrosomal y la fusión espermatozoide-ovocito. En experimentos en los que se ha expuesto a espermatozoides de humano y hámster a concentraciones exógenas de H_2O_2 se ha observado que estimula la reacción acrosomal así como la fusión espermatozoide-ovocito (Bize *et al.*, 1991). La exposición de espermatozoides humanos a $O_2^{\bullet-}$ tiene una acción estimuladora directa sobre el índice de hiperactivación (Aitken *et al.*, 1995; Aitken 1997; Agarwal *et al.*, 2003; Agarwal, *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008).

En condiciones fisiológicas, las ERO en el semen son producidas en bajas cantidades por diferentes tipos de células, como los espermatozoides inmaduros y anormales, los leucocitos infiltrados y las células epiteliales (Koca *et al.*, 2003).

Se han propuesto dos vías para la producción de ERO en el espermatozoide, la primera es a través del sistema dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado reducido NADPH oxidasa, a nivel del plasma seminal y la oxidoreductasa dependiente de NADPH en la mitocondria. La producción externa de ERO



particularmente de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 puede ser resultado por la contaminación por leucocitos dentro del semen, esta generación de ERO está asociada a pacientes infértiles o subfértiles (Aitken *et al.*, 1995).

▪ Líquido seminal

El medio en el que se desenvuelven los espermatozoides es vital para su supervivencia pues los mantiene en un pH óptimo, aportándoles nutrientes y regulando la homeostasis seminal. Sin embargo, cuando ese ambiente es alterado se presentan cambios en su capacidad para fecundar. El líquido seminal es el que le aporta al espermatozoide todas éstas condiciones para que se pueda llevar a cabo sus funciones (Gallardo, 2007).

El líquido seminal es un medio rico y complejo. Con un volumen de eyaculado promedio (después de un lapso de abstinencia de 3 a 5 días) de 2 a 6 ml; presenta un color blanquecino y una consistencia un tanto viscosa. Presenta un pH de entre 7.2 y 7.8 (Poirot & Cherruau, 2005).

El líquido seminal sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo y protector de los espermatozoides contra los radicales libres. Está compuesto de: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^+ , Mg^{++} , Zn^{++} ; glúcidos: poca glucosa (0.39 mmol/L) sobre todo fructosa (de 5.5 a 27.5 mmol/L fuente de energía para los espermatozoides) producida a partir de la glucosa sanguínea; ácidos orgánicos: ácido cítrico, que contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del semen; ácido ascórbico: protector de los espermatozoides de cara a los radicales libres; lípidos; colesterol y glicerofosforilcolina; esteroides: como la testosterona y la deshidroepiandrosterona; constituyentes azotados: como aminoácidos; Cartinina: papel importante en el metabolismo de los espermatozoides bajo la forma de acetilcartinina; espermidina; espermina: que es responsable del olor del semen (oxidación); glutatión: protector de los espermatozoides por su poder reductor; proteínas como: albumina = 6.3%, α globulina = 15.9%, β globulina = 41.1%, γ



globulina = 23.2%, fracciones que no migran = 13.5% (Poirot & Cherruau, 2005). Aunque el espermatozoide humano es protegido por sistema de defensa antioxidante que incluye a la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión que están presentes en el líquido seminal y los cuales neutralizan los efectos de los radicales libres, su efectividad se ve debilitada debido a su limitada concentración (Shamsi *et al.*, 2009).

Una forma de determinar si el ambiente en el que se encuentra el espermatozoide es adecuado es mediante una espermatobioscopia o espermograma.

▪ **Espermatobioscopia**

El análisis de semen, espermatobioscopia o espermograma es una prueba de funcionalidad del espermatozoide para la evaluación de la infertilidad en las parejas y para el estudio de las enfermedades genitales masculinas y de otras patologías, como las causadas por la exposición a productos químicos, factores ambientales y medicamentos, entre otras (Andrade-Rocha, 2003).

Los parámetros que se evalúan en la espermatobioscopia son: el volumen de la muestra, el número de espermatozoides que contiene cada mililitro de semen, porcentaje de ellos que presentan movilidad, viabilidad, así como la morfología (World Health Organization, 1999; Poirot & Cherruau, 2005).

▪ **Radicales libres y estrés oxidativo**

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados, estos suelen ser muy inestables y buscan la manera de completar su par electrónico para anular su campo magnético, dichas reacciones son muy rápidas y el tiempo de vida media suele ser del orden de los nanosegundos a los milisegundos y por lo tanto reaccionan con moléculas en su entorno más directo (Miranda, 2008; Mallok *et al.*, 2011). Se forma fácilmente cuando se rompe un enlace covalente entre moléculas y un electrón queda con cada átomo recién



formado (Buonocore *et al.*, 2010). Los RL sólo logran volverse estables cuando sustraen electrones de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier molécula cercana, causando de este modo una cascada de daños (Buonocore *et al.*, 2010).

Las ERO son formas reducidas del oxígeno (O_2), y algunas consideradas radicales libres, sin embargo, no todos los productos lo son y se generan como resultado del metabolismo celular (Miranda, 2008), no obstante, a concentraciones fisiológicas, están relacionadas con procesos de señalización celular, sin embargo, 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) (Fina, 2014; Mallok *et al.*, 2011).

Hay dos tipos principales de especies de RL: las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (Buonocore *et al.*, 2010). Las ERO contienen dos electrones no apareados en la capa exterior, representan una amplia categoría de moléculas que incluyen a derivados radicales (radical hidroxilo $OH\bullet$; radical superóxido $O_2\bullet^-$; peroxilo RO_2 ; peroxil lípido LOO y tiol RS^-) y no radicales (ozono O_3 ; oxígeno singlete 1O_2 ; lipoperóxido LOOH; peróxido de hidrógeno H_2O_2) de oxígeno (Agarwal & Prabakaran, 2005). Las especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico NO; peróxido nítrico ONOO $^-$; ion nitrito NO_2^- , etc.) son radicales libres de nitrógeno y son considerados como una subclase de las ERN (Sikka, 2001).

Entre los más relevantes en la biología humana tenemos: el radical anión superóxido ($O_2\bullet^-$), radical hidroxilo ($OH\bullet$), óxido nítrico ($NO\bullet$), hidroperóxido ($HO_2\bullet$), alquil peroxil ($RO_2\bullet$) y alcoholilo ($RO\bullet$) (Mallok *et al.*, 2011).

Varios químicos que se encuentran dentro del cuerpo humano son capaces de intercambiar electrones, alterando su estado de oxidación. Los átomos de O_2 son particularmente susceptibles a entrar en una vía de reducción; es decir, a ganar de 1 a 4 electrones, creándose así ERO, que son potentes agentes oxidantes



(figura 5) (Plant, 2002). La liberación de las ERO da como resultado un cambio en el potencial de óxido-reducción (Redox) dentro de la célula, dando lugar al EOx. Durante el EOx las ERO pueden llevar a cabo ataques nucleofílicos en grupos químicos, los cuales tienen un déficit de electrones; es decir, que poseen al menos un electrón desapareado. Los blancos potenciales de las ERO son macromoléculas: proteínas, lípidos el ADN y carbohidratos ocasionando la formación de aductos, por enlaces covalentes entre macromoléculas e interrumpiendo las funciones celulares (Plant, 2002).

El hecho de que las rutas metabólicas utilicen el oxígeno hace pensar que se está en constante riesgo de formar potentes agentes oxidantes debido a la constante ganancia de electrones. Sin embargo, en la mayoría de los procesos fisiológicos, como la respiración, la reducción secuencial de O_2 , está controlada y las ERO no intervienen dentro de la célula. En lugar de reducir los 4 electrones al mismo tiempo, cada electrón es reducido uno por uno, con la consecuente formación de H_2O , la cual puede ser fácilmente excretada (figura 5) (Plant, 2002).

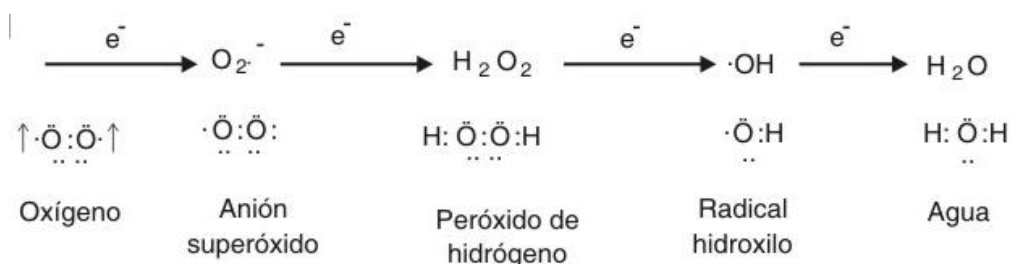


Figura 5. Generación de especies reactivas de oxígeno (Plant, 2002).

El O_2 pasa por una serie de reacciones de auto-oxidación en la mitocondria, producto de estas reacciones se produce la reducción de un electrón formando $O_2^{\cdot -}$. Por más que el $O_2^{\cdot -}$ es poco reactivo, puede liberar Fe^{2+} de proteínas ferrosulfuradas (Dickinson y Chang, 2011). Posteriormente el $O_2^{\cdot -}$ puede pasar por dismutación y formar H_2O_2 espontáneamente o por catálisis enzimática por intermedio de la superóxido dismutasa (SOD). También es un precursor para la



formación de OH• catalizado por metales a través de la reacción de Fenton.

En la generación de las ERO, el O₂•⁻ es la primera ERO que se produce durante el metabolismo celular, se forma mayormente en la cadena respiratoria debido a que una parte de los electrones que pasan por ésta son captados por el O₂•⁻, principalmente en la ubiquinona y la NADPH deshidrogenasa. Se ha reportado que aproximadamente el 0.1% del oxígeno que se consume en la respiración forma O₂•⁻. El O₂•⁻ es poco reactivo, su toxicidad radica en que es capaz de originar ¹O₂ y OH• (Hansberg, 2008).

Así mismo una gran parte de OH• proviene de la descomposición del H₂O₂ catalizada por metales de transición, siendo el hierro el más común, de acuerdo con la reacción de Fenton (figura 6).

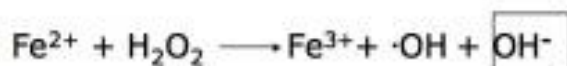


Figura 6. Reacción de Fenton. Tomado y modificado de Evangelista, 2014.

La reacción de la SOD produce la mayor parte del H₂O₂ en las células. Se puede difundir a través de los compartimientos celulares, es menos reactivo que el O₂•⁻ y no interacciona con compuestos como el NADPH, ácidos nucleicos, los aminoácidos de las proteínas ni con lípidos. Es tóxico a concentraciones intracelulares mayores a 1µM debido a que puede formar ¹O₂ y OH•. El H₂O₂ se emplea en funciones importantes como la maduración y capacitación de los espermatozoides. Cuando el H₂O₂ acepta un electrón desapareado de un metal se fragmenta, formando OH• y anión hidróxido OH⁻, el segundo se protona formando agua mientras que el primero interacciona con cualquier compuesto vecino (Hansberg, 2008).

El H₂O₂ es el estado de reducción de dos electrones del O₂ (Buonocore *et al.*, 2010) y aunque no es un RL, es la molécula que más se ha involucrado en el



daño de los espermatozoides. El H_2O_2 es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales $\text{OH}\cdot$ en presencia de metales de transición. El EOX causado por el H_2O_2 , provoca un mal funcionamiento en la mitocondria y conduce a la muerte celular programada. La interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, o la inhibición de esta, predispone a la formación de RL (Mallok *et al.*, 2011).

El $\text{OH}\cdot$ es uno de los compuestos más reactivos que existen, no se puede difundir debido que reacciona con cualquier compuesto celular. Es capaz de oxidar tanto a las purinas como a las pirimidinas, y la desoxirribosa, provocando daños a los ácidos nucleicos; la mayor parte del daño a las proteínas es provocado por el radical $\text{OH}\cdot$ ya que puede reaccionar con cualquier aminoácido donde se produzca, que generalmente son los sitios activos donde se encuentra el metal de transición (Makker *et al.*, 2009).

El $\text{OH}\cdot$ posee una vida media corta de alrededor de 9-10 segundos. El $\text{OH}\cdot$ es el estado de reducción de tres electrones del O_2 . El $\text{OH}\cdot$ es virtualmente eliminado en el mismo sitio de la formación, ya que interactúa con la primera molécula que se encuentra. Es por ello considerado extremadamente inestable y altamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares y puede dañar cualquier tipo de célula (Buonocore *et al.*, 2010).

La mayoría de las ERO generadas en el espermatozoide humano es el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Éste electrón reducido producto del O_2 reacciona consigo mismo vía dismutación para generar H_2O_2 . En presencia de metales de transición, el H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, bajo la reacción de Haber-Weiss generan el radical $\text{OH}\cdot$ (figura 7) que es extremadamente reactivo y destructivo. El radical $\text{OH}\cdot$ es un potente iniciador de la lipoperoxidación y puede hacer que el espermatozoide pierda funcionalidad debido a la disrupción de la fluidez de su membrana (Chen *et al.*, 2013; Hazout *et al.*, 2008; Sikka *et al.*, 2001).



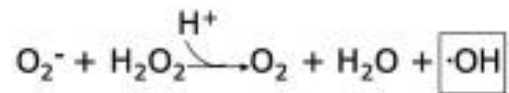


Figura 7. Reacción de Haber-Weiss. Tomado y modificado de Evangelista, 2014.

El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos (Fina, 2014).

El daño provocado por las ERO depende no solo de la cantidad y naturaleza de las mismas, sino también de factores como la temperatura, tensión del oxígeno y la composición del ambiente que lo rodea (Hammoud, 2008).

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa (Fina, 2014). Las células cuentan con mecanismos de protección enzimática (Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutatión peroxidasa) y no enzimática (Vitaminas E y C). Un desbalance entre la producción de ERO y los sistemas de defensa antioxidante celular favorecerá a la aparición del estrés oxidativo (Torres *et al.*, 2004).

Las ERO pueden alterar, reversible o irreversiblemente, al espermatozoide. Se ha postulado que el aumento de las especies reactivas de oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes inducen daño al ADN, las proteínas, carbohidratos y los lípidos presentes en la membranas de los espermatozoides, causando disminución de la movilidad y de la viabilidad, así como alteraciones en la pieza



intermedia, los cuales finalmente producen cambios funcionales en las células espermáticas (Koca *et al.*, 2003; Agarwal, 2003).

Se necesitan mínimas cantidades de ERO en los procesos de fecundación y es así como se ha demostrado, en experimentos *in vitro*, que éstas tienen un papel importante en la capacitación, hiperactivación, reacción del acrosoma y fusión del espermatozoide con el oocito, además de su participación como segundos mensajeros mediante diferentes vías de activación intracelular (Agarwal *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008).

Las ERO atacan a los ácidos grasos en la membrana provocando una cascada de reacciones químicas llamada lipoperoxidación (Hicks, 2001; Hansberg, 2008). Los lípidos peroxidados son inestables y se descomponen formando una compleja serie de compuestos que incluyen a los aldehídos. La concentración de tales aldehídos se relaciona directamente con el nivel peroxidativo en las muestras biológicas (Torres *et al.*, 2004).

▪ **Lipoperoxidación**

La lipoperoxidación es un amplificador para los radicales libres iniciales, y los aldehídos reactivos generados en estos procesos pueden actuar como “segundos mensajeros tóxicos” en la cadena de reacciones que se inicia si los ácidos grasos poli-insaturados de la bicapa de la membrana son convertidos en lípidos hidroperóxidos. Entre los diferentes aldehídos que se pueden formar en el proceso de lipoperoxidación están el malondialdehído y el 4-hidroxi-alquenal, en especial el 4-hidroxi-nonenal (HNE) y 4-hidroxi-hexenal (Torres *et al.*, 2004).

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). Dando como resultado una cascada de reacciones peroxidativas, permitiendo la destrucción de los lípidos y



posiblemente, de estructuras en donde se localicen lípidos (Timbrell, 2009) (figura 9) (Fina, 2014).

La lipoperoxidación ocurre en 3 etapas:

1. Iniciación de la peroxidación lipídica, en la que un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, ocurre la abstracción de hidrógeno del grupo metileno (-CH₂-) unido a un carbono flanqueado por dobles enlaces de un ácido graso poliinsaturado, con la formación de una especie radicalica (radical alquílico: L[•]). El hecho de que exista un doble enlace, debilita los enlaces carbono-hidrógeno del átomo de carbono adyacente a dicho doble enlace. Los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace.

2. Fase de propagación, en la que ocurre una reacción en cadena con la extensión del daño y la formación de más especies radicalicas. La especie radicalica formada en la primera fase reacciona con el oxígeno y forma un radical peroxilo (LOO[•]) que puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes y originar un hidroperóxido o lipoperóxido (LOOH) y un radical alquílico; así se produce una reacción en cadena y el daño a un número creciente de ácidos grasos.

3. Fase de terminación o descomposición, en la que hidroperóxidos formados se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Los aldehídos formados, como el malonildialdehído y el 4-hidroxinonenal, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que determina efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos (figura 8) (Halliwell, 1991, 1994; Jomova & Valkob, 2011)

Dada la relación directa entre la producción de estos aldehídos reactivos y la peroxidación lipídica, la evaluación de la concentración de uno de estos subproductos nos dará información del nivel del estrés oxidativo en la muestra a estudiar. En otros términos estos aldehídos pueden considerarse como indicadores del estrés oxidativo. Se puede medir el nivel de la lipoperoxidación a



través de la estimación cuantitativa y espectrofotométrica de algún subproducto de dicho proceso, siendo el de preferencia, MDA (Torres *et al.*, 2004).

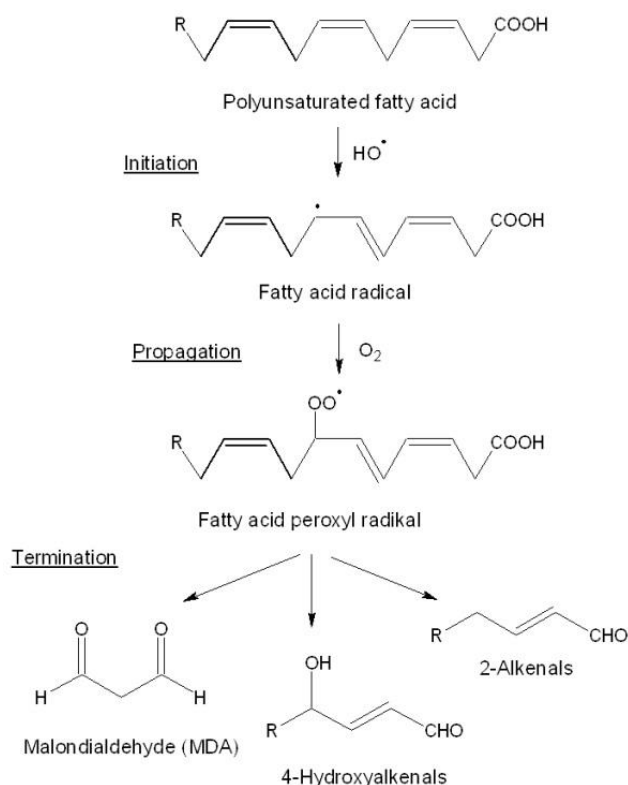


Figura 8. Esquema que muestra el efecto que producen las ERO sobre la peroxidación lipídica (Dukić *et al.*, 2012).

Bioquímicamente la membrana del espermatozoide está constituida por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, conformada por proteínas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor. Las proteínas que están incluidas en la bicapa lipídica realizan diversas funciones, como son: el transporte de las moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; mismas que actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales. Además de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos, que en la mayoría de los casos son



cadena de azúcares simples o polisacáridos (Ríos *et al.*, 2010). Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide (figura 9). La composición lipídica y proteica de cada membrana es única y ocurre muy poco o nada de intercambio de lípidos o proteínas entre ellas (Martínez & Pardo, 2010).

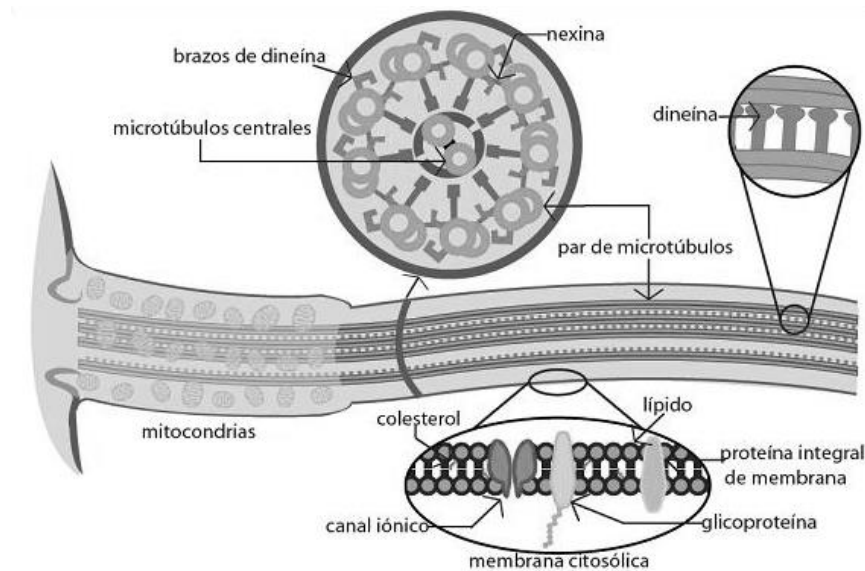


Figura 9. Partes de la membrana plasmática que contiene a todo el espermatozoide, (Martínez & Pardo, 2010).

- **Antioxidantes**

Un antioxidante se define como una sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato resultando un agente reductor más potente (Hicks, 2001). Los antioxidantes son compuestos químicos que interactúan con los radicales libres y los neutralizan, lo que les impide causar daño.

Debido a que las ERO cumplen con funciones tanto fisiológicas y patológicas, el organismo ha desarrollado sistemas de defensa para mantener los niveles de



ERO en un cierto rango. Siempre que los niveles de ERO se vuelven patológicamente elevados, los antioxidantes los suprimen para minimizar el daño oxidativo (Agarwal & Allamaneni, 2006). Los antioxidantes son, en general, compuestos que desechan, limpian e inhiben la formación de ERO, o en su defecto, revierten su acción. Los antioxidantes pueden proteger a la célula del ERO por medio de 3 mecanismos: prevención, interceptación y reparación (Agarwal *et al.*, 2004).

Aunque la clasificación de los antioxidantes depende de los marcos de referencia que se tomen en cuenta), una de las formas más generales de categorizar a los antioxidantes, según Boveris *et al.*, 2008 es en antioxidantes no enzimáticos y antioxidantes enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos, también conocidos como antioxidantes naturales, se producen por sí solos dentro del organismo e incluyen a la superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); y glutatión peroxidasa (GPx); y las no enzimáticas que son adquiridas gracias a la ingestión de frutas o vegetales que contienen algunos suplementos tales como vitamina C, vitamina E, vitamina A, carotenoides, cartininas, cisteínas, pentoxifilina albumina glutatión, ácido úrico, piruvato (Agarwal & Prabakaran, 2005; Bansal & Bilaspuri, 2011; Lampiao, 2012).

Antioxidantes enzimáticos

Glutatión reductasa y glutatión peroxidasa: GSH/glutatión peroxidasa son los principales agentes reductores del cuerpo y actúan como antioxidantes limpiadores en el epidídimo y testículos (Mora-Esteves & Shin, 2013). Confiere protección a la membrana lipídica del espermatozoide, preservando su viabilidad y movilidad (Lanzafame *et al.*, 2009).

Superóxido dismutasa y catalasa: la SOD protege al espermatozoide de los aniones superóxidos catalizando la conversión de superóxido dentro del oxígeno y



H₂O₂, previniendo la lipoperoxidación y mejorando la movilidad (Agarwal *et al.*, 2004). Por otro lado, la catalasa ayuda a la descomposición de H₂O₂ en agua y oxígeno. Tanto la SOD como la catalasa ayudan a la remoción de ERO y evitando el daño potencial al espermatozoide (Mora-Esteves & Shin, 2013).

Las SOD son una familia de enzimas que catalizan la dismutación de O₂^{•-} (Figura 10), en los mamíferos se reconocen tres enzimas de esta familia, dos intracelulares y una extracelular. La SOD1 se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y la membrana externa mitocondrial, su centro catalítico está formada por un cobre y un zinc (SOD Cu-Zn). Su expresión es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioleta, metales pesados y estrés oxidativo.

La SOD2 se encuentra dentro de la mitocondria, ya que es un organelo que está sometido mayormente a estrés oxidativo, y tiene un centro catalítico de Mn. La SOD3 está presente en la matriz extracelular principalmente unida a heparina y a las fibras de colágena tipo 1 de la mayoría de los tejidos, además se ha encontrado en plasma, fluido linfático y líquido cefalorraquídeo, pero su concentración es 20 veces mayor en la matriz extracelular que en el plasma (Gómez-Quiroz & Cuevas, 2008).

La reacción enzimática de la SOD se lleva a cabo en dos pasos, primero el O₂^{•-} llega al centro de reacción y se une a una arginina, el O₂^{•-} dona su electrón, el cual es transferido al Cu, que se transforma en Cu⁺, esto provoca que el enlace entre la histidina y el Cu se rompa, y protona al Nitrógeno de la histidina, el O₂ formado se disocia de la arginina y se libera. La segunda parte de la reacción comienza de manera similar a la primera, el O₂^{•-} llega al centro catalítico de la enzima y se une a una Arginina; cerca del centro catalítico, se protona una molécula de agua (H₃O⁺). El electrón que recibió el Cu es transferido al O₂^{•-} lo cual oxida al metal a su forma Cu₂⁺. Los dos electrones que posee el superóxido, forman inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones donados uno por la



molécula de agua y otro del nitrógeno de la histidina, con lo cual se libera H_2O_2 y la enzima se regenera (Gómez-Quiroz & Cuevas, 2008).



Figura 10. Reacción de la SOD para la dismutación de O_2^- en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Tomado y modificado de Cota, 2014.

La catalasa realiza el metabolismo de H_2O_2 , se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas. CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, una catalítica y una peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de H_2O_2 (Miranda, 2008) (Figura 11).

En la reacción peroxidativa la enzima utiliza como donadores de Hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol, y formaldehído (Figura 12). Una molécula de catalasa es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo, la primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es la heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno, en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno y forma agua (Peraza-Reyes, 2008).

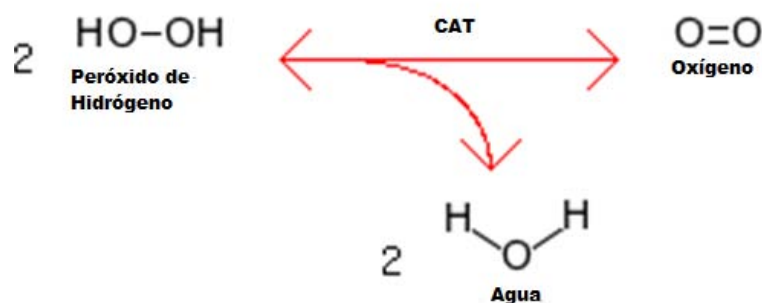


Figura 11. Reacción catalítica de la catalasa, en ésta reacción se utilizan dos moléculas de H_2O_2 para su conversión en O_2 y agua metabólica. Tomado y modificado de Cota, 2014.



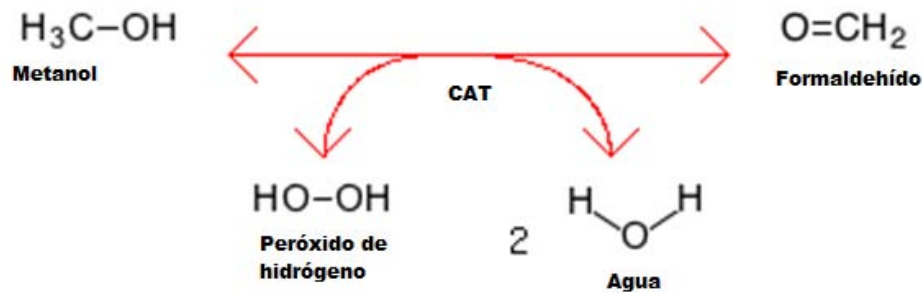


Figura 12. Reacción peroxidativa de la catalasa, en ésta reacción utiliza como donadores de hidrógeno al metanol o al formaldehído para la producción de dos moléculas de agua metabólica. Tomado y modificado de Cota, 2014.

La glutatión peroxidasa (GPX) es una enzima dependiente de Selenio (Se), cataliza la reducción de H_2O_2 y también la reducción de lipoperóxido (L-OOH), utilizando al glutatión (GSH) como agente reductor (Figura 13). Glutatión peroxidasa es el nombre genérico de un grupo de isoenzimas que poseen una triada catalítica compuesta de seleno-cisteína, glutamina y triptófano; se conocen cuatro enzimas mayoritarias en los tejidos de los mamíferos todas dependientes de Selenio: GPX citosólica (GPX1), GPX gastrointestinal (GPX2), GPX plasmática (GPX3) y GPX de fosfolípidos (GPX4). El centro activo se encuentra en el átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína; entre las diferentes formas de GPX se conserva casi intacta esta estructura del centro catalítico (Cárdenas, *et al.*, 2008).

La capacidad reductora de las enzimas GPX se basa en altas concentraciones de glutatión reducido (GSH); un tripéptido celular con un grupo sulfhidrilo, con capacidad antioxidante. Durante el mecanismo catalítico de GPX el selenio reacciona con un peróxido para dar ácido selénico, aquí es donde se une el primer GSH formando agua y una proteína Se-SG, se enlaza un segundo GSH produciendo una proteína Se-GH más un H^+ y un GSSG.



El GSSG formado durante la reacción es reducido por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor (Cárdenas, *et al.*, 2008).

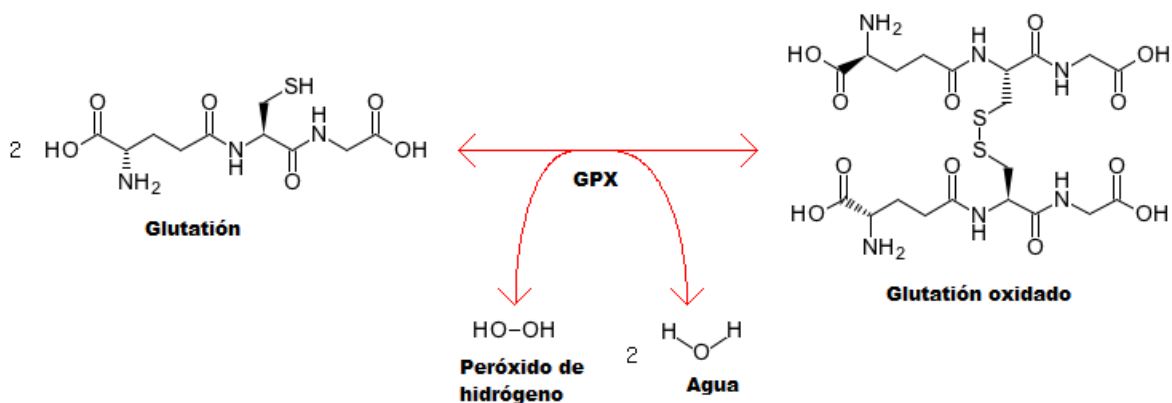


Figura 13. Reacción de la glutatión peroxidasa, en ésta reacción se utiliza el glutatión como donador de electrones para convertir el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua. Tomado y modificado de Cota, 2014.

Antioxidantes no enzimáticos

Vitamina E: la vitamina E (α -tocoferol) es un antioxidante que actúa en la membrana espermática, neutralizando H₂O₂ y eliminando radicales libres (Bansal & Bilaspuri, 2011). La vitamina E ayuda a preservar la movilidad y la morfología del espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2004).

Vitamina C: la vitamina C (ascorbato) es otro antioxidante que juega un papel significativo (mayor al 65%) en el combate a las ERO en el plasma seminal (Sharma & Agarwal, 1996). Protege la viabilidad y la movilidad del espermatozoide (Lampiao, 2012) reacciona con OH•, y H₂O₂ en el líquido seminal. La vitamina C nunca actúa a nivel intracelular (Lanzafame *et al.*, 2009).

Carotenoides: tienen una vida media muy corta, son efectivos para erradicar al oxígeno molecular (Sies, 1993). Dos tipos de carotenoides son los principales: β -caroteno, que previene la lipoperoxidación (Bansal & Bilaspuri, 2011), y el



licopeno, que es el caroteno más potente; previene la peroxidación en el plasma seminal (Lampiao, 2012).

Cisteínas: son precursores del GSH intracelular e incrementan la cantidad de GSH sintetizado. Previene el daño a la membrana y al DNA (Bansal & Bilaspuri, 2011). La N-acetil-cisteína trabaja mediante dos mecanismos: 1-mediante el aumento en cantidad del agente reductor y 2-protegiendo al espermatozoide de RL y preservando su movilidad (Gharagozloo & Aitken, 2011; Mora-Esteves & Shin, 2013).

Pentoxifilina: actúa como un inhibidor fosfodiester y previene la ruptura adenosin monofosfato cíclico intracelular (cAMP). También suprime la síntesis del factor de necrosis- α (TFN- α) y leucotrienos dando como resultado una disminución en los niveles de inflamación (Mora-Esteves & Shin, 2013). Cuando la cantidad de $O_2^{\bullet-}$ producida por el espermatozoide disminuye, hay menos lipoperoxidación y la movilidad del espermatozoide prevalece (Zini & Al-Hathal, 2011). Un estudio demostró que una ingesta oral diaria de 1200mg de pentoxifilina incrementa la movilidad.

Los espermatozoides son muy susceptibles al daño inducido por el estrés oxidativo debido al alto contenido de lípidos poli-insaturados presentes en su membrana, una baja o moderada concentración de enzimas antioxidantes en el plasma seminal (Agarwal & Said, 2003; Fingerova *et al.*, 2007). En estudios anteriores, se ha demostrado que la lipoperoxidación de las membranas espermáticas en individuos clínicamente sanos es consecuencia de espermatozoides muertos o con algún defecto morfológico, así como de presencia de células redondas, (Gallardo, 2007). Otros estudios sugieren que las concentraciones de antioxidantes presentes en el plasma seminal, son bajas en individuos infértiles o que presentan alguna anomalía en la densidad espermática comparados con sujetos que son fértiles o que presentan una densidad adecuada (Novotný *et al.*, 2003; Fingerova *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés oxidativo puede originar daños o deformidades a los espermatozoides y eventualmente infertilidad masculina. Las especies reactivas del oxígeno se producen por diversos mecanismos en el semen, por espermatozoides inmóviles o con problemas de movilidad, leucocitos y por espermatozoides normales morfológicamente pero funcionalmente anormales. Entre estos daños, se registran la peroxidación lipídica a la membrana espermática. 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 (Mallok *et al.*, 2011). Se ha sugerido que en muestras seminales de pacientes infértiles se presenta un bajo contenido de antioxidantes e individuos clínicamente sanos fértiles pueden presentar una alta lipoperoxidación de las membranas espermáticas (Novotný *et al.*, 2003; Gallardo, 2007; Fingerova *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011). Con base a éstos antecedentes pretende investigar ¿Qué relación hay entre la calidad seminal, el nivel de lipoperoxidación de la membrana espermática y la capacidad antioxidante del plasma seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos?



HIPÓTESIS

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), tienen la capacidad de alterar reversible o irreversiblemente la función celular. Se ha propuesto que las ERO modifican la bioquímica y la fisiología del espermatozoide. Por lo tanto al tener una baja calidad seminal es probable que se tengan altas concentraciones de MDA y una baja capacidad antioxidante en el líquido seminal de individuos clínicamente sanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la calidad seminal de individuos clínicamente sanos con los niveles de MDA, así como de la capacidad antioxidante del plasma seminal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la calidad seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos.
- Determinar el grado de lipoperoxidación de las membranas espermáticas.
- Evaluar la capacidad antioxidante del plasma seminal.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Espermatobioscopías

Se analizaron 43 muestras de semen de individuos clínicamente sanos de edades entre 18 y 35 años. El rango de edad establecido se debe a que de los 18 a los 24 años el hombre está en un proceso de desarrollo biológico, y de los 24 a 44 años, el hombre está en su madurez biológica, siendo a los 35 años el punto más alto en este desarrollo (Mendoza & Retana, 2009). Los donadores llenaron un cuestionario en el cual se les pidió que dieran información acerca de su estado de salud, hábitos alimenticios, hábitos de vida, edad y, a partir del cuestionario, se tomaron los 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. Los criterios de inclusión eran estar dentro del rango de edad establecido, tener de 3 a 5 días de abstinencia sexual.

Los donadores dieron su consentimiento informado para el aprovechamiento de la muestra, con fines solo de investigación. Las muestras se obtuvieron mediante masturbación después de cumplir con abstinencia sexual de 3 días como mínimo, se realizó el análisis seminal, siguiendo los lineamientos previamente establecidos por la Organización Mundial de la Salud en 1999, mediante el cual se evaluaron los parámetros físicos: apariencia (color), olor, licuefacción, viscosidad o consistencia, volumen y pH; así como los parámetro citológicos: concentración de espermatozoides (densidad), la movilidad (progresión o motilidad), la viabilidad (vitalidad) espermática y la morfología (World Health Organization, 1999).

Los criterios que se tomaron en cuenta para definir la condición del donador (NL o NN) fueron la densidad y la morfología, pues, de acuerdo al manual de la OMS (1999; 2010) éstos parámetros determinan la calidad seminal. Ambas mediciones deben de estar por encima de lo establecido por el manual de la OMS, pues si alguna de ellas está fuera del valor de referencia, la muestra se considera de baja



o mala calidad seminal (World Health Organization, 1999; 2010). La muestra se dividió en 2 grupos: 25 muestras que presentaron una espermatobioscopia normal, es decir, aquellos que estuvieron dentro de los parámetros establecidos por la OMS (tabla 2) (World Health Organization, 1999); y 18 muestras que no presentaron una espermatobioscopia normal.

Tabla 2. Valores de referencia establecidos por la OMS de 1999 y 2010*

	1999, 4 ^{ta} edición ³	2010, 5 ^{ta} edición ⁴
	Valor de referencia	Limite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 ⁶ /mL	15 x 10 ⁶ /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 ⁶	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /mL	< 1 x 10 ⁶ /mL
Mar test	< 50 % esp. unidos a particulas	< 50 % esp. unidos a particulas
"Immunobeads"	< 50 % esp. unidos a particulas	< 50 % esp. unidos a particulas

*Los valores estándares OMS, 2010, se proponen como Limites de Referencia Inferior (LRI) por algunos autores.

La muestra se colocó dentro de un recipiente de plástico estéril el cual debe estar a temperatura ambiente para reducir al mínimo la posibilidad de un choque térmico. La muestra será recolectada en la intimidad de una dependencia próxima al laboratorio; o bien, la muestra se llevará al laboratorio antes de transcurrida una hora de la recolección. Una vez obtenida la muestra, se llevará a una incubadora con una temperatura de 37° C durante 30-40 minutos para que se lleve a cabo la **licuefacción**. La muestra se debe mezclar cuidadosamente en el recipiente antes de tomar una parte para el análisis, con el fin de garantizar un recuento acertado de espermatozoides (López *et al.*, 2012).



El **volumen** del semen se midió con una pipeta serológica estéril de 5 ml. La **viscosidad** o consistencia del semen se evaluó aspirando suavemente la muestra en una pipeta serológica estéril de 5 ml y permitiendo la caída libre de las gotas para observar la longitud del filamento que se forma (López *et al.*, 2012). La apariencia del semen es homogénea y un **color** entre blanco y gris (opalescente) (Toro, 2009). El **pH** se midió dentro de la primera hora de recolección de la eyaculación. Para ello, se colocará un medidor de pH (poner marca del ph-metro) dentro del recipiente que contiene la muestra seminal. Se tomará lectura del pH del semen (Poirot & Cherruau, 2005).

La **densidad** o concentración de espermatozoides se realizó utilizando una cámara de Neubauer. Se tomará una alícuota de 10 μL de semen y 90 μL de agua destilada. Se cargará la mezcla en la cámara hasta llenar por ambos lados la cámara para realizar un conteo por duplicado con una magnificación de 400X. Se contaron los espermatozoides dentro de la cuadrícula central como se observa en la figura 14 (área azul) (World Health Organization, 1999).

Para las muestras que contienen menos de 10 espermatozoides en el cuadro grande central (azul en la figura 14), se deben contar en todo el cuadrado (que contiene 25 cuadrados pequeños; para las muestras que contienen entre 10 a 40 espermatozoides en el cuadrado grande central, se pueden contar 10 cuadrados pequeños, de los 25; y para las muestras que contienen más de 40 espermatozoides en el cuadrado grande central, se pueden contar sólo 5 cuadrados pequeños (cuadrado 1 a 5 de la figura 14) (World Health Organization, 1999).

Los resultados de ambos lados de la cámara se promedian y el valor se divide por el factor de conversión (tabla 3) (World Health Organization, 1999); el resultado final corresponde al número (en millones) de espermatozoides por ml de eyaculado o concentración de los espermatozoides por ml. El factor de dilución se realizó únicamente en aquellas muestras en donde era imposible hacer el conteo espermático, debido al gran número de espermatozoides presentes en la muestra



seminal (donadores polizoospermicos). Si los recuentos en ambos lados de la cámara muestran una variación del 10%, significa que la muestra no es homogénea, ya sea porque no se haya mezclado adecuadamente, por aglutinación de los espermatozoides o por presencia de grumos. Se debe preparar una nueva dilución, mezclándola bien o diluyéndola aún más (World Health Organization, 1999).

TABLA 3. FACTORES DE CONVERSIÓN

DILUCION Semen: diluyente	NÚMERO DE CUADROS GRANDES CONTADOS		
	25	10	5
1+9	10	4	2
1+19	5	2	1

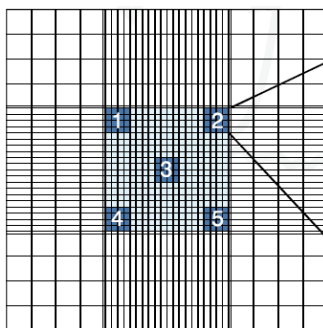


Figura 14. Para determinar la concentración de espermatozoides por ml de semen y el recuento total, se utiliza el área central de la cámara de Neubauer. El número de cuadrados pequeños en los que se cuentan los espermatozoides depende de cada muestra (World Health Organization, 1999).

La **progresión** de los espermatozoides se evaluó colocando 10 μ L de muestra seminal junto con solución isotónica en un portaobjetos limpio y cubriéndolo con un cubreobjetos. Se hará un conteo por duplicado de 200 espermatozoides. Según su tipo de movimiento los espermatozoides se clasifican en 4 categorías: rápidos y progresivos (R), lentos y progresivos (L), móviles en el sitio o *in situ* (IS) y sin movimiento (SM) (World Health Organization, 1999). Los conteos hay que expresarlos en porcentaje y se verificó si existía alguna diferencia entre los conteos; es decir, si había una diferencia mayor al 10% en cada una de las



categorías, se tendría que repetir el proceso completo. La cantidad de solución isotónica con la cual se disolvieron los 10 μL de semen dependerá de la cantidad de espermatozoides/ml que se hayan contado en la valoración de la densidad (tabla 4) (World Health Organization, 1999).

Tabla 4. Factores de dilución en solución isotónica/millones de espermatozoides/ml

Millones de esperma/ml	Dilución
<70	1:1
70-100	1:2
100-130	1:3
130-160	1:4
160-190	1:5
190-220	1:6

La **viabilidad** de los espermatozoides es útil para saber si están vivos o muertos (Sigman & Zini, 2009). El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó por el método de coloración con eosina al 0.5%. El fundamento de esta técnica consiste en teñir de color rosado las células muertas debido a que el colorante penetra la membrana, dejando a las células vivas sin teñir, pues los espermatozoides vivos presentan su membrana intacta. Se mezclaron 10 μL de semen y 10 μL de eosina dejando reposar la mezcla durante 1 min, en un portaobjetos, cubriendo la mezcla con un cubreobjetos (López *et al.*, 2012).

Se realizó un conteo por duplicado de 200 espermatozoides y se obtuvo la proporción de vivos y muertos. El resultado se expresó en porcentaje. Si existía una diferencia mayor al 10% en cada una de las categorías, se repetía el proceso completo (López *et al.*, 2012).

La evaluación de la **morfología** consiste en hacer un conteo por duplicado de 200 células espermáticas. Se diluyeron 10 μL de muestra seminal en 10 μL de una solución de formaldehído. Dicha dilución reposó durante 1 minuto. Esta prueba



tiene como finalidad evaluar las anomalías morfológicas del espermatozoide como son: defectos en la cabeza, de la pieza media y el flagelo. Para que un espermatozoide sea considerado normal, la cabeza, la pieza intermedia y el flagelo. No deberán presentar ninguna de las anomalías presentes en la figura 15 (World Health Organization, 1999).

Los espermatozoides deben clasificarse como normales (N), con defecto de cabeza (C), con defecto en la pieza media (PM) y con defecto en el flagelo (F). El resultado se expresará en porcentaje. Si había una diferencia mayor al 10% en cada una de las categorías, se repetía el proceso completo (Poirot & Cherruau, 2005).



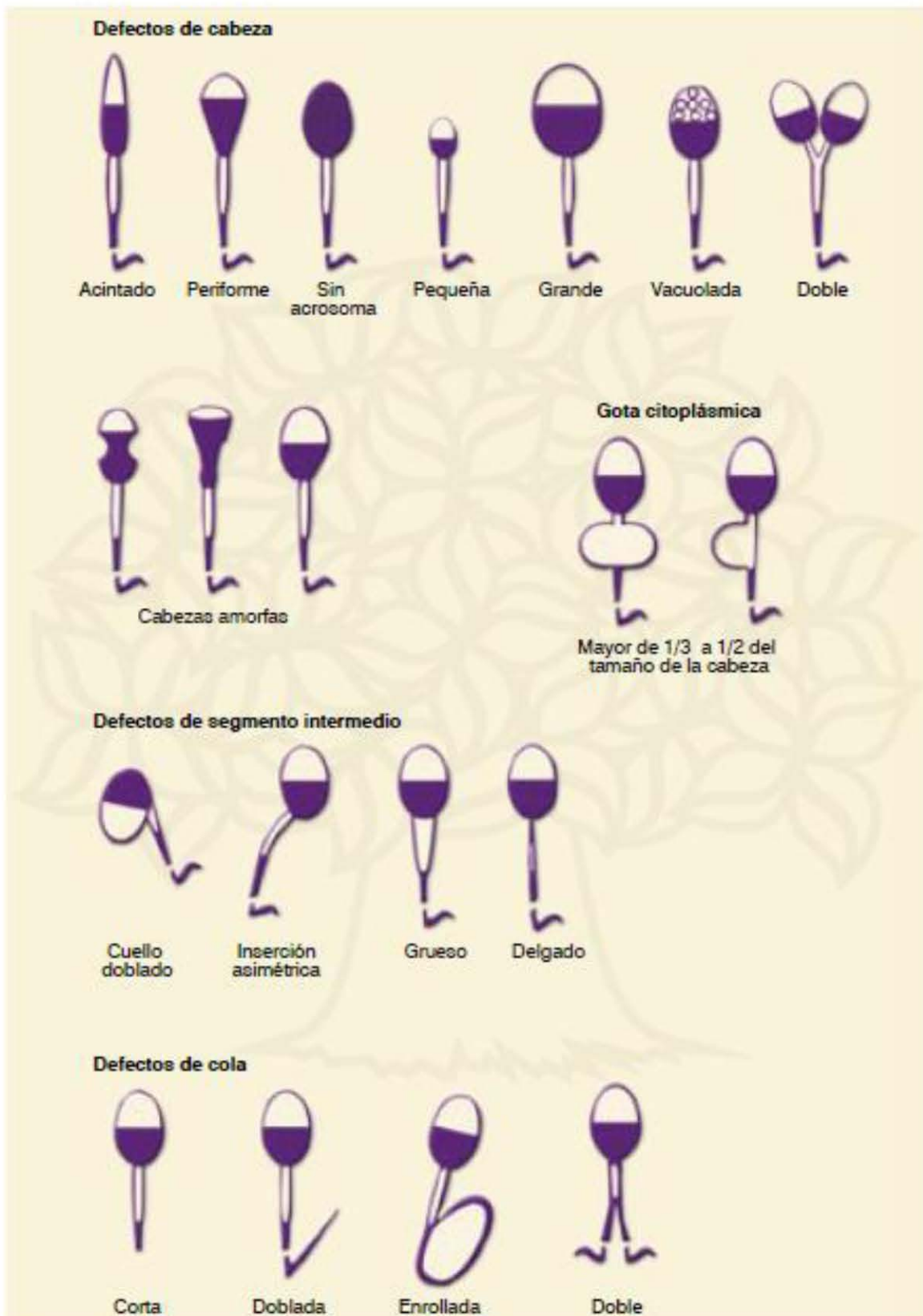


Figura 15. Representación esquemática de algunas formas anormales de espermatozoides (World Health Organization, 1999).



Una vez hecha la espermatobioscopia, la muestra seminal fue guardada en criobiales de 2 ml. Se tomaron 2 alícuotas; una alícuota de 400 µl para realizar la determinación de MDA; y otra alícuota de 300 µl para la determinación de TAS. Tanto la muestra como las alícuotas fueron puestas a congelación a -20°C. Las alícuotas para determinar TAS y MDA estuvieron en congelación durante 1 mes.

2. Determinación de la lipoperoxidación (MDA).

Para la determinación de lipoperoxidación por TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), se utilizó el método descrito por Jentzsch en 1996 (Jentzsch *et al.*, 1996). El fundamento de ésta técnica consiste en tratar la muestra seminal con TBA a pH bajo; en la reacción el MDA reacciona con TBA con la producción de un pigmento rosa cuya absorción máxima es a los 532 nm. Durante la reacción por un proceso de auto-oxidación se incrementan los TBARS, al agregar el butiril-hidroxitolueno (BHT) se reduce la formación de lipoperóxidos *in vitro*. (Mendoza & Retana, 2009).

Se tomó una alícuota de la muestra seminal de 400µl, como se mencionó antes, se mantuvo congelada a -20°C hasta su utilización (el tiempo de congelación no debió ser más de 1 mes). Cuando la alícuota se utilizó, se descongeló a temperatura ambiente (25°C aproximadamente). Una vez descongelada, se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm para separar el líquido seminal de los espermatozoides. Se colocaron 400 µL de sobrenadante con 50 µL de BHT (12.6 mmol/L) y 400 µL de ácido ortofosfórico (0.2M), se agitó en vórtex durante 10 segundos. Ésta mezcla se incubó por 45 minutos a 90°C en un baño de agua, pasado el tiempo se colocaron los tubos en hielo por 5 minutos para detener la reacción. Posteriormente se adicionaron 1000µL de butanol en cada tubo y 100 µL de solución salina saturada, se agitó vigorosamente por 30 segundos, se centrifugó a 5000rpm durante 1 minuto, la fase de butanol se pasó a una celda y se midió la absorbancia a 535nm y 572 nm. 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 (figura 16), (Mendoza & Retana, 2009).

Para la preparación de la curva patrón se prepararon las siguientes soluciones (tabla 5):

- TMP 1mM. – Diluir 17 μL de TMP en 100 ml de agua bidestilada.
- TMP 0.2mM. – Tomar 1ml de TMP 1mM y añadir 4 ml de agua bidestilada (se preparaba cada vez que se utilizaba).
- Se prepararon 8 tubos con diferentes concentraciones de TMP de la siguiente manera:

Tabla 5. Elaboración de curva patrón

TUBO	1, 1, 3,3-Tetrametoxipropano (μL)	H ₂ O (ml)	Malondialdehído ($\mu\text{mol/l}$)
1	0	1.000	0
2	5	0.995	0.2
3	10	0.990	0.4
4	20	0.980	0.8
5	30	0.950	1.2
6	50	0.930	2.0
7	70	0.910	2.8
8	100	0.900	4.0



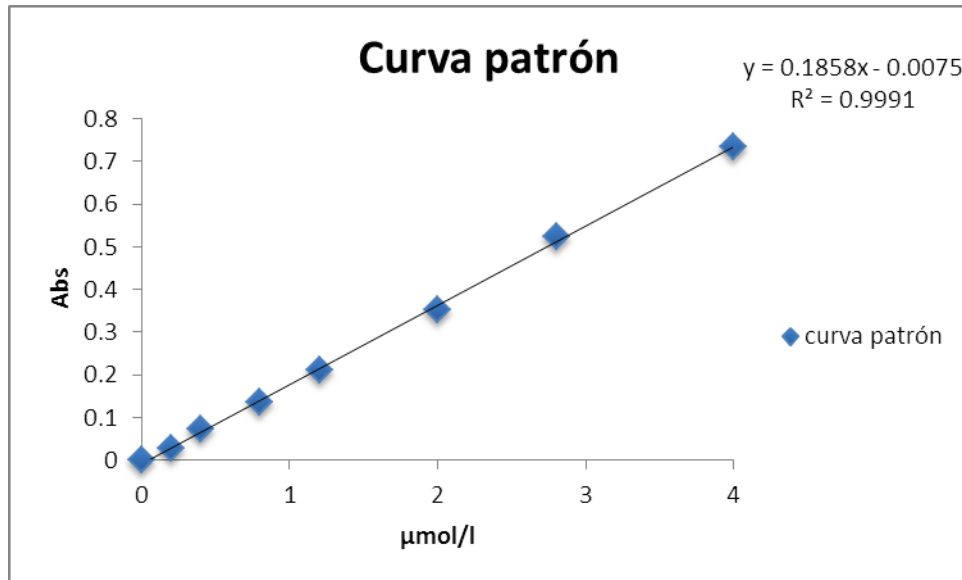


Figura 16. Curva estándar de malondialdehído.

De cada uno de los tubos se tomaron 400 μL y se transfirieron a un segundo tubo al cual se le dio el mismo tratamiento que a cada muestra.

Se graficó la absorbancia de cada tubo en función de la concentración de MDA y se determinó por regresión lineal la ecuación de la recta en la cual se interpolaron los deltas de las absorbancias obtenidas para las muestras para así calcular las concentraciones (Mendoza & Retana, 2009).

3. Capacidad antioxidante

Se utilizó un kit Randox® (Cat No. NX2332, Randox laboratories, Ltd, Crumlin, UK) para determinar el estado de los antioxidantes totales (TAS) del líquido seminal.

El kit contiene los siguientes reactivos, los cuales se prepararon al momento de su utilización:

R1. Tampón 1x100 ml

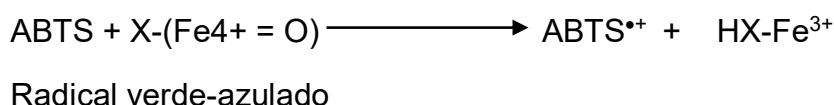
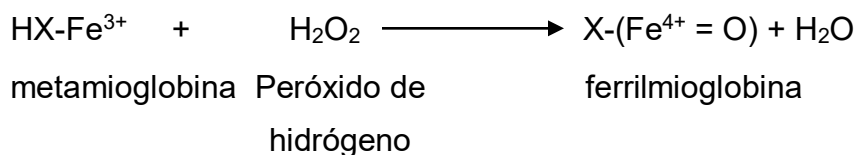


R2. Cromógeno 5x10 ml

R3. Sustrato 2x5 ml

CAL. Patrón 5x1 ml

Se trata de una prueba en donde se combinan la peroxidasa (metamioglobina) con peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'-azido-di-etilbenzotiazolin sulfanato) para dar como resultado la formación del radical catión ABTS^{•+}. Este radical presenta una coloración verde-azulada, la presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo ésta proporcional a la concentración de antioxidantes. La cinética de la reacción se mide a 600 nm.



Se utilizaron 300 μ l de plasma seminal que, al igual que en la determinación de MDA, la alícuota no debió de estar en congelación más de 1 mes; de igual manera, se descongeló a temperatura ambiente.

Los reactivos utilizados para determinar los TAS fueron: tampón (R1); cromógeno (R2), el cual se preparó con 10 ml de R1 y un vial de R2; sustrato (R3), que se preparó diluyendo 1 ml de R3 con 1.5 ml de R; y el patrón (CAL), donde se reconstruyó un vial de patrón con 1 ml de agua doblemente desionizada.

Debido a que los reactivos R2 y CAL eran funcionales hasta 2 días después de su preparación, conservándose a una temperatura de entre 2 y 8°C, y el R3 tenía una duración de 24 horas. Las muestras debían ser procesadas todas juntas y no una



por una, pues cada preparación de reactivos rendía para 10 muestras como mínimo.

La concentración de TAS en líquido seminal fue determinada con la ayuda de un analizador químico automático *SELECTRA JUNIOR*, en donde se colocaron las muestras y los reactivos. La concentración fue dada por el equipo en ($\mu\text{mol/l}$) de TAS.

Por cada muestra seminal, el lector utiliza 250 μl de R1, 50 μl de R2 y 5 μl de muestra seminal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó una prueba U de Mann-Whitney 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.



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Espermatobioscopías

Las tablas 6 y 7 muestran los valores de los 4 parámetros citológicos que se realizaron en la espermatobioscopia de los 25 sujetos estándares y de los 18 sujetos no estándares. Así como de las concentraciones de TAS y de MDA.

Tabla 6. Valores citológicos de las espermatobioscopías de donadores estándar, concentraciones de antioxidantes totales y malondialdehido de los individuos participantes

Código	TAS ($\mu\text{mol/l}$)	MDA ($\mu\text{mol/l}$)	DENSIDAD ($\times 10^6$ cel/ml)	MORFOLOGÍA (%)	VIABILIDAD (%)	PROGRESIÓN (%)
NL59	2.02	0.5684	78.25	25.25	67.75	74.00
NL-104	1.95	0.9028	62.50	22.25	62.50	68.50
NL-104	1.80	0.3937	80.00	30.75	63.75	65.25
NL-111	1.52	0.1818	56.50	24.50	71.25	76.00
NL-115	1.40	0.1194	85.88	24.75	69.25	65.00
NL-119	1.32	0.1517	42.38	25.25	66.75	75.75
NL-216	1.91	0.1506	21.50	35.50	37.75	12.75
NL-217	2.00	0.1958	34.50	19.50	69.75	35.75
NL-218	1.58	0.1189	34.75	53.75	56.00	70.50
NL-221	2.39	0.1286	42.13	20.00	74.50	79.00
NL-223	1.78	0.1313	41.50	35.00	70.00	39.00
NL-224	1.44	0.2388	39.75	24.50	74.50	73.00
NL-226	1.60	0.0684	103.90	36.25	76.25	51.25
NL-232	2.00	0.2458	129.25	33.75	81.25	79.25
NL-233	2.34	0.1657	188.00	22.00	75.25	60.00



NL-80	2.26	0.0630	43.38	18.25	64.75	77.75
NL-234	1.56	0.1840	94.87	42.50	40.00	65.25
NL-235	1.64	0.1071	170.75	29.00	71.75	69.25
NL-238	1.50	0.1259	53.75	22.50	52.50	63.00
NL-239	1.52	0.2076	69.38	54.00	42.00	58.50
NL-241	2.35	0.1614	77.88	20.25	77.75	75.25
NL-248	1.76	0.2738	31.25	20.50	58.75	72.00
NL-249	1.87	0.4254	102.75	20.25	45.50	57.75
NL-250	1.98	0.4103	74.73	18.25	70.75	68.30
NL-261	1.96	0.0915	89.50	18.00	75.50	58.75
OMS 1999			20-200	> 15	> 75	> 50

TAS= Total de antioxidantes; **MDA=** malondialdehído. **Las casillas remarcadas representan los el valor que más se aleja de la referencia.**



Tabla 7. Valores citológicos de las espermaticoscopías de donadores no estándar, concentraciones de antioxidantes totales y malondialdehído de los individuos participantes

Código	TAS ($\mu\text{mol/l}$)	MDA ($\mu\text{mol/l}$)	DENSIDAD ($\times 10^6$ cel/ml)	MORFOLOGÍA (%)	VIABILIDAD (%)	PROGRESIÓN (%)
NN-66	1.23	0.1818	259.50	25.50	78.25	81.75
NN-220	1.44	0.1662	44.00	13.50	67.25	73.00
NN-227	2.24	0.1555	8.15	25.25	37.50	17.50
NN-229	2.22	0.2205	17.50	22.25	66.00	59.25
NN-230	2.37	0.1958	105.50	14.50	89.00	32.00
NN-231	1.55	0.1700	17.60	12.50	82.50	73.00
NN-236	1.98	0.1426	35.25	8.25	38.75	60.25
NN-240	1.94	0.1877	450.50	12.50	54.25	69.50
NN-67	1.69	0.1576	3.85	1.75	20.50	25.50
NN-242	2.54	0.1608	151.50	10.75	70.25	83.00
NN-94	2.74	0.1549	19.60	12.25	67.75	69.50
NN-247	1.88	0.3910	286.76	29.25	45.75	74.25
NN-251	1.81	0.3942	109.38	11.00	43.25	66.25
NN-252	2.47	0.3506	115.25	9.25	54.25	29.25
NN-254	1.98	0.1657	29.13	11.50	66.25	57.00
NN-255	2.13	0.1834	65.50	11.25	72.75	70.00
NN-262	2.03	0.1565	76.63	12.25	69.00	75.25
NN-263	1.93	0.1495	148.25	12.00	72.75	80.75
OMS 1999			20-200 $\times 10^6$ cel/ml	> 15	> 75	> 50

TAS= Total de antioxidantes; **MDA=** malondialdehído. **Las casillas remarcadas representan los el valor que más se aleja de la referencia.**



En la tabla 8 se muestra la media y el error estándar del volumen, pH y de los 4 parámetros citológicos, así como del conteo de células redondas que se realizaron en la espermatobioscopia. Así mismo se presentan los valores de referencia de la OMS de 1999, los cuales se utilizaron en el estudio.

Tabla 8. Valores de las espermatobioscopias de sujetos clínicamente sanos

Valores	NL ($X \pm ee$)	NN ($X \pm ee$)	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 ($X10^6$ 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 ($X10^6$ células/ml)	7.03 \pm 1.40	6.80 \pm 1.60	< 5

NL= individuos estándar. NN= individuos no estándares, U de Mann-Whitney, *p < 0,05.

Tanto el color como la viscosidad son dos de los parámetros físicos que lamentablemente su medición es cualitativa y mucho depende del investigador la clasificación del color y viscosidad de la muestra seminal. Dentro de nuestros donadores, el NL-233 y el NN-262 presentaron un color amarillento, todos los demás mostraron un color opalescente. En cuanto a viscosidad, el 60% de los donadores NL presentaron una viscosidad en forma de gota, mientras que los



donadores NN, el 50% mostraron una viscosidad tipo gota. La figura 17 muestra la diferencia de los parámetros citológicos, pH y el volumen (parámetros físicos) entre los individuos estándares y no estándares. Se observa que los individuos estándares poseen valores más elevados en progresión, viabilidad y morfología. Mientras que en sujetos no estándares muestran valores más elevados en volumen y densidad.

El volumen de los donadores NL-233; NL-234; NL-238 y los NN-230; NN-251 y NN-252 fue menor al establecido por la OMS 1999. Siendo los sujetos NL-238 y NN-251 quienes presentaron el volumen más bajo (1.2 ml). Sólo dos presentaron un volumen por encima del límite: NL-239 y el NN-254. El sujeto NL-254 presentó el volumen más elevado de todas las espermatozoides realizadas (7.7 ml).

En cuanto a la densidad espermática, hubieron cuatro donadores que presentaron oligozoospermia (NN-94; NN-67; NN-227; NN-229 y NN-231) siendo el sujeto NN-67 el más bajo dentro de todos los donadores con una densidad de 3.85×10^6 cel./ml y tres individuos NN resultaron ser polizoospermicos (NN-66; NN-240 y NN-247), siendo el NN-240 quien presentó una mayor polizoospermia con 450.5×10^6 cel./ml.

La movilidad espermática se evaluó obteniendo los porcentajes de movilidad de los espermatozoides (rápidos + lentos). Los donadores NL-216 y NL-223; NN-67, NN-227, NN-230 y NN-252 mostraron una movilidad menor al 50%, es decir, que presentaron una condición de astenozoospermia. El donador que presentó el menor porcentaje de espermatozoides móviles fue el NL-216, con un 12.75% de movilidad.

De todos los sujetos muestreados, más del 83% mostraron baja viabilidad (NL y NN). El sujeto que presentó la menor viabilidad fue el NN-227 con un 37.5%.

Respecto a la morfología, todos los donadores NN presentaron una morfología baja, incluso cuando alguno de ellos mostró una densidad normal. El porcentaje



reportado con la mayor teratozoospermia fue de 1.75% de formas normales (NN67). En el conteo de células redondas (C.R.) el grupo de estándares mostró tener mayor significancia sobre el grupo de los no estándares, siendo los donadores NL-235 y NN-240 quienes tuvieron un mayor número de células redondas (29.38×10^6 cel/ml y 28.15×10^6 cel/ml).



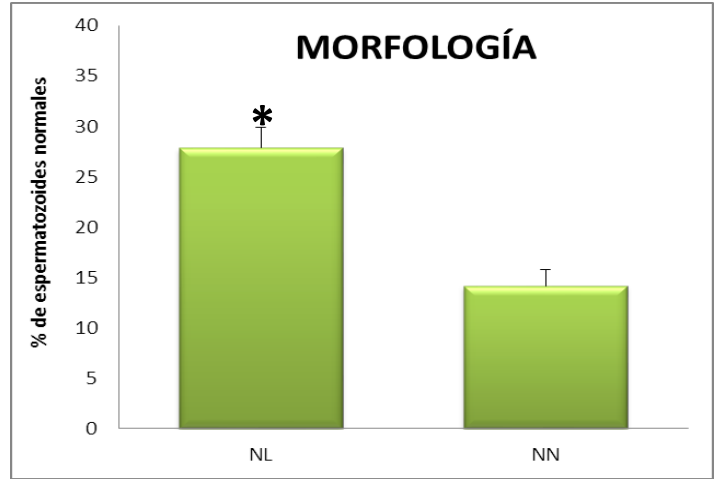
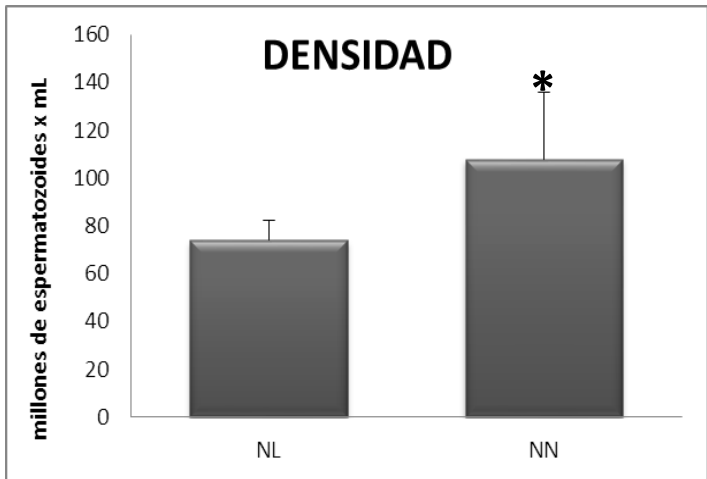
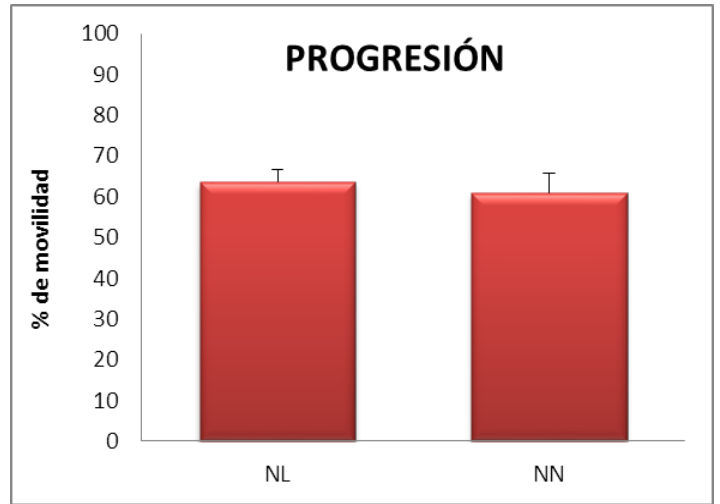
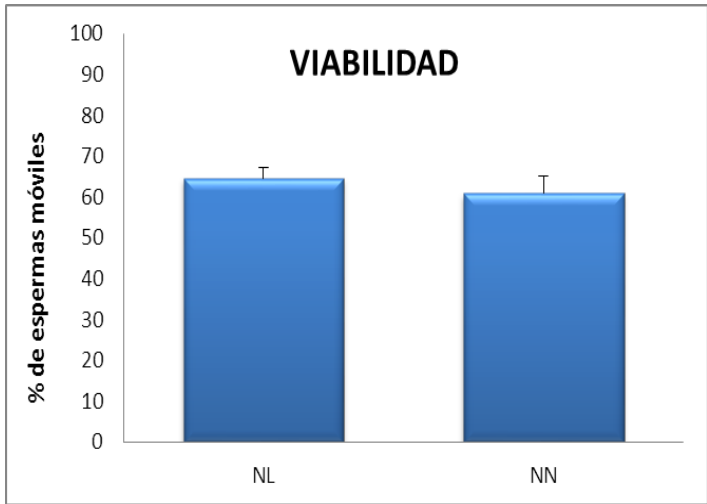
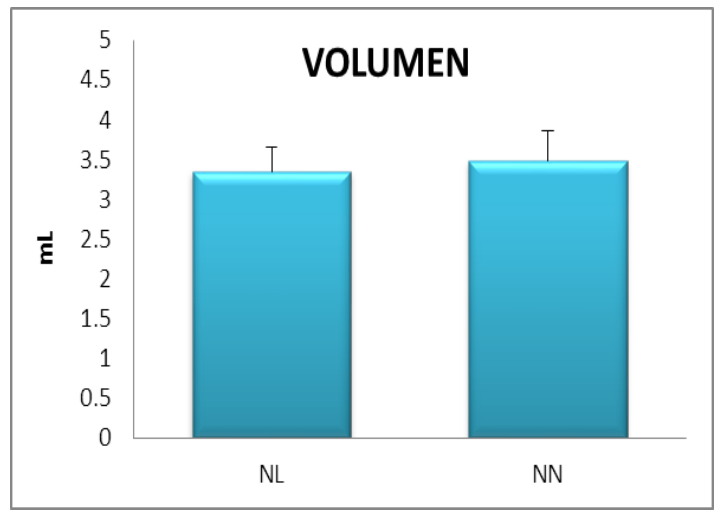
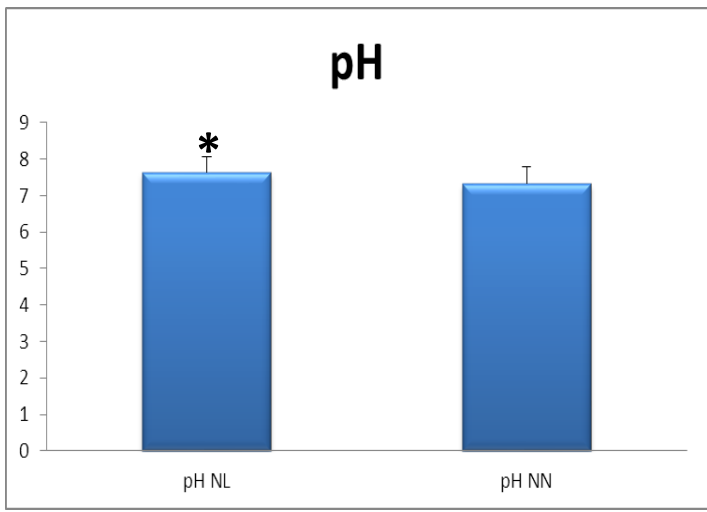


Figura 17. Valores citológicos y volumen (parámetro físico) de la espermatooscopia en sujetos estándares (NL) y no estándares (NN); U de Mann-Whitney *p < 0,05



TAS y MDA

Las concentraciones de TAS y MDA fueron determinadas en 25 sujetos estándares y en 18 no estándares (tabla 8). No hubo diferencias significativas para las concentraciones de TAS y MDA en ambos grupos de donadores.

Tabla 8. Concentraciones de malondialdehído y antioxidantes totales en sujetos clínicamente sanos

	NL (X±ee)	NN (X±ee)	Concentración de referencia (μmol/l)
MDA (μmol/l)	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.33
TAS(μmol/l)	1.81± 0.06	2.0± 0.09	0.5 - 1.4

Malondialdehído = MDA, antioxidantes = TAS, NL= individuos estándar media ± error estándar, NN= individuos no estándares media ± error estándar, U de Mann-Whitney *p < 0,05.



Para la determinar la concentración de MDA en el plasma seminal, se realizó una curva patrón en donde se extrapolaron las concentraciones tanto de sujetos estándares (24) y no estándares (14). Se utilizó la misma curva patrón para ambos grupos. Con un coeficiente de correlación $R^2=0.9991$ (figura 18).

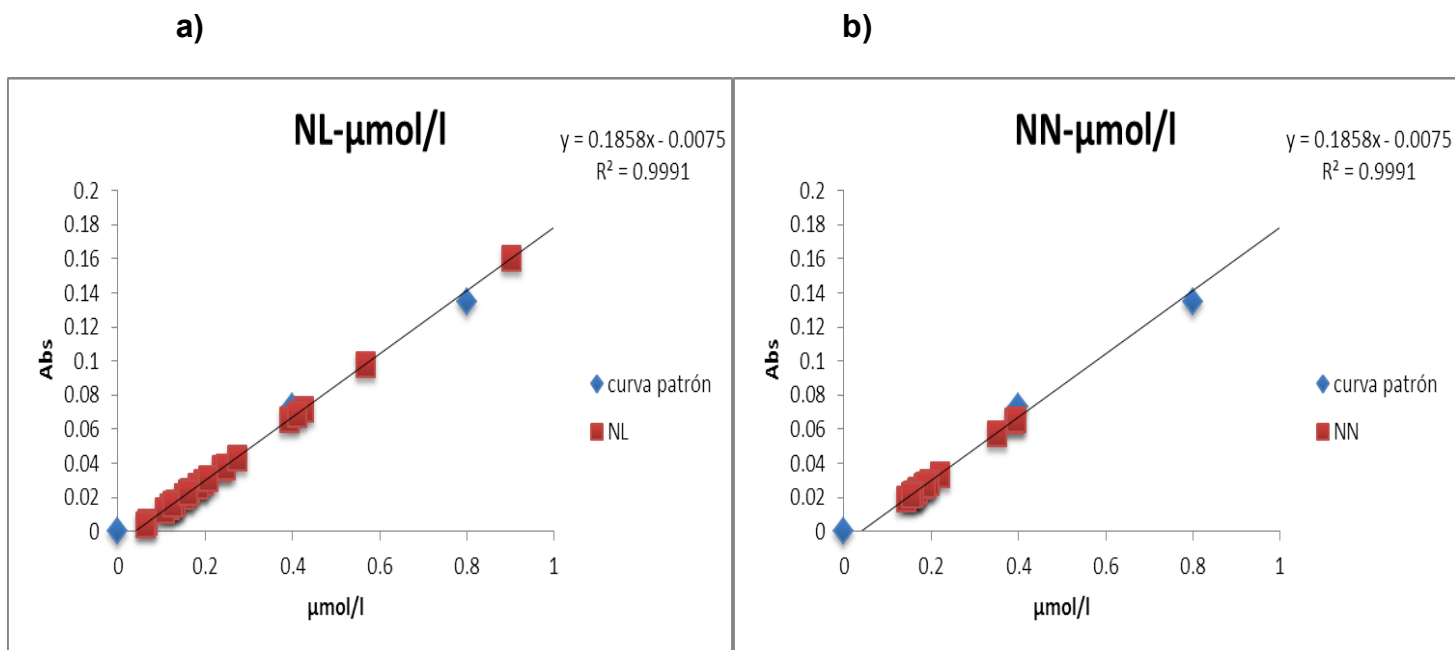


Figura 18. Curva estándar para la determinación de MDA. a) Curva patrón para sujetos estándares NL y b) curva patrón para sujetos no estándares NN. El eje de las X representa la concentración en µmol/l de MDA y en el eje de las Y representa el delta de las absorbancias a 535 y 572 nm.



La concentración de TAS (antioxidantes totales) no mostró diferencias significativas en individuos no estándares (2.01 ± 0.10) y en sujetos estándares (1.81 ± 0.06) (Figura 19).

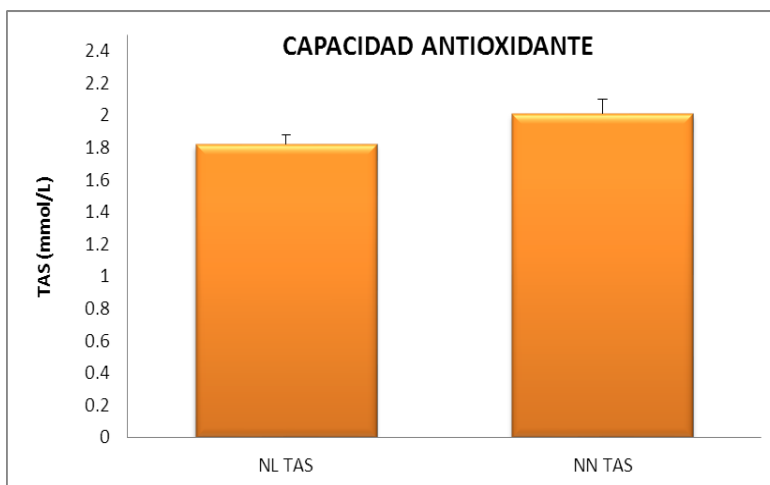


Figura 19. Concentración de antioxidantes totales en sujetos estándares NL y no estándares NN. U de Mann-Whitney * $p < 0,05$

La lipoperoxidación de sujetos estándares y en no estándares fue de 0.23 ± 0.038 y 0.21 ± 0.024 respectivamente, sin existir diferencias significativas (figura 20).

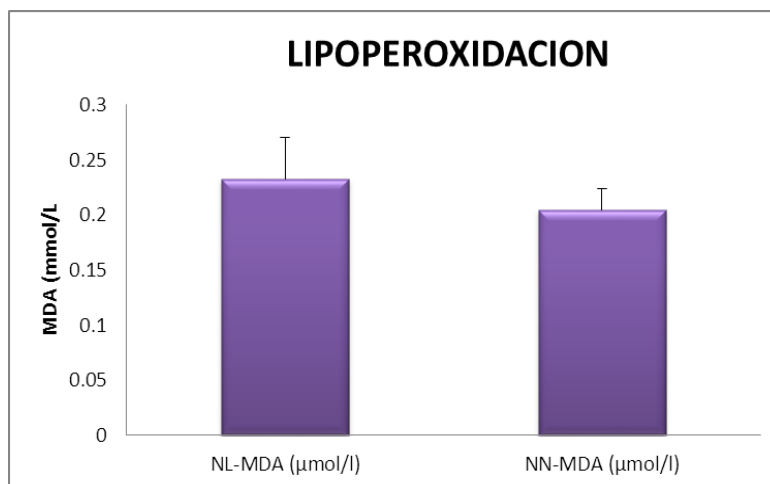


Figura 20. Concentración de MDA en sujetos estándares (NL) y no estándares (NN), U de Mann-Whitney * $p < 0,05$.



Relación TAS-MDA y espermatobioscopía

Se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) que es una técnica estadística de síntesis de información siendo su objetivo reducir a un menor número de variables perdiendo la menor cantidad de información posible. Este método intenta ordenar un conjunto de variables que pueden estar relacionadas o no estarlo y que expliquen la variación entre los datos en conjunto.

Se evaluó la relación entre 6 variables: antioxidantes, malondialdehído y los 4 parámetros citológicos de la espermatobioscopía (densidad, progresión, viabilidad y morfología) 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 este caso, 3 componentes se han extraído puesto que 3 componentes tuvieron eigenvalores (covarianza) mayores o iguales que 1.0. En conjunto ellos explican 66.408% de la variabilidad en los datos originales (tabla 9).

Tabla 9. Análisis de Componentes Principales de las 43 muestras seminales

<i>Componente</i>		<i>Porcentaje de</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Número</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Varianza</i>	<i>Acumulado</i>
1	1.46425	24.404	24.404
2	1.43077	23.846	48.250
3	1.08947	18.158	66.408
4	0.942024	15.700	82.108
5	0.657962	10.966	93.074
6	0.415532	6.926	100.000

En la figura 21, cada uno de los cuadros azules representa un individuo, 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.

En la tabla 10 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: se observa que hay una relación directamente proporcional entre: TAS-viabilidad; TAS-MDA; progresión-viabilidad; progresión-densidad. Hubo una relación inversamente proporcional entre MDA y morfología, es decir, que a menor MDA hay una mayor o mejor morfología; morfología-TAS; morfología-viabilidad; morfología-progresión; MDA-densidad; MDA-progresión; MDA-viabilidad; progresión-TAS. Quienes no mostraron tener relación alguna fueron densidad-TAS y densidad-morfología (figura 21).

Tabla 10. Pesos de los componentes principales de las 43 muestras seminales

Variables	Componente	Componente	Componente
	1	2	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



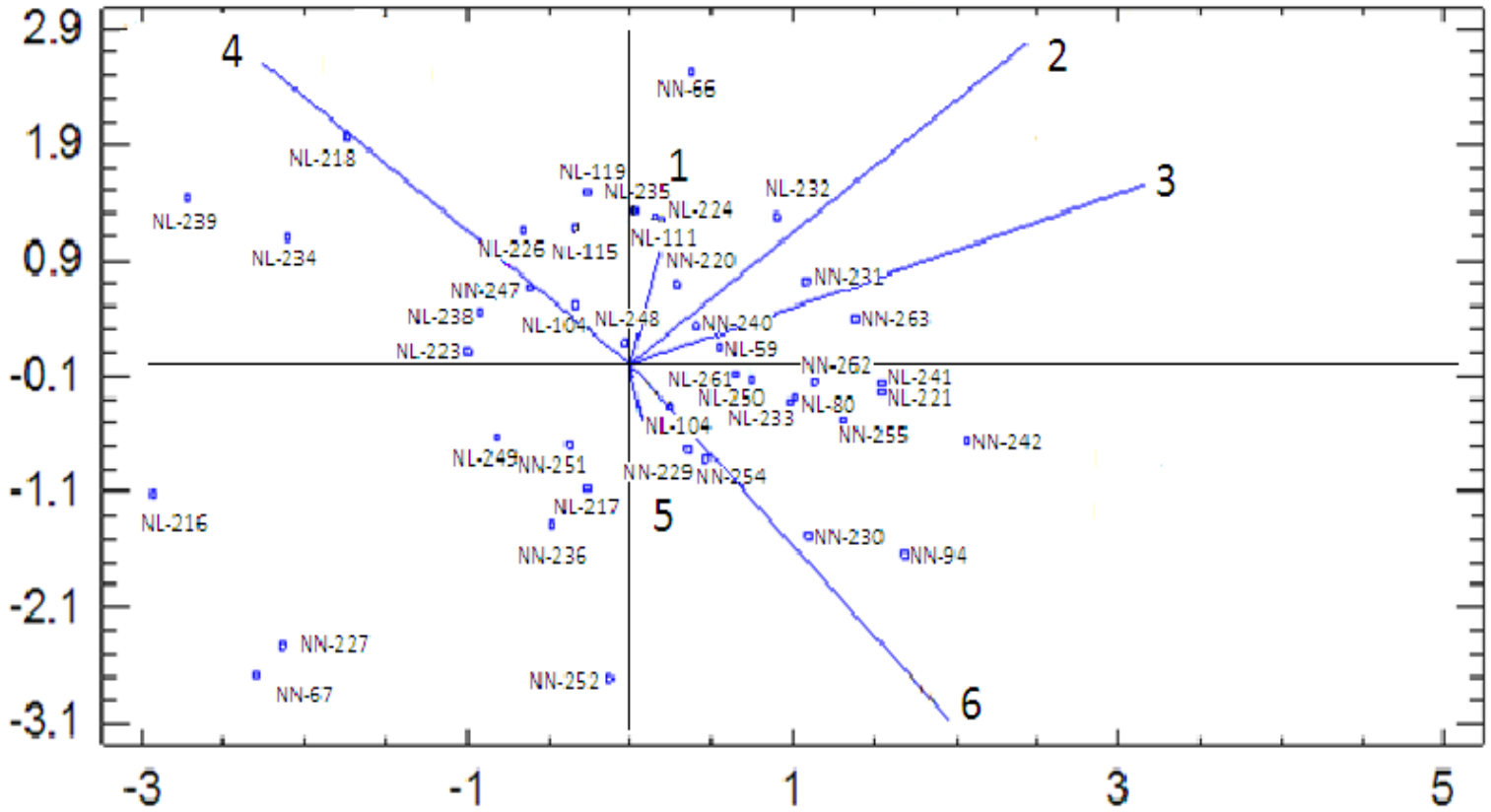


Figura 21. Análisis de componentes principales. Se muestran los 43 donadores (cuadros azules) y su relación con los 6 valores evaluados (líneas azules): (1) densidad, (2) progresión, (3) viabilidad, (4) morfología, (5) malondialdehído, (6) antioxidantes totales.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Espermatobioscopía

Las espermatobioscopías de los 43 donadores se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos por las OMS, 1999. Los criterios que se toman en cuenta para determinar la condición de un donador (estándar: NL y no estándar: NN) son: **la densidad**: ya que al tener un buen conteo de células espermáticas, aumentan las probabilidades de que se lleve a cabo la fecundación y; **la morfología**: pues si el espermatozoide no tiene defectos en pieza media y flagelo, le será más fácil viajar hasta donde está el ovulo y cumplir su objetivo. Si estas dos estructuras no tienen problemas, la movilidad del espermatozoide será correcta. Además, en la cabeza se encuentra el material genético, es por eso que si la cabeza tiene algún defecto, se corre el riesgo de que el material genético esté dañado y al momento de llevarse la fecundación puedan ocurrir eventos como un aborto espontaneo o algunas aberraciones cromosómicas en el feto (World Health Organization, 1999).

Se utilizó el manual de la OMS de 1999 debido a que en la última edición del 2010 los valores de referencia son muy bajos. Esto genera un gran problema pues no se asegura que un donador tenga una buena calidad seminal al evaluarlo con valores de referencia tan bajos y por consecuencia aumentan las probabilidades de que la muestra seminal sea poco viable para la fecundación. Además, en el último manual de la OMS se estableció el concepto de “**límite de referencia inferior**” (LRI). Los valores que se encuentren por encima del límite no garantizan una fecundación exitosa y un posterior embarazo, pero amplían sus posibilidades. El LRI y los valores han ido disminuyendo con el paso de los años debido a las costumbres de la sociedad y a los nuevos hábitos de vida tales como la alimentación, tabaco, tóxicos ambientales, etc. (tabla 2) (World Health Organization, 2010).



Nuestros resultados muestran que existe relación entre la calidad seminal de los donadores muestreados y los valores de referencia del manual de la OMS, ya que el 58% de las muestras concuerdan con lo establecido por dicho manual.

A pesar de ser donadores estándar, la densidad promedio de nuestros donadores (73.31×10^6 espermatozoides por mililitro) está por encima de lo reportado por Rao *et al.*, en 2015, pues reportaron en sujetos estándar una media de 148.1×10^6 espermatozoides por mililitro. Axelsson *et al.*, en 2011 y Mendiola *et al.*, en 2013, reportaron 71 y 52.1×10^6 espermatozoides por mililitro, respectivamente. Dichos estudios, siguieron los valores de referencia de la OMS de 1999.

En cuanto a la morfología, nuestro grupo de donadores estándar mostró una media de 28.86% de formas normales. Rodríguez *et al.*, en 2011 reportó en un grupo de 11 donadores con buena calidad seminal, una media de 20.5% de formas normales.

Godoy *et al.*, en 2009 reportaron que en 100 muestras seminales, el 89% de las muestras mostraron una morfología normal, mientras que el 87% presentó una concentración de espermatozoides/ml dentro de lo establecido por la OMS.

ERO en espermatozoide

Se ha determinado que las ERO pueden funcionar como moléculas de señalización. Además existe evidencia que sugiere que los espermatozoides pueden producir concentraciones bajas y controladas de ERO, específicamente de $O_2\cdot^-$ y H_2O_2 , las cuales promueven los procesos de capacitación, hiperactivación y la reacción del acrosoma, las mismas que son cruciales para la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide. También se ha determinado que condiciones oxidativas leves resultantes de bajas concentraciones de ERO pueden estimular la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida (Bansal & Bilaspuri, 2011). Las ERO también resultan nocivas para los espermatozoides



cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular (Makker *et al.*, 2009). Debido a que siempre existirá la presencia de formas inmaduras dentro del eyaculado, las ERO estarán inevitablemente presentes, lo que puede diferenciar la condición de estrés oxidativo es qué tantas células anormales se presenten en la muestra seminal. Y no únicamente la generación de ERO es a causa de células inmaduras, también la presencia de leucocitos y células epiteliales generan cierta cantidad de ERO. Incluso si existe polizoospermia, la producción de ERO será mayor, gracias a la gran cantidad de células espermáticas presentes en el eyaculado (Makker *et al.*, 2009).

En nuestras muestras seminales, las formas inmaduras estuvieron presentes en ambos grupos de donadores. Fue en los donadores NN donde se presentó mayor presencia de espermatozoides inmaduros, por lo que se esperaría una mayor lipoperoxidación en este grupo. Nuestros resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de MDA en donadores NL y NN.

En cuanto a las células redondas presentes en el eyaculado, tampoco existieron diferencias significativas en nuestros grupos de donadores. Esto justifica el hecho de que nuestros donadores no presentaran diferencias significativas en las concentraciones de MDA, ya que Makker *et al.*, en 2009 reporta que la presencia de células redondas incrementa la cantidad de ERO.

Mahfouz *et al.*, en 2010 determinó que tanto las formas maduras como inmaduras de espermatozoides producen normalmente ERO, siendo esta producción más elevada en las formas inmaduras. Además se comprobó que medios con elevada concentración de H_2O_2 afectan en menor grado la viabilidad de los espermatozoides, a diferencia de los medios con elevada concentración de $O_2^{\cdot-}$ el cual es más letal.



Lipoperoxidación

Los lípidos son considerados como una de las macromoléculas más susceptibles a la peroxidación y están presentes en la membrana celular en forma de PUFA (polyunsaturated fatty acids o ácidos grasos polinsaturados) por sus siglas en inglés. Los ácidos grasos presentes en la membrana contienen doble enlace carbono-carbono, condición que le permite a la membrana tener fluidez (Agarwal & Saleh, 2002). Los PUFA están expuestas a una cascada de reacciones químicas llamada lipoperoxidación. La peroxidación en los PUFA da como resultado pérdida de la fluidez de la membrana y una reducción en la actividad de los canales de iones. Debido a que la membrana espermática está constituida por ácidos grasos poli-insaturados, está bajo constante ataque por parte de las ERO, por los cuales se evaluó la lipoperoxidación. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de MDA en donadores NL y NN.

Un estudio realizado por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, demostró que fumar es uno de los factores prominentes que contribuyen al bajo conteo espermático en hombres. En los fumadores se incrementa en un 48 % la concentración de leucocitos en el líquido seminal e incrementa en un 107 % la generación de ERO (Saleh *et al.*, 2002). Nuestros donadores NL son más fumadores que los sujetos NN, pues el 44% de los sujetos NL fuman y el 22% de los donadores NN son fumadores, y a pesar de eso, no hubo diferencias significativas en la concentración de MDA en nuestro grupo de estudio.

Un incremento de las ERO puede ocasionar baja movilidad en el espermatozoide (Lenzi *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1999). Existen dos hipótesis de cómo es que sucede esto: una hipótesis sugiere que el H_2O_2 se difunde a través de la membrana espermática e inhibe la actividad de algunas enzimas (Aitken, 1997). Otra teoría involucra a eventos que dan como resultado una disminución en la fosforilación de proteínas del **axonema**, inmovilizando al espermatozoide. También se le relaciona con la fluidez de la membrana, que es necesaria para la



fusión del espermatozoide con el ovulo (De Lamirande & Gagnon, 1992). Además, la capacidad que tienen los antioxidantes para devolverle la movilidad a los espermatozoides, es una prueba de que la lipoperoxidación afecta a ésta condición (Agarwal *et al.*, 2006).

En nuestros donadores, el análisis de componentes principales (figura 21) muestra que hay relación inversamente proporcional entre MDA-progresión (a mayor MDA, menor progresión). El EOX ha sido considerado como un importante factor que contribuye a infertilidad masculina. Los estudios han demostrado que concentraciones bajas y controladas de ERO juegan un papel importante en los procesos fisiológicos normales de espermatozoides tales como **capacitación**, **hiperactivación**, **reacción acrosomal** y la **señalización**, procesos para asegurar una apropiada fertilización. Además, existe una creciente evidencia de que un aumento de las ERO general deteriora significativamente la función y supervivencia del espermatozoide.

Se ha demostrado que el incremento de las ERO provoca infertilidad masculina, a través de mecanismos que implican la inducción de daño peroxidativo en la membrana espermática, daño en el ADN, y la apoptosis. ERO deben mantenerse en niveles adecuados para garantizar la adecuada la función fisiológica del espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2014).

Una de las causas de generación de ERO en las muestras seminales y una consecuente lipoperoxidación es la congelación de muestras. Ya que las muestras permanecieron congeladas hasta el momento de ser evaluadas, es probable que la peroxidación lipídica observada luego del descongelamiento haya sido causada durante el proceso de almacenamiento, particularmente en temperaturas cercanas a los 4°C, en donde se producen las mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (Saleh & Agarwal, 2002). El congelamiento y descongelamiento del espermatozoide causa una alta y considerable disminución en la movilidad y la actividad metabólica del espermatozoide (Park *et al.*, 2003). El daño producido en el



espermatozoide por la congelación y posterior descongelación tiene lugar a distintos niveles estructurales y/o funcionales, por lo que todavía no existe un método de criopreservación espermática universalmente aceptado que logre mejores tasas de criosupervivencia (Castilla *et al.*, 2008).

Las muestras con las que se trabajaron se mantuvieron en congelación durante un mes y no recibieron tratamiento alguno para retrasar la lipoperoxidación ni para neutralizar el ataque de las ERO, o algún crioprotector para evitar el daño por congelamiento. Se decidió guardarlas durante ése periodo de tiempo ya que no existe algún registro o estudio donde se especifique la duración del sistema antioxidante del espermatozoide cuando éste es congelado. Aunque (Gallardo, 2007; Rodríguez *et al.*, en 2011), mencionan que mantuvieron sus muestras en congelación hasta el día de su utilización, sin especificar el tiempo. Sin embargo, nuestras muestras únicamente sufrieron un proceso de congelamiento y descongelamiento, por lo que el daño causado por dicho proceso fue mínimo.

Rodríguez *et al.*, en 2011, evaluó la calidad seminal de sujetos cuyas parejas habían tenido muerte embrionaria y los comparó con otro grupo el cual sus parejas nunca habían presentado dicha condición. Además evaluó la concentración de MDA. Dicho estudio reveló que no existió diferencia significativa entre ambos grupos (0.08 ± 0.05 para grupo control y 0.11 ± 0.1 para grupo de estudio, con $p < 0.05$).

Nuestros donadores no tenían parejas que hubiesen presentado muerte embrionaria presentaban alguna anomalía en alguno de los parámetros evaluados en la espermatobioscopia, tampoco presentaron alguna enfermedad idiopática la cual les pudiera afectar alguno de los valores espermáticos. Es por eso que no existió diferencia significativa en las concentraciones de MDA en donadores NL y NN.



TAS

Estudios han demostrado que los antioxidantes protegen a los espermatozoides de las ERO, evitando anomalías en el esperma, removiendo las ERO generadas por leucocitos, previniendo la fragmentación del DNA, mejoran la calidad seminal, reducen el daño por criopreservación bloquea la maduración prematura del espermatozoide y, en general, lo estimula (Agarwal *et al.*, 2007).

Los antioxidantes como la vitamina E y C, GPX, SOD, CAT, albumina, taurina e hipotaurina previenen la reducción en el movimiento espermático, mientras que N-acetil-cisteína y la coenzima Q-10 incrementa su movilidad (Karbownik *et al.*, 2001).

También han demostrado que pueden prevenir la fragmentación del ADN inducido por las ERO (Greco *et al.*, 2005). Todos ellos neutralizan el exceso de ROS, previniendo el daño estructural y funcional de la célula espermática (Bansal *et al.*, 2011). De ahí la importancia de tener un buen sistema antioxidante, pues desactivan a las ERO de forma continua para mantener sólo una pequeña cantidad necesaria para mantener la función normal de los espermatozoides (Venero, 2002).

Mahfouz *et al.*, en 2010 comprobó que durante los procesos de centrifugación (y criopreservación (Wang *et al.*, 1997) se elevan los niveles de ROS. Durante el proceso de centrifugación se ha demostrado que aumenta la producción de ROS y causa EOX en gametos masculinos. En un estudio realizado por Agarwal *et al.*, en 2003, se informó que la producción de ERO por espermatozoides humanos aumentó significativamente cuando se expusieron a los espermatozoides ciclos repetidos de centrifugación. Nuestras muestras procesadas únicamente se sometieron a un ciclo de centrifugado, con el fin de separar las células espermáticas del plasma seminal, por lo cual no es posible que la producción de ERO aumentara de manera significativa.



La actividad antioxidante se reduce cuando el semen está congelado puesto que no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas, es decir, a temperaturas tan bajas el metabolismo celular es muy lento (Castilla *et al.*, 2008, Jiménez *et al.*, 2011), por lo que la actividad antioxidante de nuestras muestras fue mínima, asegurando así la concentración de antioxidantes totales presentes en el líquido seminal durante su periodo de congelación.

Nuestros resultados muestran que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos NL y NN (1.81 ± 0.06 y 2.01 ± 0.10 , respectivamente). Nuestros donadores no presentaban alguna enfermedad idiopática la cual les pudiera alterar los valores espermáticos y mucho menos eran infértiles. Ambos grupos de donadores mostraron ser clínicamente sanos y no tenían parejas que hubieran presentado abortos espontáneos. Fingerova *et al.*, en 2007 mostraron que los valores para TAS en plasma seminal en el grupo de estudio (infértiles normozoospermicos) fueron significativamente más bajos ($p < 0.02$) que en el grupo control (fértil normozoospermicos) (2.15 ± 0.29 VS 2.32 ± 0.33 , respectivamente). También encontró una baja relación entre TAS en plasma seminal (2.00 ± 0.17 mmol/l) en 5 muestras de hombres infértiles con alta producción de ERO en el espermatozoide. Otro estudio reveló que la capacidad antioxidante entre un grupo fértil y otro no fértil que hubo una diferencia significativa entre ambos grupos (2.02 ± 0.16 mmol/l) (1.78 ± 0.23 mmol/l) ($p < .01$) (Koca *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, la condición de fumador favorece la lipoperoxidación de la membrana espermática. Pero no sólo eso, ya que Mostafa *et al.*, en 2006, demostró que los fumadores presentan una disminución en el contenido de antioxidantes como vitamina C y E en el plasma seminal, lo cual hace más vulnerable el espermatozoide a la oxidación. En nuestros donadores, no hubo diferencias significativas en las concentraciones de TAS entre sujetos NL y NN. Esto lleva a pensar que la condición de fumador o el hábito de fumar no influyen en la concentración de antioxidantes totales de nuestros donadores.



Siciliano *et al.*, en 2001 y Carpino *et al.*, 2004) analizaron 25 muestras de sujetos normozoospermicos obteniendo niveles de TAS de 1.21 ± 0.16 mmol/l y en otro grupo control de 18 muestras con una media de TAS de 1.19 con un rango desde 1.0 a 1.4 mmol/l, respectivamente. Altos niveles de TAS 2.02 ± 0.16 mmol/l han sido reportados en 20 donadores fértiles de origen turco (Koca *et al.*, 2003). Pacientes con fertilidad comprobada mostraron altos niveles de antioxidantes (mediana y rango de mM equivalentes en Trolox): 1700 (1440–2290 mM); comparado con los donadores con infertilidad comprobada: 1310 (1040–1600 mM). ($p < .001$) (Mahfouz, 2009).

Los antioxidantes del plasma seminal son el mecanismo de defensa de los espermatozoides contra las ERO. Se ha demostrado que la baja capacidad antioxidante en el semen está relacionada con la infertilidad masculina (Aitken, 1999; Said *et al.*, 2003; Agarwal & Prabakaran, 2005; Agarwal & Allamaneni, 2006). La capacidad antioxidante del plasma seminal puede estar influida por una amplia gama de los factores tales como la nutrición, el suministro de vitamina, la edad, infecciones, etc.); por lo tanto, es importante estimar con precisión la cantidad antioxidante total del plasma seminal (Miller, 2001; Kampa, 2002).

Relación MDA-TAS y espermátobioscopía

Tavilani y cols., en 2008 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 demostraron 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. Dentro de nuestros donadores, se presentó 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 (Tavilani *et al.*, 2008).

De acuerdo con el análisis de componentes principales (figura 21), 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 (Shiva *et al.*, 2011; Atig *et al.*, 2013), además se ha visto en pacientes con oligoteratozoospermia que la actividad de estas enzimas esta disminuida significativamente (Atig, 2013).

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 (Sanocka *et al.*, 1997). A diferencia de nuestros resultados, los donadores no mostraron relación entre la concentración de antioxidantes con la movilidad; tampoco densidad-TAS. Morfología y progresión presentaron una relación inversa; al igual que TAS y morfología; TAS-densidad no se relacionan. 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.

En nuestro grupo de estudio, no se puede determinar si un donador mostró altas o bajas concentraciones de antioxidantes totales y de MDA, y relacionarlas con teratozoospermia, oligospermia o astenozoospermia, puesto que no existen como tal valores de referencia bien establecidos para determinar si las concentraciones de TAS y MDA son elevadas o no.

En cuanto a las concentraciones bajas de malondialdehído y altos niveles de antioxidantes en sujetos NN, se debió a que éstos presentan una mayor cantidad de ERO provocado por factores como: alto porcentaje de células inmaduras y/o anormales, células espermáticas muertas, células epiteliales y redondas. Éstas condiciones favorecen a una elevada producción de ERO en el líquido seminal (Gallardo, J. 2007; Makker *et al.*, en 2009) y gracias a ésa condición, el sistema antioxidante del líquido seminal pudo haber trabajado de manera más eficaz para amortiguar la cantidad de ERO que eventualmente pudieran causar daño al espermatozoide, es por eso que al haber mayor cantidad de antioxidantes, es que se previno la lipoperoxidación en las muestras de sujetos NN. Caso contrario a lo que sucedió con sujetos NL, pues en ellos, al haber poca presencia de ERO, los antioxidantes no actuaron como lo hicieron en el otro grupo. Aunque no se puede asegurar si en los sujetos NL los antioxidantes actuaron de manera normal o si la lipoperoxidación que presentaron las membranas espermáticas es natural, pues no se tienen valores de referencia que puedan respaldar nuestros resultados, es evidente que las células de los donadores no estándar están mejor protegidas



que las células espermáticas de los donadores estándar. La situación de los donadores estándar hace referencia a que los antioxidantes no actúan como tal para proteger a la célula, sino para controlar la cantidad de ERO, que son los que dañan al espermatozoide.

Al evaluar la asociación entre la calidad seminal y la integridad del ADN con el estrés oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes, se ha encontrado que la concentración espermática, la movilidad progresiva y el porcentaje de morfología normal se correlacionan positivamente con la actividad de las enzimas CAT y SOD, mientras que existe una correlación negativa de estos parámetros seminales con la peroxidación lipídica (Shiva *et al.*, 2011).

Los resultados pueden ser un tanto controversiales posiblemente debido a los hábitos de los individuos de los 2 grupos de estudio, ya que existen variables como la alimentación o consumo de sustancias como el tabaco o el alcohol que potencialmente podrían estar alterando los resultados, únicamente se fijó la atención en aquellos que fueran clínicamente sanos.

La relación entre las ERO y la baja calidad seminal ha sido establecida. Independientemente de la manifestación clínica y los resultados de análisis de semen, la presencia de nivel de ERO anormal juega un papel importante en la calidad seminal y, por ende de la infertilidad masculina. Quizá un análisis de correlación más específico pueda a determinar qué tan fuerte es ésta relación.



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, **si** hubo donadores con mala calidad seminal.
- ✓ De los valores seminales citológicos, la **morfología** se ve disminuida ya que se observó mayor porcentaje de espermatozoides anormales en el grupo **no estandar (NN)**.
- ✓ No hubo diferencias significas en las concentraciones de TAS ni de MDA en ambos grupos de donadores.
- ✓ De acuerdo al análisis de componentes principales, MDA-densidad; MDA-morfología guardan una relación inversamente proporcional, al igual que morfología-TAS. No existe relación entre las concentraciones de TAS con la densidad.
- ✓ En el **análisis de componentes** muestra que, la viabilidad y la progresión son las variables de mayor peso estadísticamente hablando, y las que mayor relación directa guardan entre sí.

PERSPECTIVAS

- ✓ Aumentar el número de muestras seminales para establecer valores de referencia de antioxidantes totales en líquido seminal de humano. Así como establecer un valor de referencia de MDA (del grado de lipoperoxidación de la membrana espermática).
- ✓ Observar la relación que hay entre los antioxidantes totales presentes en líquido seminal y la concentración de MDA en donadores que presentaron algún tipo de cáncer (linfoma de Hodgkin, por ejemplo) y que estuvieron sometidos a tratamiento quimioterapéutico y los TAS y MDA con un grupo de donadores sano.
- ✓ Realizar un ensayo de quimioluminiscencia, en el cual se pueda observar la concentración de las diferentes ERO producidos por el espermatozoide. Es bien sabido que las ERO más representativas son el $O_2\cdot^-$ y el H_2O_2 , pero el objetivo sería establecer el porcentaje de éstas ERO producidas por el espermatozoide.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal A, Makker K, Sharma R, Ashok Agarwal. (2008). "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update". *Am J Reprod Immunol.* 59, 2-11.
2. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. (2006). "Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis". *Reprod Biomed Online.* 12, 630-3.
3. Agarwal A, Prabakaran S. (2005). "Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology". *Indian J Exp Biol.* 43:963-74.
4. Agarwal A. (2003). "Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility". In: De Vriese S, Christophe A, editors. *Male fertility and lipid metabolism.* Champaign, IL: AOCS Press. 157.
5. Agarwal, A., Allamaneni, S. (2006). "Oxidative stress and human reproduction". In: Singh, K. K. *Oxidative Stress, Disease and Cancer.* Imperial College Press, (pp. 687-703). New York.
6. Agarwal, A., Gupta, S. and Sikka, S. (2006). "The role of free radicals and antioxidants in reproduction". *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18:325-332.
7. Agarwal, A., Gurpriya, V., Ong, C., Plessis, S. (2014). "Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction". *World J Mens Health.* 32: 1-17
8. Agarwal, A., Nallella, K., Allamaneni, S., Said, T. (2004). "Role of antioxidants in treatment of male infertility". An overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online* 8, 616-627.
9. Agarwal, A., Prabakaran, S. (2005). "Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology". *Indian J. Exp. Biol.* 43, 963-974.
10. 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.
11. Agarwal, A., Said M. (2003). "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA in male infertility". *Hum Reprod Update* 9, 331-345.
12. Agarwal, A., Saleh, R. (2002). "Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment". *Urol. Clin. North Am.* 29, 817-827.
13. Agarwal, A., Saleh, R., Bedaiwy, M. (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction". *Fertil Steril.* 79, 829-43.
14. Aitken, R. (1997). "Molecular mechanisms regulating human sperm function". *Mol. Hum. Reprod.* 3,169-173.
15. Aitken, R. (1999). "The Amoroso lecture. The human spermatozoon, a cell in crisis?" *J Reprod Fertil.* 115, 1-7.
16. Aitken, R. Buckinham D. Bridle J. Gómez E. Baker H.W. Irvine S.D. (1995). "Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma". *Hum Reprod.* 10, 2061-2071.
17. Andrade, F. (2003). "Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine test". *J Clin Lab Anal,* 17, 247-258.
18. Armstrong, J., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. and Sikka, S. (1999). "Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism". *Free Radic. Biol. Med.* 26, 869-880.
19. 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.
20. 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, 1012-6.
21. Bansal A, Bilaspuri, G. (2011). "Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions". *Vet Med Int.* 11, 1-7.
22. Boveris, A., M.G. Repetto, A.D. Boveris & L.B. Valdéz. (2008). "Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas". En: M. Konigsberg-Fainsten (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas.* Manual Moderno, (pp. 319-328). México, D.F.
23. Buonocore, G, Perrone, S, Tataranno, M. (2010). "Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species". *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15, 186-190.
24. Cárdenas, N., Medina, O., Pedraza, J. (2008). "Glutatión peroxidasa: Una familia de enzimas". En: M. Konigsberg-Fainstein (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas.* Manual Moderno. (pp 201-217). México, D.F.
25. Carlson, B. M. (2005). "Embriología Humana y Biología del Desarrollo". (3ª ed). (Pp. 13- 16) Ed. Elsevier
26. Carpino, A., Tarantino, P., Rago, V., De Sanctis, V., Siciliano, L. (2004). "Antioxidant capacity in seminal plasma of transfusion-dependent beta-thalassemic patients". *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 112, 131-134.
27. Castilla, J., Ramos, B., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., López, M. (2008). "Criopreservación de semen. Últimos avances". *Cuad. Med. Reprod.* 14, 5-12.



28. Chen, S., Allam, J., Duan, Y., Haidl, G. (2013). "Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches". *Arch Gynecol Obstet*, 288, 191-199.
29. Cota, A. (2014). "Actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, en el espermatozoide y líquido seminal de conejo nueva zelandia y su relación con el sobrepeso". Tesis de maestría para obtener título de maestra en biología de la reproducción animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Ciencias Biológicas y de la salud.
30. De Lamirande, E., Gagnon, C. (1992). "Reactive oxygen species and human spermatozoa. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility". *J. Androl*, 13, 379-386.
31. Dickinson, B., Chang, C. (2011). "Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses". *Nature chemical biology*, 7, 504-511.
32. Dukić, N., Simin, N., Svirčev, E., Orčić, D., Beara, I., Lesjak, M., Božin, B. (2012). "The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway". "Lipid Peroxidation" (p 193-210). Croatia.
33. Eddy, E. (2006). "The Spermatozoon". Cap 1. In Knobil and Neils Physiology of Reproduction". Vol 1. Neill J. D, Editor 3ra edición. pp. 2897.
34. Evangelista, S. (2014). "Efectos patológicos de las especies reactivas de oxígeno en espermatozoides". Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria (p 1-15). Sistema de Revisiones en Investigación. Veterinaria de San Marcos.
35. Fina, B. (2014). "Estrés oxidativo". Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario - Argentina. www.biologiaosea.com.ar © 2006 - 2009. Fecha de consulta 11/10/20014, 25/02/2015.
36. Fingerova, H., Novotný, J., Barborikc, J., Brezinovaa, J., Svobodovaa, M., Krskovad, M., Obrnaa, I. (2007). "Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS RANDOX®" *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 151, 37-40.
37. Gallardo, J. (2007). "Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal". Unidad de investigación médica en enfermedades nefrológicas. UMAE-Hospital de especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. *Rev. Inv. Clin.* 59, 42-47.
38. Gharagozloo, P., Aitken, R. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. J. 26:1628-40.
39. Godoy, L., Villalobos, B., Ruíz, S., Rojas, A., Díaz, M., Campechano, L. 2009. "estudio y análisis de la calidad del semen en pacientes jóvenes de 20 a 40 años, y su relación con los parámetros señalados por la organización mundial de la salud (OMS)". *Bioquímica*. 34: 1, 111.
40. Gómez, L., Cuevas, D. (2008). "Superóxido dismutasa". (pp. 169-182). En: M. Konigsberg-Fainstein Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Manual Moderno, México, D.F.
41. Greco, T., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M., Ubaldi, F., Rienzi, L., Tesarik, J. (2005). "ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment". *Hum. Reprod*, 20, 2590-2594.
42. Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease". *Am J Med* 91, 14S-22S.
43. Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344, 721-724.
44. Hammoud, A., Gibson, M., Peterson, C., Hammliton, B., Correl, D. (2008). Obesity and male reproductive potential. *J. Androl*, 27, 2365-2372.
45. Hansberg, W., Aguirre, J., Ríos, M., Rangel, P., Peraza, L., Montes de Oca, Y., Cano, N. (2008). "Stress in yeasts and filamentous fungi. Chapter15: Cell Differentiation as a Response to Oxidative Stress" First edition. Ed. (pp.235-237). Elsevier. UK.
46. Hazout, A., Menezo, Y., Madelenat, P., Yazbeck, C., Selva, J., Cohen, P. (2008). "Causes and clinical implications of sperm DNA damages". *Gynecol Obstet Fertil*. 36,1109-1117.
47. Hicks, J. (2001). "Bioquímica". (pp. 900). McGraw-Hill. México.
48. <http://www.aeu.es/userfiles/muestramaterialdocentecfsh.pdf> (fecha de consulta 20 /02/2015).
49. <http://www.studyinukraine.eu/fr/male-reproductive-system-with-figures/> fecha de consulta 16/03/2016
50. Jentzsch, M., Bachman, H., Furst P, Biesalki, K. (1996). "Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids". *Free Radicals. Biol Med*. 20, 251-256.
51. Jiménez, M., Serrano, M., Moreno, J. (2011). "Técnicas de criopreservación seminal". Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida, 3, 34-39.
52. Jomova, K., Valkob, M. (2011). "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease". Elsevier Ireland Ltd. *Toxicology*. 283, 65-87
53. Karp, G. (2010). "Cell and molecular biology: concepts and esperiments". (pp.590-594) .6th edition Jhon Wiley & Sons Inc.
54. Koca, Y., Ozdal, O., Celik, M., Unal, S., Balaban, N. (2003). "Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men". *Arch Androl* 49. 5, 355-359.



55. Koppers, A., De Luliis, G., Finnie, J., McLaughlin, E., Aitken, R. (2008). "Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa". *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 3199–3207.
56. Lampiao, F. (2012). "Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them". *World J Obstet Gynecol* 1, 29-34.
57. Lanzafame, F., La Vignera, S., Vicari, E., Calogero, A. (2009). "Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility". *Reprod Biomed Online* 19, 638-659.
58. Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., Alfano, P. and Dondero, E. (1993). "Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism". *J. Endocrinol. Invest.* 16, 683–686.
59. López, M., Urbano, A., Cárdenas, M. (2012) "Manual de laboratorio para el análisis de semen. Manual analítico y técnico de ayuda al diagnóstico de la esterilidad y subfertilidad de origen masculino y preparación del semen para las técnicas de reproducción asistida". 1ª edición. (pp. 8-10). omniaScience (Omnia Publisher SL).
60. Mahfouz, R., du Plessis, S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2010). "Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress". *Fertil steril.* 93, 814-821.
61. Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2009). "Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma" *Fertility and Sterility*, 91, 805-811.
62. Makker K., Agarwal, A., Sharma, R. (2009). "Oxidative stress and male infertility". *Indian J. Med. Res.* 129, 357-367.
63. Mallok, A., Flores, R., Alonso, C., Martínez, G. (2011). "Desbalance redox en la infertilidad masculina" *Revista Cubana de Farmacia*; 45, 283-296.
64. Martínez, J., Pardo, S. (2010). "Criopreservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad." *Acta biol. Colomb., Vol. 15 (2)*, 3 – 24
65. 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.
66. Mendoza, V., Retana, R. (2009). "Estrés oxidativo e inflamación: Medición e interpretación diagnóstica". (p 171-177). DGAPA. 1ª Ed. México.
67. Miranda, L. (2008). "Química de los radicales libres". En: M. Konigsberg Fainstein Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Manual Moderno, (pp. 3-21). México, D.F.
68. Mora, C., Shin, D. (2013). "Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold". *Semin Reprod Med*; 31, 293-300.
69. Mostafa, T., Tawadrous G, Roaia M, Amer M, Kader RA. (2006). "Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males". *Andrologia.* 38, 221-224.
70. Mostaghel, E. (2014). "Beyond T and DHT – Novel Steroid Derivatives Capable of Wild Type Androgen Receptor Activation". *Int. J. Biol. Sci.* Vol. 10, 602-613.
71. Novotný, J., Oborná, I., Březinová, J., Svobodová, M., Hrbáč, J., Fingerová, H. (2003). "The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples". *Biomed. Papers.* 147, 173–176.
72. Park, N., Park, H., Lee, K., M., Shin, D. (2003). "Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation". *Asian J. Androl.* 5, 195–201.
73. Peraza, L. (2008). "Catalasa". En: M. Konigsberg-Fainstein (Ed.). Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Manual Moderno, (pp.183-200). México, D.F.
74. Plant, N. (2002). "Molecular toxicology". Advanced text. Bio Scientific. 2ª Ed. (pp. 45-46). London.
75. Poirot, C., Cherruau, B. (2005). "Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigación biológica" *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 39, 225-41.
76. 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
77. Ríos, E., Cambrón, A., Ambríz, D., Zúñiga, P., Rodríguez, A., Rosado, A. García. (2010). "Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide." *ContactoS* 78, 5–11
78. Rodríguez, E., Gil, A., Aguirre, D., Cardona, W., Cadavid, A. (2011). "Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia". *Biom.* 31, 100-07
79. Said, T., Kattal, N., Sharma, R., Sikka, S., Thomas, A., Mascha, E. (2003). "Enhanced chemiluminescence assay vs colorimetric assay for measurement of the total antioxidant capacity of human seminal plasma". *J Androl.* 24, 676–680.
80. Saleh R, Agarwal A, Sharma R, Nelson D, Thomas A. (2002). "Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study". *Fertil Steril.* 78, 491-499.
81. Saleh, R., Agarwal, A. (2002). "Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice". *J Androl.* 23, 737-752.
82. Sánchez, C; Fontanaud, P.; Hee, Z.; Lafonta, C.; Meuniera, A.; Schaeffera, M.; Carmignace, D.; Molino, F.; Coutrya, N.; Bonnefonta, X.; Gouty-Colomer, L.; Gavoisg E.; Hodson, D.; Le Tissiere, P.; Robinsone I.;



- Mollarda. P. (2010). "Pituitary growth hormone network responses are sexually dimorphic and regulated by gonadal steroids in adulthood". *PNAS*. 50. 21878–21883.
83. Sanocka D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Chelmonskasoyta, A., Kurpisz, M. (1997). "Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems in human semen, asiciation with male infertility". *International Journal of Andrology*. 20, 255-264.
 84. Shamsi, M., Venkatesh, S., Kumar, R., Gupta, N., Malhotra, N., Singh, N., Mittal, S., Arora, S., Arya, D., Talwar, P., Sharma, R., Dada, R. (2009). "Antioxidant levels in blood and sminal plasma and their impact of sperm parameters in infertile men". *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 47, 38-43.
 85. Sharma, R., Agarwal A. (1996). "Role of reactive oxygen species in male infertility". *Urology*. 48, 835-50.
 86. 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.
 87. Siciliano, L., Tarantino, P., Longobardi, F., Rago, V., De Stefano, C., Carpino, A. (2001). "Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia". *J Androl* 22, 798–803.
 88. Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense". *Eur J Biochem* 215, 213-219.
 89. Sigman, M., Zini, A. (2009). "Semen analysis and sperm funtion assays: what do they mean?" *Semin Reprod Med*. 27, 115-123.
 90. Sikka, S. (2001). "Relative impact of oxidative stress on male reproductive function". *Curr. Med. Chem*. 8, 851–862.
 91. 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.
 92. Timbrell, J. (2009). "Principles of biochemical toxicology". (pp. 211-212). Informa healthcare, 4ª Ed. London, UK.
 93. Toro, A. (2009). "Espermograma. Medicina y laboratorio". *Mudulo 14 (Tecnología) número 11*. Editorial Médica Colombiana. 15, 145-169.
 94. Torres, C., Perales, M., Zuñiga, H., Carranza, A. (2004). "Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura". *Ciencia e Investigación VII (1)*. Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad nacional Mayor de San Marcos. I.S.S.N. 1561-0861.
 95. Venero, G. (2002). "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes". *Rev Cubana Med Militar* 31, 126-133.
 96. Wang, A., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D., Loughlin, K. (1997). "Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation". *Urology*. 49, 921-925.
 97. World Health Organization. (1999). "Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction". Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
 98. World Health Organization. (2010). "Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. fifth Edition.
 99. Zini, A., Al-Hathal N. (2011). "Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction?" *Asian J Androl*. 13, 374-81.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Luis Óscar González Bustamante

Por su participación como **PONENTE** del tema: *Estrés oxidativo en espermatozoides humanos*, en el Seminario de Investigación en la FES Zaragoza, realizado en las instalaciones de esta Facultad el 20 de abril de 2016.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 20 de Abril de 2016

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director





**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN**



**GONZÁLEZ BUSTAMANTE LUIS ÓSCAR
P R E S E N T E.**

Tenemos el agrado de comunicarle que su trabajo **CAPACIDAD ANTIÓXIDANTE, LIPOPEROXIDACIÓN Y CALIDAD SEMINAL DE INDIVIDUOS CLÍNICAMENTE SANOS**, ha sido aceptado para ser presentado como cartel el día jueves 20 de octubre de 2016, en el pasaje cultural de Campus II, en el marco del 12º Congreso de Investigación en la FES Zaragoza.

A su cartel se le ha asignado el número **(BIO-12)** que encontrará indicado en las mamparas. El cartel deberá ser colocado a las 8:00 a.m. y retirado a las 6:00 p.m. Ya que el objetivo de la presentación del cartel es generar preguntas y promover la discusión, es importante que el autor esté presente durante la discusión del trabajo que será de 12:00 a 14:00 hrs.

El cartel, en su texto, cuadros y gráficos, deben ser legibles a una distancia de dos metros. Las dimensiones del cartel deben ser de 110 cm de alto por 80 cm de ancho.

La aceptación del trabajo no representa el registro automático. Si no se ha registrado y realizado el pago para asistir al Congreso, su resumen no aparecerá en las memorias y su constancia no estará en tiempo.

