



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA  
DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LÍQUIDO SEMINAL Y  
SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA  
(Modalidad: Investigación)

MILENA CAROLINA BLANCO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2009

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN  
DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LÍQUIDO SEMINAL Y SU RELACIÓN CON  
LA CALIDAD ESPERMÁTICA

APROBADO POR:

---

Profa. Daxi Caraballo  
Asesora

---

---

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTO .....	i
DEDICATORIA .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	6
MUESTRA POBLACIONAL .....	6
RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA .....	6
EXAMEN FÍSICO Y CITOMORFOLÓGICO .....	7
Valoración del volumen, pH, tiempo de licuefacción y viscosidad del semen. ...	7
Determinación de la calidad espermática (concentración espermática, leucocitos, morfología, motilidad y viabilidad). .....	8
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD .....	11
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
CONCLUSIONES .....	26
RECOMENDACIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	28
ANEXOS .....	33

## **AGRADECIMIENTO**

A

**Dios.** Gracias por proveerme de la fortaleza, sabiduría e inteligencia necesaria para alcanzar mis metas.

Mis profesores de carrera universitaria, por su valiosa enseñanza, orientación y colaboración en mi formación académica. Personas maravillosas con vocación de servicio y ética profesional, dispuestas siempre a dar lo mejor de sí para esta institución. ¡Mil gracias!

La profesora Daxi Caraballo, por su esmerada conducción y orientación como asesor académico en el desarrollo y presentación de este trabajo de investigación.

La Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa, y a la Licenciada Isabel Ortega del Laboratorio Clínico Ortega, por su colaboración en el proceso de recolección de las muestras para este trabajo.

La Licenciada Antonietta Hernández del Laboratorio Hernández y a Mariana Fortoul, por su aporte profesional en el desarrollo de esta tesis.

La profesora Raquel Salazar y al profesor William Velásquez, por su colaboración en la última etapa de esta investigación.

Todos los pacientes que contribuyeron a hacer de esta investigación una realidad.

A todas aquellas personas que impulsaron este logro.

¡Honor a quien honor merece!

## **DEDICATORIA**

**A mi Madre.** Gracias por tus enseñanzas, por inculcarme excelentes valores, por confiar en mí en todo momento. Gracias por ser mi mejor amiga. Gracias por todos tus sacrificios y hacer de mí una mejor persona. Gracias por estar ahí.

**A mi tía Titi.** Gracias por quererme como a una hija, por preocuparte siempre por mí. Sabes que te considero como mi segunda mamá. Te quiero mucho.

A mi abuelita, tíos, primos y primas. Gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento. Gracias por sus buenos deseos. Los quiero.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de corrección para hemocitometría. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Cocientes de Vs/Vc.....	12
<b>Tabla 3.</b> Asociación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa sérica (Units/ml) y la infertilidad-fertilidad en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	13
<b>Tabla 4.</b> Asociación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal (Units/ml) y la infertilidad-fertilidad en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	14
<b>Tabla 5.</b> Análisis de Regresión lineal simple de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal vs. actividad de la enzima superóxido dismutasa sérica en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	14
<b>Tabla 6.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el volumen de líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	15
<b>Tabla 7.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el tiempo de licuefacción del semen en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	16
<b>Tabla 8.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viscosidad del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	17
<b>Tabla 9.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el pH del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	17
<b>Tabla 10.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la presencia de leucocitos en líquido seminal de pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	18

<b>Tabla 11.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la concentración espermática de pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	19
<b>Tabla 12.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la motilidad de los espermatozoides en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	20
<b>Tabla 13.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la morfología espermática en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	21
<b>Tabla 14.</b> Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viabilidad espermática en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.....	21
<b>Tabla 15.</b> Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y las variables físicas del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	22
<b>Tabla 16.</b> Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y las variables citomorfológicas del semen en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	23
<b>Tabla 17.</b> Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y algunos factores de riesgo en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008. ....	25

## RESUMEN

Con el propósito de evaluar el estrés oxidativo en líquido seminal y su relación con la calidad espermática, se realizó un estudio a un grupo de 70 hombres de los cuales 35 de ellos presentaban alteraciones en los parámetros seminales. Todos provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa en la ciudad de Cumaná. Las variables evaluadas en este estudio fueron: características físicas y citomorfológicas del semen, actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en suero sanguíneo (SODS) y actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal (SODPS), y exposición a factores de riesgo como alcohol, tabaco y actividad física. Se encontró importante asociación ( $p < 0,001$ ) entre la infertilidad de los pacientes evaluados y la actividad de la enzima SODPS. El análisis estadístico de regresión lineal simple entre la actividad de la enzima SODPS vs. actividad de la enzima SODS, no evidenció dependencia ( $p > 0,05$ ) entre la actividad de la enzima SODPS y la actividad de la enzima SODS. Se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la infertilidad de los pacientes estudiados y el volumen seminal. Para las variables físicas (tiempo de licuefacción, viscosidad y pH) y citomorfológicas evaluadas, se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre éstas y la infertilidad de los pacientes estudiados. Así mismo, se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tiempo de licuefacción y viscosidad seminal con la actividad antioxidante de la enzima SODPS. Para las variables citomorfológicas y su asociación con la actividad antioxidante de la enzima SODPS, se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Al aplicar el estadístico Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), se encontró que el consumo de alcohol está asociado ( $p < 0,05$ ) a la infertilidad de los pacientes estudiados. Asumiendo estos resultados, es posible asociar al estrés oxidativo en líquido seminal producido por el consumo de alcohol y la leucocitospermia manifestada por los pacientes evaluados con la calidad espermática de los mismos, y por lo tanto se puede asociar a la infertilidad masculina.

Palabras o Frases Claves: SOD, estrés oxidativo, líquido seminal, infertilidad masculina, leucocitospermia, espermatograma.



## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo se define como el daño a las células producido por acción de los radicales libres (Escalona, 2005). Las especies reactivas del oxígeno (ERO) contribuyen al daño molecular y estructural de las células, que se presenta en una serie de padecimientos en donde la capacidad antioxidante del organismo es rebasado, y por lo tanto incapaz de inactivar a las especies reactivas, dando lugar al proceso de estrés oxidativo (Ball y cols., 2002).

La producción celular de ERO fue observada por primera vez en espermatozoides de mamíferos a finales de los años cuarenta. Se ha confirmado además, que la principal fuente de ERO en el semen son los espermatozoides inmaduros (Agarwal y cols., 2003), seguido de los leucocitos infiltrados en el líquido seminal, principalmente los segmentados neutrófilos, así como de las citoquinas producidas por los leucocitos (Aitken, 1994a).

Numerosos estudios han reportado que un aumento significativo de leucocitos en el plasma seminal afecta negativamente los parámetros seminales, lo que sugiere que la leucocitospermia, de acuerdo a su grado, puede reflejar al menos en algunos casos, actividad en el tracto genito-uretral asociada a una anormal espermatogénesis o pobre viabilidad espermática (Ricci y cols., 2002; Esfandiari y cols., 2003; Everaert y cols., 2003).

Durante el proceso de respiración celular, se consume oxígeno generándose adenosin trifosfato (ATP), quedando de esta manera como productos dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y los radicales libres. Estos últimos son átomos o moléculas inestables, altamente reactivas que atacan los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, carbohidratos y los ácidos nucleicos de las células. Aproximadamente un 2-3% de oxígeno utilizado en la respiración deriva en la formación de radicales libres (Beckman y Ames, 1998).

Los radicales libres pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre la función espermática, esto va a depender de la naturaleza y la concentración de las especies involucradas así como del momento y el sitio de exposición (Lamirande y Gagnon, 1995).

Los espermatozoides se caracterizan por un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, y los radicales libres tienen una gran afinidad por estos ácidos, principalmente el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el malonildialdehído (Mazzilli, 1994). Éstos pueden provocar daños irreversibles en la motilidad del espermatozoide si se encuentran en altas concentraciones, pero si éstos se encuentran en pequeñas dosis el daño puede revertirse (Selley y cols., 1991).

El  $H_2O_2$  causa una elevada fragmentación del ADN en los espermatozoides, además de reducir su movilidad y capacidad de función con los ovocitos (Aitken y cols., 1998). Este compuesto difunde a través de las membranas, entra a las células e inhibe la actividad de algunas enzimas, tales como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) permitiendo una disminución en la producción de NADPH y una concomitante acumulación de forma reducida y oxidada de glutatión (Saleh y Agarwal, 2002; Moustafa y cols., 2004; Fraczek y Kurpisz, 2005).

La peroxidación lipídica es un ejemplo de daño oxidante en membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. En el proceso de peroxidación de los ácidos grasos se produce una permeabilización de las membranas plasmática y acrosomial, conduciendo a una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide. Así mismo, la inactivación de enzimas glucolíticas conlleva a un bloqueo en la biosíntesis de ATP y la consiguiente pérdida de motilidad, que en este caso es por “falta de combustible” necesario para la contracción de los microtúbulos flagelares y no por “pérdida de combustible” o ATP a través de la membrana, como en el caso de la peroxidación lipídica que produce verdaderos agujeros en las membranas espermáticas (Álvarez y Storey, 1984; Girotti, 1998).

Es conocido que la maduración de los espermatozoides ocurre en el epidídimo y

que este evento es crucial para los cambios estructurales y funcionales de la célula espermática. Alteraciones en este proceso permitirían una alteración en el sistema antioxidante y oxidativo del espermatozoide, lo cual determinaría el posterior potencial oxidativo de ese espermatozoide (Batellier y cols., 2001).

Ollero y cols., para el año 2001, encontraron una disminución en el contenido de ácido decosaheptaenoico (DHA) en el espermatozoide humano durante la maduración en el epidídimo y sugirieron que éste es uno de los pasos fundamentales de regulación genómica de la maduración espermática. Si este evento no ocurre, el espermatozoide podría presentar retención citoplasmática y alta tasa de peroxidación lipídica (Rao y cols., 1989; Esfandiari y cols., 2003; Baker y Aitken, 2005).

En la mayoría de las especies, los espermatozoides, una vez formados en el testículo, se mezclan con un fluido donde permanecen inmóviles y con un nivel de metabolismo muy bajo, que se entiende como una necesidad de preservar las reservas energéticas espermáticas y disminuir los riesgos de agentes oxidantes endógenos producidos por la actividad mitocondrial (Imai y cols., 2001).

El líquido seminal dispone de una amplia gama de moléculas antioxidantes, entre las que se encuentran: enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), que representan la primera barrera frente a la producción de radicales libres; y sustancias no enzimáticas como el  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ubiquinol, glutatión y ácido ascórbico; siendo el de mayor importancia el ubiquinol (Userpater y cols., 2004). Sin embargo, dentro del grupo de sustancias antioxidantes, la principal sigue siendo la enzima SOD, ya que además de estar presente en los espermatozoides también es producida por la próstata y el epidídimo, permitiendo ser utilizada como predictora del tiempo de vida de una muestra de líquido espermático (Álvarez y cols., 1987; Wolf y Anderson, 1988; OMS, 1989).

Los túbulos seminíferos están protegidos contra el estrés oxidativo. De hecho, muestran una expresión estadio-dependiente de la enzima antioxidante SOD, además, la

temperatura más baja a la que está expuesto el testículo contribuye a disminuir el riesgo de peroxidación lipídica y daño de ADN. Esto es especialmente relevante, ya que de todas las células corporales, las células germinales son las que tienen un mayor contenido de DHA, el ácido graso más sensible a la peroxidación lipídica (Álvarez y cols., 1987; Jow y cols., 1993; Álvarez y Storey, 1995; Ollero y cols., 2001).

Una asociación negativa entre la actividad de la enzima SOD y el número de leucocitos, puede estar relacionada con el efecto dañino que los procesos inflamatorios de las vías seminales ejercen sobre la función de las glándulas sexuales accesorias, debido a que los sitios de producción preferentes de la enzima SOD, en el aparato reproductor, son la próstata y el epidídimo. La afectación de esas glándulas traería como consecuencia una disminución de la actividad de esta enzima (Wolf y cols., 1990; Quintero y cols., 2000).

Se estima que en la actualidad alrededor de un 15 % de las parejas en edad reproductiva tienen problemas de infertilidad, lo que equivale a unas 600 000 parejas en España (Androgen, 2006), contribuyendo el factor masculino en un 40%. Estudios demuestran que los niveles de ERO producidos en pacientes con infertilidad son significativamente más altos que en hombres fértiles. Este hecho parece estar relacionado con lo que se ha designado como espermiogénesis defectuosa, en la cual los espermatozoides no experimentan el proceso de maduración normal, saliendo a los túbulos seminíferos espermatozoides inmaduros que producen niveles altos de ERO (Aitken y Clarkson, 1987; Aitken 1994b; Palenzona, 2005).

Debido a que el estrés oxidativo ha sido asociado con la función espermática e infertilidad, es indispensable hacer una evaluación exhaustiva del paciente que acude a consultas de infertilidad, la cual se basa en un conjunto de datos tales como: aplicación de una encuesta (la cual permite la investigación de los factores de riesgo de la infertilidad), un examen clínico (que permite orientar la causa de la patología entre una azoospermia secretoria o una azoospermia excretoria de acuerdo al volumen testicular, presencia de quistes en los testículos o epidídimo, ausencia de conductos deferentes y

consistencia de los testículos), exámenes de primera intención (espermograma y espermocultivo) y exámenes de segunda intención los cuales son todos aquellos análisis específicos que sirven de soporte a la investigación (Poirot y Cherruau, 2005).

Algunos estudios han demostrado que no existe diferencia significativa entre el esperma de un fumador con el de un no fumador; lo que sí se ha confirmado es que los hombres que fuman una cajetilla o más al día pueden tener menor motilidad de los espermatozoides. Con relación al consumo de alcohol, se ha advertido que entre el 70 y 80% de los casos la infertilidad en el hombre esta asociado a este hábito. La ingesta excesiva de alcohol provoca un descenso en los niveles de testosterona, lo que afecta directamente la producción de espermatozoides (Volgt y cols., 1986; Wentz, 1986; Hadi y cols., 1987).

Al evaluar el hábito de fumar y la ingesta de alcohol como agentes generadores de radicales libres, así como su asociación con algunas alteraciones de los parámetros espermáticos, se señala la existencia de una asociación de estas alteraciones con el estrés oxidativo generado por el alcohol y el cigarrillo; siendo el daño más significativo en aquellos que consumen alcohol (Gallardo y cols., 2003).

La infertilidad masculina entre otros factores, ha sido asociada al estrés oxidativo en el líquido seminal. Sin embargo, son escasos los trabajos disponibles en Venezuela, en cuanto a esta problemática se refiere. De allí, que el aporte que se pretende dar con esta investigación, es que este trabajo sirva como soporte para futuras exploraciones sobre el tema que se está desarrollando dentro del esquema de la valoración del estrés oxidativo y su relación con la calidad espermática. De esta manera, se decidió evaluar dicho estrés, a través de la valoración de la actividad antioxidante de la enzima SOD en suero sanguíneo y plasma seminal, y su relación con la calidad espermática, en pacientes que acudieron a consultas de infertilidad, en la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa, situada en la ciudad de Cumaná.

## **METODOLOGÍA**

### **Muestra Poblacional**

Se realizó un estudio comparativo de casos y controles para evaluar la asociación del estrés oxidativo a través de la actividad antioxidante de la enzima SOD, y las variables físicas, y citomorfológicas del semen. Se estudiaron 70 pacientes, y de éstos, 35 asistían a consulta de infertilidad; definiendo a los hombres infértiles, como aquellos que después de haber tenido relaciones sexuales con su pareja durante un año o más sin utilizar métodos anticonceptivos no lograban un embarazo. Los otros 35 pacientes conformaban al grupo control, los cuales cursaban con parámetros físicos y citomorfológicos seminales aparentemente normales.

A todo paciente que participó en este estudio se le entregó, previo a la toma de muestra, un consentimiento válido que debió firmar. Esto con el propósito de obtener autorización para el procesamiento de su muestra en este trabajo; así mismo se realizó una encuesta de datos epidemiológicos con la finalidad de obtener antecedentes comunes entre los casos y los controles. Estos datos fueron valorados en la investigación.

El trabajo se realizó conservando las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen humano (OMS, 1989). Este estudio no comprometió bajo ninguna circunstancia la salud o vida de los individuos que participaron en el mismo, siendo excluidos aquellos pacientes sometidos a radiaciones y vasectomía.

### **Recolección de la Muestra**

Para el presente estudio se recibieron muestras de líquido seminal obtenidas por masturbación, de pacientes que acudieron a consultas de infertilidad, en la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Las muestras fueron recolectadas según las recomendaciones de la OMS.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron tras la punción venosa de 5 ml de sangre. Éstas fueron tomadas después de recibir las muestras de semen de los pacientes. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm para obtener los sueros sanguíneos que posteriormente se colocaron en tubos de ensayo estériles, almacenándolos a temperatura entre 2 y 8° C hasta el momento de las determinaciones de los parámetros comprendidos en este estudio.

### **Examen Físico y Citomorfológico**

Los líquidos seminales fueron sometidos a evaluación macroscópica realizada a temperatura ambiente y microscópica, siguiendo las pautas de la Organización Mundial de la Salud (1989); la cual incluyó:

Valoración del volumen, pH, tiempo de licuefacción y viscosidad del semen.

El volumen del eyaculado se midió con pipetas graduadas. Volumen normal: 3 a 6 ml.

El pH se determinó extendiendo uniformemente una gota de semen sobre un papel sensible al pH (pH= 7,2 a 8,0), esperando 30 segundos para compararlo con una tira de calibración de pH. Esta prueba se realizó antes de una hora después de haberse tomado la muestra.

El tiempo de licuefacción del semen se evaluó antes de los 60 minutos, siendo anormal aquellas muestras que todavía presentaban coágulos después de los 60 minutos.

En la muestra licuada pudo estimarse la viscosidad introduciendo una varilla de vidrio en la misma y observando la longitud del filamento formado al retirar dicha varilla, el cual no debía exceder de los dos centímetros.

Determinación de la calidad espermática (concentración espermática, leucocitos, morfología, motilidad y viabilidad).

#### Concentración Espermática.

Se determinó por el método del hemocitómetro (OMS, 1989). En este procedimiento se preparó una dilución 1:20 con cada muestra homogénea mezclando 0,02 ml de semen licuado con 0,38 ml de diluyente de Mancomber y Saunders. Este último, compuesto por 5 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 1 ml de formalina al 35%  $\text{V/V}$ , 0,5 ml de solución acuosa saturada de violeta de genciana y agua destilada en cantidad suficiente para obtener un volumen final de 100 ml. Para el conteo de los espermatozoides se utilizó un hemocitómetro de Neubauer mejorado, el cual posee un cuadrado central secundario conformado por 25 cuadrados terciarios, cada uno de éstos con 16 cuadrados cuaternarios.

Para las muestras que contenían menos de 10 espermatozoides por cuadrado se debió contar toda la cámara; para las muestras que contenían entre 10 y 40 espermatozoides por cuadrado se contaron 10 cuadrados, y para los que contenían más de 40 espermatozoides por cuadrado se contaron 5 cuadrados. Dependiendo de la dilución y de la cantidad de espermatozoides contados el resultado fue multiplicado por un factor de  $1 \times 10^6$ .

En los casos en los que el examen preliminar de concentración espermática resultó bajo o alto, se realizó un ajuste de la graduación de dilución (Tabla 1). Si la cantidad de espermatozoides por campo visual variaba considerablemente, esto podía significar que la muestra no era homogénea.

Posterior a la dilución, se procedió al llenado del hemocitómetro dejándose reposar por unos 5 minutos en una cámara húmeda, esto con el propósito de que la muestra no se secase y que los espermatozoides pudieran sedimentar. Transcurrido el tiempo, se



observó la muestra en el microscopio óptico en un aumento de 40x. El resultado se expresó en millones/ ml.

**Tabla 1.** Factores de corrección para hemocitometría.

Dilución (µl) (semen + diluyente)	Número de cuadrados terciarios contados		
	25	10	5
1 + 9	10	4	2
1 + 19	5	2	1
1 + 49	2	0,8	0,4

Así mismo la concentración espermática pudo clasificarse como:

1. Normozoospermica: eyaculación normal ( $>20 \times 10^6$  /ml).
2. Oligozoospermica: concentración  $< 20 \times 10^6$  /ml.
3. Azoospermica: ausencia de espermatozoides en la eyaculación.

#### Leucocitos

Se cuantificaron en un hemocitómetro y la concentración se obtuvo por la siguiente relación:

$$C = \frac{N \times S}{100}$$

Donde C es la concentración de leucocitos en millones/ml; N es la cantidad de leucocitos contados en los mismos campos que 100 espermatozoides; y S es el recuento de espermatozoides en millones/ml.

#### Motilidad

Esta se determinó por una técnica basada en un sistema de clasificación que consistió en verter con una micropipeta un volumen fijo de semen (10-15 µl) sobre un

portaobjetos limpio, el mismo se cubrió con un cubreobjetos y posteriormente en microscopio con objetivo de 40x. Se observaron entre 4 y 6 campos, obteniendo un porcentaje de cada categoría de motilidad.

La cantidad de espermatozoides por categoría pudo ser cuantificada con ayuda de un contador de laboratorio. La motilidad de los espermatozoides tuvo la siguiente clasificación:

- a** Si el espermatozoide tiene una motilidad progresiva rápida y lineal.
- b** Si tiene un movimiento lineal o no lineal lento o perezoso.
- c** Si tiene una motilidad no progresiva.
- d** Si el espermatozoide es inmóvil.

#### Viabilidad

Se basó en el principio de que las células muertas con membranas plasmáticas dañadas permitirían la entrada del colorante. Se contaron 100 espermatozoides en microscopio óptico con aumento de 40x y se diferenciaron los espermatozoides vivos (no teñidos) de los muertos (teñidos). En aquellas muestras donde el porcentaje de espermatozoides inmóviles superó el 60% se determinó la proporción de espermatozoides vivos con la técnica de tinción supravital. Para ello se preparó una solución al 0,5% (p/v) en solución fisiológica de Eosina Y, se mezcló una gota (10-15  $\mu$ l) de semen fresco con una gota de solución de eosina al 0,5% en una lámina portaobjetos y se cubrió con una lámina cubreobjetos. Pasados 2 minutos se observó el preparado con objetivo de 40X con luz intensa y se contaron los espermatozoides vivos y muertos (Eliasson, 1977).

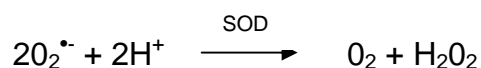
#### Morfología

La técnica estuvo basada en hacer un extendido de la muestra fresca de semen sobre una lámina portaobjetos, dejándose secar al aire y fijándose con una mezcla de

partes iguales de etanol (95% V/V) y éter; luego se coloreó con solución de Giemsa. Se observó al microscopio con objetivo de 100X, se contaron 100 células y se anotaron los resultados en porcentaje de acuerdo a la forma de los espermatozoides (OMS, 1989).

### **Actividad de la Enzima SOD**

La SOD es una metaloenzima capaz de catalizar la dismutación del anión superóxido entre el oxígeno y el peróxido de hidrógeno de acuerdo a la siguiente reacción:



El papel de la enzima SOD es acelerar la transformación del radical tóxico del superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), produciendo, durante este proceso oxidativo, energía, peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El método se basa en medir el aumento de la tasa de autooxidación de 5, 6, 6a, 11b-tetrahydro-3, 9, 10-trihydroxybenzo [c] fluoreno (R1) en una solución alcalina y acuosa, produciendo un cromóforo con un máximo de absorbancia a 525 nm. La interferencia de mercaptanos (RSH), como el glutatión reducido, está controlada por el 1-metil-2vinilpirimidina (R2), que elimina los mercaptanos directamente por medio de una reacción de alquilación (Nebot, y cols., 1993).

Se llevó a cero el espectrofotómetro en 525 +/- 2 nanómetros con agua desionizada. Se agregaron 900 µl de buffer (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) en cada tubo, luego se procedió a agregar 40 µl de blanco muestra (agua desionizada) en uno de los tubos, y 40 µl de las muestras en el resto de los tubos correspondientes. Se adicionaron 30 µl de R2 a cada tubo de prueba, se mezclaron, y luego de incubarse a 37° C por un minuto se agregaron 30 µl de R1 a los tubos de prueba, mezclando nuevamente e incubando por 5 minutos. Posteriormente se procedió a leer en el espectrofotómetro, midiendo la actividad de la enzima SOD por absorbancia. No se requirió de ninguna calibración.

Para la determinación de la actividad de la enzima SOD en plasma seminal, se utilizó una tabla de cocientes: dado el cociente de Vs/Vc, la actividad de la enzima SOD en las unidades SOD-525 fue encontrada en la tabla de cocientes buscando el valor calculado de Vs/Vc más cercano al de la tabla y leyendo la actividad de SOD de la columna adyacente (en su defecto al valor superior más cercano, obteniendo el valor real por regla de tres), la cual es mostrada en Units/ml.

**Tabla 2.** Cocientes de Vs/Vc.

Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units	Vs/Vc	Units
1.00	0.00	2.00	1.00	3.00	2.18	4.00	3.57	5.00	5.25	6.00	7.32	7.00	9.93
1.05	0.05	2.05	1.06	3.05	2.24	4.05	3.65	5.05	5.35	6.05	7.44	7.05	10.08
1.10	0.09	2.10	1.11	3.10	2.31	4.10	3.73	5.10	5.44	6.10	7.56	7.10	10.23
1.15	0.14	2.15	1.17	3.15	2.37	4.15	3.80	5.15	5.54	6.15	7.68	7.15	10.38
1.20	0.19	2.20	1.22	3.20	2.44	4.20	3.88	5.20	5.63	6.20	7.80	7.20	10.53
1.25	0.24	2.25	1.28	3.25	2.50	4.25	3.96	5.25	5.73	6.25	7.92	7.25	10.69
1.30	0.29	2.30	1.34	3.30	2.57	4.30	4.04	5.30	5.83	6.30	8.04	7.30	10.85
1.35	0.33	2.35	1.39	3.35	2.64	4.35	4.12	5.35	5.93	6.35	8.16	7.35	11.01
1.40	0.38	2.40	1.45	3.40	2.71	4.40	4.21	5.40	6.03	6.40	8.29	7.40	11.17
1.45	0.43	2.45	1.51	3.45	2.77	4.45	4.29	5.45	6.13	6.45	8.42	7.45	11.34
1.50	0.48	2.50	1.57	3.50	2.84	4.50	4.37	5.50	6.23	6.50	8.55	7.50	11.50
1.55	0.53	2.55	1.63	3.55	2.91	4.55	4.46	5.55	6.34	6.55	8.68	7.55	11.67
1.60	0.58	2.60	1.68	3.60	2.98	4.60	4.54	5.60	6.44	6.60	8.81	7.60	11.84
1.65	0.63	2.65	1.74	3.65	3.06	4.65	4.63	5.65	6.55	6.65	8.94	7.65	12.02
1.70	0.69	2.70	1.81	3.70	3.13	4.70	4.71	5.70	6.65	6.70	9.08	7.70	12.20
1.75	0.74	2.75	1.87	3.75	3.20	4.75	4.80	5.75	6.76	6.75	9.22	7.75	12.38
1.80	0.79	2.80	1.93	3.80	3.27	4.80	4.89	5.80	6.87	6.80	9.35	7.80	12.56
1.85	0.84	2.85	1.99	3.85	3.35	4.85	4.98	5.85	6.98	6.85	9.50	7.85	12.74
1.90	0.90	2.90	2.05	3.90	3.42	4.90	5.07	5.90	7.09	6.90	9.64	7.90	12.93
1.95	0.95	2.95	2.11	3.95	3.50	4.95	5.16	5.95	7.21	6.95	9.78	7.95	13.12

### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron analizados a través de estadísticas descriptivas, expresadas en tablas, aplicando la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y la prueba de regresión lineal simple con un nivel de confiabilidad de un 95% (Sokal y Rohlf, 1979).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se valoró la actividad antioxidante de la enzima SOD por el método de ensayo espectrofotométrico para todos los pacientes.

En la tabla 3 se presenta la asociación entre los niveles de actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa sérica (SODS) y la fertilidad e infertilidad observada en los pacientes que asisten a consultas de infertilidad en la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa.

**Tabla 3.** Asociación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa sérica (Units/ml) y la infertilidad-fertilidad en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

SODS	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
< 2,18	4,00	11,40	1,00	2,90	0,86	0,35 NS
2,18-13,12	31,00	88,60	34,00	97,10		
$\bar{X}$	5,55 Units/ml		5,84 Units/ml			

NS= No significativo     $\chi^2$ = Chi Cuadrado     $\bar{X}$  = media    n= numero de pacientes    P> 0,05  
SODS=Superóxido dismutasa sérica

Al aplicar la prueba  $\chi^2$  ( $p > 0,05$ ) no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la actividad de la enzima SODS y la fertilidad, sin embargo, se observa que un gran porcentaje de pacientes infértiles y fértiles presentan valores de la enzima SODS entre 2,18 y 13,12 Units/ml.

En la tabla 4 se presenta la asociación de la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa medida en el plasma seminal (SODPS) y la fertilidad e infertilidad observada en los pacientes que acudieron a la consulta de infertilidad. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y la fertilidad. El 60,0% de los pacientes infértiles presentaron una actividad de SODPS por debajo de 2,18 Units/ml, mientras que el 2,90% de los pacientes fértiles presentaron valores de la actividad de la enzima

SODPS inferiores a 2,18 Units/ml.

**Tabla 4.** Asociación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal (Units/ml) y la infertilidad-fertilidad en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

SODPS	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
< 2,18	21,00	60,00	1,00	2,90	23,93	0,00 ***
2,18-13,12	14,00	40,00	34,00	97,10		
$\bar{X}$	1,81 Units/ml		4,21 Units/ml			

\*\*\*Altamente significativo  $\chi^2$ = Chi cuadrado  $\bar{X}$  = media n= número de pacientes P< 0,001  
SODPS=Superóxido dismutasa en plasma seminal

Esta mayor proporción de pacientes infértiles con valores en la actividad de la enzima SODPS por debajo de 2,18 U/ml, puede ser explicada argumentando que dichos pacientes cursen con daños a nivel de las glándulas seminales como consecuencia del aumento incontrolado de los radicales libres en el líquido seminal, por lo que la biosíntesis de la enzima SODPS estaría inhibida (Alkan y cols., 1997).

Estudios análogos sostienen que la protección de los espermatozoides contra el estrés oxidativo es la enzima SOD, y que la esterilidad puede ser el resultado del incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno, o el decremento en las defensas antioxidantes, como la enzima SOD (Lewis y cols., 1995; Thiele y cols., 1995).

**Tabla 5.** Análisis de Regresión lineal simple de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal vs. actividad de la enzima superóxido dismutasa sérica en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	R	Valor-P
Modelo	8,84168	1	8,84168	0,20	0,10 NS
Residuo	217,128	68	3,19306		
Total (Corr.)	225,97	69			

R: relación relativamente débil P> 0,05 NS= No significativo

En la tabla 5 se presenta el resumen de la prueba estadística de regresión lineal

simple, aplicado a los parámetros actividad de la enzima SODPS y SODS de pacientes que acudieron a la consulta de infertilidad. No se observó relación lineal significativa al evaluar estos parámetros. Este hecho puede ser explicado argumentando que la actividad de la enzima SOD en líquido seminal depende principalmente de su producción en los espermatozoides, seguida de la próstata y epidídimo (Wolf y Anderson, 1988).

Debido a que no se encontró dependencia entre la actividad de la enzima SODPS y la actividad de esta enzima en suero sanguíneo, sólo se evaluó la asociación existente entre la enzima SODPS y las variables físicas, citomorfológicas, y factores de riesgo en los pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa.

**Tabla 6.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el volumen de líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Volumen	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
< 2,00 ml	8,00	22,90	1,00	2,90	4,59	0,03 *
2,00-6,00 ml	27,00	77,10	34,00	97,10		
$\bar{X}$	2,6 ml		2,82 ml			

\*Significativo  $\chi^2$ = Chi cuadrado  $\bar{X}$  = media n= número de pacientes P< 0,05

En la tabla 6 se presenta la asociación entre el volumen de líquido seminal y la fertilidad e infertilidad. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$  se encontró asociación significativa (p< 0,05) entre el volumen seminal y la calidad espermática de ambos grupos. El 22,90% de los pacientes infértiles presentaron un volumen menor de 2,00 ml, mientras que el 2,90% de los pacientes fértiles presentaron un volumen seminal menor a 2,00 ml. Este hallazgo evidencia una de las primeras alteraciones macroscópicas que se pueden observar en pacientes donde se sospeche una posible infertilidad.

Resultados similares fueron encontrados por Pérez (1990), quien concluyó que el volumen del líquido seminal podía hallarse disminuido (< 1,50 ml) en pacientes que sufren obstrucciones totales o parciales de las vías seminales, pudiendo bien éstos estar

asociados a procesos inflamatorios de los conductos seminíferos.

En la tabla 7 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el tiempo de licuefacción del líquido seminal. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) al analizar este parámetro en ambos grupos. El 74,30% de los pacientes infértiles presentaron un tiempo de licuefacción superior a 60 minutos, mientras que sólo el 2,90% de los individuos fértiles presentó un tiempo de licuefacción mayor a 60 minutos.

**Tabla 7.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el tiempo de licuefacción del semen en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Tiempo de Licuefacción	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
> 60 min.	26,00	74,30	1,00	2,90	34,73	0,00 ***
< 60 min.	9,00	25,70	34,00	97,10		

\*\*\*Altamente significativo       $\chi^2$ = Chi cuadrado      n= número de pacientes      P< 0,001

Estos hallazgos coinciden con los realizados por Henry (2000); el cual explica que el licuado del semen se consigue gracias a sustancias de tipo coagulasa, como el antígeno específico de la próstata (PSA) y la fibrinolisisina, que son liberadas al eyaculado por la glándula prostática, y que al haber disfunción prostática, la licuefacción ocurriría después de la hora del eyaculado, reflejándose alargado en el análisis seminal.

En la tabla 8 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viscosidad del líquido seminal. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) al analizar este parámetro en ambos grupos. El 25,70% de los pacientes infértiles presentó una viscosidad normal, mientras que el 88,50% de los pacientes fértiles presentó una viscosidad normal.

Este hallazgo puede estar vinculado a una disfunción en las glándulas seminales en



los pacientes infértiles, lugar donde se lleva a cabo la síntesis del fosfato de espermita y otras proteínas similares al fibrinógeno que regulan la viscosidad seminal, por eso el resultado de un bajo porcentaje (25,70%) de pacientes con viscosidad normal. Hallazgos similares fueron descritos por González y cols. (1993), quienes encontraron que la hiperviscosidad estaba asociada a la hipofunción de la vesícula seminal, y que probablemente a través de esta hipofunción se afectaba la fertilidad.

**Tabla 8.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viscosidad del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Viscosidad seminal	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
Aumentada	18,00	51,40	1,00	2,90	29,58	0,00 ***
Ligeramente aumentada	8,00	22,80	3,00	8,60		
Normal	9,00	25,70	31,00	88,50		
***Altamente significativo	$\chi^2$ = Chi cuadrado		n= número de pacientes			P< 0,001

En la tabla 9 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el pH del líquido seminal. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la calidad espermática y el pH seminal del grupo de pacientes fértiles y el grupo de pacientes infértiles.

**Tabla 9.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y el pH del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

pH	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	N	%	n	%		
> 8,00	21,00	60,00	6,00	17,10	13,57	0,00 ***
7,20-8,00	14,00	40,00	29,00	82,90		
$\bar{X}$	8,40		8,00			
***Altamente significativo	$\chi^2$ = Chi cuadrado		$\bar{X}$ = media	n= número de pacientes		P< 0,001

El grupo de pacientes infértiles presentó en el 60% de los casos un pH seminal superior a 8,00. Estos resultados pueden estar asociados a una infección en los conductos seminales o a posibles afecciones en la próstata, debido a que la neutralidad del pH

seminal depende de la mezcla de la acidez prostática y de la alcalinidad vesicular (Pérez y cols., 1992).

En la tabla 10 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la leucocitospermia. Al aplicar el análisis estadístico  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre el incremento de leucocitos en semen y la infertilidad. El 97,10 % de los pacientes infértiles presentaba leucocitospermia, y sólo el 20,00% de los pacientes fértiles presentaban infección seminal.

**Tabla 10.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la presencia de leucocitos en líquido seminal de pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Leucocitos	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
Leucocitospermia severa	9,00	25,70	4,00	11,40	44,35	0,00 ***
Leucocitospermia leve	25,00	71,40	3,00	8,60		
Normal	1,00	2,90	28,00	80,00		
***Altamente significativo	$\chi^2 =$ Chi cuadrado		n= número de pacientes			P < 0,001

Estos resultados revelan el aumento en la concentración leucocitaria en los pacientes infértiles que presentaron alteración de las variables espermáticas, asociándose a la esterilidad de los mismos, lo cual se explica por la presencia de infecciones en las vías genito-uretrales de estos pacientes.

Estudios similares refieren que un aumento de leucocitos en el plasma seminal afecta negativamente los parámetros del mismo, lo cual sugiere que la leucocitospermia de acuerdo a su grado de concentración puede reflejar actividad en el tracto genito-uretral asociada a una anormal espermatogénesis o pobreza de la viabilidad espermática (Ricci y cols., 2002; Esfandiari y cols., 2003; Everaert y cols., 2003).

En la tabla 11 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina

y la concentración espermática. Al aplicar la prueba de  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la calidad espermática y la concentración de espermatozoides de ambos grupos. El 82,90% de pacientes infértiles presentó oligozoospermia, y el 17,10% de estos pacientes presentó azoospermia. Ninguno de ellos presentó concentración espermática normal ( $> 20 \times 10^6$  espz/ml), mientras que el 97,10% de los pacientes fértiles presentó normozoospermia en un 97,10%.

**Tabla 11.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la concentración espermática de pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

[Espermática]	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	N	%	n	%		
Azoospermicos	6,00	17,10	0,00	0,00	66,13	0,00 ***
Oligozoospermicos	29,00	82,90	1,00	2,90		
Normozoospermicos	0,00	0,00	34,00	97,10		
$\bar{X}$	7,30x10 <sup>6</sup> espz/ml		71,70x10 <sup>6</sup> espz/ml			

\*\*\*Altamente significativo     $\chi^2$ = Chi cuadrado     $\bar{X}$  = media    n= número de pacientes    P< 0,001

Estos resultados ponen de manifiesto que la disminución de la concentración espermática esta relacionada a factores como: disminución del volumen de semen, obstrucción de los conductos seminales, aumento de la viscosidad del líquido seminal, disminución de la espermatogénesis e infecciones recurrentes (Campos y cols., 1995). Estos resultados coinciden con algunas de las alteraciones encontradas en el semen de los pacientes no fértiles estudiados en este trabajo, como el volumen, pH, leucocitos, tiempo de licuefacción y viscosidad seminal.

Para el estudio de las variables motilidad, morfología y viabilidad espermática, se omitieron 6 pacientes pertenecientes al grupo infértil, debido a que los mismos no presentaban espermatozoides en el eyaculado (azoospermicos). El grupo de pacientes infértiles quedó conformado por 29 hombres oligozoospermicos, mientras que el grupo de pacientes fértiles se mantuvo con el mismo número de 35 hombres.

En la tabla 12 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la motilidad espermática. Al aplicar el análisis estadístico  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la calidad espermática y la motilidad grado “a” y “d” en ambos grupos.

**Tabla 12.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la motilidad de los espermatozoides en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Motilidad espermática	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
Motilidad grado a	0,00	0,00	16,00	45,70	52,84	0,00 ***
Motilidad grado ab	2,00	6,90	18,00	51,40		
Motilidad grado d	27,00	93,10	1,00	2,90		

\*\*\*Altamente significativo       $\chi^2$ = Chi cuadrado      n= número de pacientes      P< 0,001

El 93,10% de los pacientes infértiles presentó motilidad espermática grado “d”, mientras que el 97,10% de los pacientes fértiles presentó motilidad espermática entre grado “a” y “ab”. Esta característica les concede a los pacientes del grupo infértil dificultad para fecundar, debido a que el porcentaje de pacientes infértiles (6,90%) con movimiento progresivo (ab) es muy bajo, en comparación al porcentaje de pacientes infértiles que presentan motilidad grado (d), el cual es predominante en este tipo de pacientes.

En estudios relacionados, Courtade (1998) observó que en los pacientes con astenozoospermia (movilidad espermática disminuida) el 74,00% presentó alteraciones estructurales a nivel del flagelo, y señaló que esta anomalía puede estar asociada a infección prostática, presencia de anticuerpos antiespermáticos, alteraciones del sistema motor de los espermatozoides, ó alteraciones genéticas.

En la tabla 13 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la morfología espermática. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la morfología espermática y la infertilidad. El 69,00% de pacientes infértiles presentó morfología espermática anormal, mientras que

ninguno de los miembros del grupo de pacientes fértiles presentó anomalía en la morfología espermática.

Este hecho puede deberse a alteraciones de la concentración y movilidad de los espermatozoides producida por defectos en la espermatogénesis o por procesos infecciosos (WHO, 1992).

**Tabla 13.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la morfología espermática en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Morfología espermática	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
Anormal	20,00	69,00	0,00	0,00	31,97	0,00 ***
Normal (> 50%)	9,00	31,00	35,00	100,00		
$\bar{X}$	38,80 %		69,30 %			

\*\*\*Altamente significativo  $\chi^2$ = Chi cuadrado  $\bar{X}$  = media n= número de pacientes P< 0,001

En la tabla 14 se presenta la asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viabilidad espermática. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa (p< 0,001) entre la proporción de pacientes con espermatozoides muertos y la infertilidad. El 75,90% de los pacientes infértiles presentó alteración en la viabilidad espermática, mientras que ninguno de los pacientes fértiles presentó alteración de la viabilidad espermática.

**Tabla 14.** Asociación entre la infertilidad-fertilidad masculina y la viabilidad espermática en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

Viabilidad espermática	Infértiles		Fértiles		$\chi^2$	P
	n	%	n	%		
Muertos	22,00	75,90	0,00	0,00	37,17	0,00 ***
Vivos ( $\geq$ 50%)	7,00	24,10	35,00	100,00		
$\bar{X}$	44,30 %		62,80 %			

\*\*\*Altamente significativo  $\chi^2$ = Chi cuadrado  $\bar{X}$  = media n= número de pacientes P< 0,001

Estos resultados pueden estar relacionados al conjunto de alteraciones en las variables físicas y citomorfológicas que presentan los pacientes infértiles. Estudios análogos vinculan directamente a los radicales libres con la afección de la viabilidad espermática, debido a que el estrés oxidativo provocado por éstos aumenta la lisis de las células espermáticas (Aitken, 1994a; Burkman, 2003).

En la tabla 15 se presenta la asociación entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y las variables físicas del eyaculado. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS con la viscosidad y, asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y el tiempo de licuefacción del líquido seminal. No se encontró asociación significativa ( $p > 0,05$ ) entre la actividad de la enzima SODPS con el volumen y pH del eyaculado.

**Tabla 15.** Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y las variables físicas del líquido seminal en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

	<b>Licuefacción</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>SODPS</b>		<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
		<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>		
Anormal	15,00	21,43	12,00	17,14	11,70	0,00 ***
Normal	7,00	10,00	36,00	51,43		
	<b>Viscosidad</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>SODPS</b>		<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
		<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>		
Aumentada	9,00	12,86	10,00	14,29	8,57	0,01 *
Lig. Aument.	6,00	8,57	5,00	7,14		
Normal	7,00	10,00	33,00	47,14		
	<b>pH seminal</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>SODPS</b>		<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
		<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>		
> 8,00	12,00	17,14	15,00	21,43	3,41	0,06 NS
Normal	10,00	14,29	33,00	47,14		
	<b>Volumen</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>SODPS</b>		<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
		<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>		
< 2 mL	5,00	7,14	4,00	5,71	1,65	0,19 NS
Normal	17,00	24,29	44,00	62,86		

NS= No significativo      \*Significativo      P < 0,05      \*\*\*Altamente significativo      P < 0,001  
 $\chi^2$ = Chi cuadrado    n= número de pacientes    SODPS= Superóxido dismutasa en plasma seminal

Las asociaciones significativas encontradas pueden estar relacionadas con la existencia de radicales libres en las vías seminales, que puede producir deterioro en las secreciones de la vesícula seminal y la próstata, provocando un aumento de la viscosidad y la no licuefacción del líquido seminal. También puede verse afectado el volumen y pH seminal (Comhaire y cols., 1999).

**Tabla 16.** Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y las variables citomorfológicas del semen en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

<b>[Espermática]</b>	<b>SODPS</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Azoospermico	3,00	4,29	3,00	4,29	25,13	0,00 ***
Oligozoosperm.	18,00	25,71	12,00	17,14		
Normozoosperm.	1,00	1,43	33,00	47,14		
<b>Leucocitos</b>	<b>SODPS</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Leuc. Severa	6,00	8,60	7,00	10,00	23,19	0,00 ***
Leuc. Leve	16,00	22,90	12,00	17,10		
Normal	0,00	0,00	29,00	41,40		
<b>Morfología</b>	<b>SODPS</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Anormal	13,00	20,31	7,00	10,94	17,38	0,00 ***
Normal	6,00	9,38	38,00	59,37		
<b>Motilidad</b>	<b>SODPS</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Grado a	1,00	1,56	15,00	23,43	22,96	0,00 ***
Grado ab	1,00	1,56	19,00	29,69		
Grado d	17,00	26,56	11,00	17,20		
<b>Viabilidad</b>	<b>SODPS</b>					
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P</b>
Muertos	14,00	21,88	8,00	12,50	18,22	0,00 ***
Vivos	5,00	7,81	37,00	57,81		

\*\*\*Altamente significativo  $\chi^2$ = Chi cuadrado n= número de pacientes P< 0,001  
SODPS= Superóxido dismutasa en plasma seminal

En la tabla 16 se presenta la asociación entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y las variables citomorfológicas del semen. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación altamente significativa (p< 0,001) entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y la concentración espermática, leucocitos, morfología, motilidad y

viabilidad espermática. Estos resultados pueden deberse a una mayor peroxidación de ácidos grasos, producida por los radicales libres, que conlleva a una permeabilización de las membranas plasmática y acrosomial conduciendo a una pérdida de la morfología, viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide (Álvarez y Storey, 1984).

La asociación negativa que se observa entre la actividad de la enzima SOD en líquido seminal y el número de leucocitos, puede estar relacionada con el efecto dañino que los procesos inflamatorios de las vías seminales tienen sobre los sitios de producción de la enzima, lo que disminuiría su actividad (Quintero y cols., 2000).

Algunos autores afirman que la leucocitospermia no actúa de forma aislada en la disminución de la calidad espermática, sino que unida a factores de riesgo determinan la infertilidad en el hombre. Otros investigadores aseguran que la relación negativa de la actividad de la enzima SOD con la movilidad es un reflejo de una disminución de la función protectora de la enzima SOD contra el estrés oxidativo, que se sabe produce un efecto negativo sobre la función de los espermatozoides (Nonogaki y cols., 1992; Perry y cols., 1993).

En la tabla 17 se presenta la asociación entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y algunos factores de riesgo de la calidad espermática. Al aplicar la prueba estadística  $\chi^2$ , se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la actividad de la enzima SODPS y el consumo de alcohol. Para los factores tabaquismo y actividad física, no se encontró asociación significativa ( $p > 0,05$ ) con respecto a la actividad de la enzima SODPS. Al aplicar el OR, se encontró que los pacientes infértiles que consumen alcohol tienen una probabilidad de presentar disminución de la actividad de la enzima SODPS 6,55 veces más altas que en los hombres infértiles que no consumen alcohol.

Una explicación a los resultados conseguidos entre la asociación de la actividad de la enzima SODPS y el consumo de alcohol puede estar vinculada con la cantidad y frecuencia con que los pacientes infértiles ingieren este factor. La constante exposición



del hombre a la ingesta de alcohol produce en él disminución de los niveles de testosterona; este déficit conlleva a una disminución de la función de las glándulas seminales, que entre otras, es el de producir la enzima SOD e intervenir en el proceso de maduración espermática (Volgt y cols., 1986; Wentz 1986; Curtis y cols., 1997).

**Tabla 17.** Asociación entre la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal y algunos factores de riesgo en pacientes provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa. Cumaná, octubre 2007 - mayo 2008.

<b>Alcohol</b>	<b>SODPS</b>				$\chi^2$	<b>P</b>	<b>OR</b>
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>			
Si	20,00	28,57	29,00	41,43	5,31	0,02 *	6,55
No	2,00	2,86	19,00	27,14			

<b>Tabaquismo</b>	<b>SODPS</b>				$\chi^2$	<b>P</b>	<b>OR</b>
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>			
Si	2,00	2,86	9,00	12,86	0,46	0,50 NS	0,43
No	20,00	28,57	39,00	55,71			

<b>Act. Física</b>	<b>SODPS</b>				$\chi^2$	<b>P</b>	<b>OR</b>
	<b>&lt; 2,18</b>	<b>%</b>	<b>Normal</b>	<b>%</b>			
Si	10,00	14,29	18,00	25,71	0,39	0,53 NS	1,39
No	12,00	17,14	30,00	42,86			

\*Significativo P< 0,05 NS= No significativo P> 0,05  $\chi^2$ = Chi cuadrado n= número de pacientes  
OR =odd ratio SODPS= Superóxido dismutasa en plasma seminal

En cuanto a la actividad física, algunos investigadores han fallado en la observación de cualquier signo de estrés oxidativo inducido por el ejercicio, lo que pudiera deberse al instrumento de recolección de datos utilizado en las diferentes investigaciones. Factores tales como el estado de entrenamiento, la edad y el género también podrían jugar un rol importante. Además, se ha utilizado una amplia variedad de protocolos de ejercicio, pero solamente el ejercicio de alta intensidad o de larga duración parece conducir a un incremento suficientemente grande en la producción de radicales libres, como para sobrepasar las defensas antioxidantes, y así influir sobre la calidad espermática (Hadi y cols., 1987; Cooper y cols., 2002).

## CONCLUSIONES

No hubo dependencia entre la actividad de la enzima SODS y la actividad de la enzima SODPS.

Existe asociación entre los parámetros seminales de un individuo sano y fértil y un paciente no fértil con la calidad espermática.

Existe asociación entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y la calidad espermática.

No hubo asociación entre el tabaquismo y la actividad física con las alteraciones de la actividad antioxidante de la enzima SODPS.

Existe una evidente asociación entre la actividad antioxidante de la enzima SODPS y el hábito de consumir alcohol.

Es posible asociar al estrés oxidativo producido por agentes externos como el alcohol y la leucocitospermia, originada por infecciones del tracto genito-uretral masculino, con la calidad seminal de los pacientes estudiados; por lo tanto es posible asociar la infertilidad masculina con el estrés oxidativo.

## RECOMENDACIONES

Disminuir la frecuencia en el consumo de alcohol. Se ha determinado que el consumo de éste en exceso afecta la capacidad fecundante en el hombre.

Evitar el hábito tabáquico. Se ha determinado que fumar una cajetilla o más al día disminuye la motilidad espermática, y que unido al consumo de alcohol puede producir infertilidad en el hombre.

Excluir a pacientes diabéticos si se desea realizar más estudios sobre el estrés oxidativo en líquido seminal. La generación de productos de glicosilación avanzada, la activación de la vía de los polioles y de las hexosaminas, así como la activación de las proteínas quinasas C están en estrecha relación con la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen a un estrés oxidativo crónico en pacientes con diabetes mellitus.

Evaluar la capacidad antioxidante de otras sustancias como la GPx y Ubiquinol en líquido seminal. Estas sustancias le continúan en importancia a la enzima SOD en el sistema antioxidante de las vías seminales y espermatozoides.

Evaluar cuáles son los factores de riesgo mayormente asociados al estrés oxidativo en la fertilidad femenina, y cómo éste puede inhibir la capacidad fecundante de la mujer.

## BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A.; Saleh, RA. y Bedaiwy, MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and Sterility, 79: 829-843.

Aitken, RJ. y Clarkson, JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility; 8: 459-469

Aitken, RJ. 1994a. A free radical theory of male infertility. Reproduction, Fertility and Development, 6(1): 19-23.

Aitken, RJ. 1994b. A free radical theory of male infertility. Reproduction Fertility and Development, 7(4): 659-668.

Aitken, RJ.; Gordon, E.; Harkiss, D.; Twigg, JP.; Milne, P.; Irvine, DS. y Jennings, Z. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biology of Reproduction, 59: 1037-1046.

Alkan, I.; Simsek, F.; Haklar, G.; Kervanciogly, E.; Ozveri, H. y Yalcin, S. 1997. Reactive oxigen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. The Journal of Urology, 157(1):140-149.

Álvarez, JG. y Storey, BT. 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Biology of Reproduction; 30: 323-332

Álvarez, JG.; Touchstone, JC.; Blasco, L. y Storey BT. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology; 8: 338-348

Álvarez, JG. y Storey, BT. 1995. Differential Incorporation of Fatty Acids into and Peroxidative Loss of Fatty Acids from Phospholipids of Human Spermatozoa. Molecular Reproduction and Development; 42: 334-346

Androgen. Infertilidad Masculina". "Centro de infertilidad masculina". <<http://www.androgen.es/>>. (22/03/2006).

Baker, MA. y Aitken, RJ. 2005. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. Reproduction Biology and Endocrinology, 29: 67-69.

Ball, BA.; Baumber, J. y Sabeur, K. 2002. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. Theriogenol, 58: 299-300.

Batellier, F.; Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, JM. y Magistrini, M. 2001. Advances in cooled semen technology. Animal Reproduction Science, 68: 181-190.

Beckman, KB. y Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. Reviews Physiological, 78: 547-581.

Burkman, L. 2003. Conferencia Anual de la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva. Universidad estatal NY, Búffalo.

Campana, A.; Agostini, A.; Bischof, P.; Tawfik, E. y Mastorilli A. 1995. Evaluation of infertility. Human Reproduction, 1: 586-606.

Comhaire, FH.; Mahmoud, AMA. y Depuydt, CE. 1999. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperman quality and fertilizing potential: The andrologist viewpoint. Human Reproduction, 5 (5): 393-398.

Cooper, EC.; Vollaard, NBJ.; Choueir, T. y Wilson, MT. 2002. Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochemical Society Transactions, 30(2): 280-285.

Courtade, M. 1998. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. Fertility and Sterility, 70: 315-319.

Curtis, KM.; Savitz, DA. y Arbuckle, TE. 1997. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. American Journal of Epidemiology, 146(1): 32-41.

Eliasson, R. 1977. Supravital staining of human spermatozoa. Fertility and Sterility, 28: 1257.

Escalona, M. 2005. "Estrés oxidativo y nutrición". "Sitio del Laboratorio de Nutrición, Chile". <<http://www.labnutricion.cl/estres.htm>>. (10/10/2005).

Esfandiari, A.; Sharma, R.; Saleh, R.; Thomas Jr., A. y Agarwal, A. 2003. Utility of the Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Seminal Leukocytes and Spermatozoa. Journal of Andrology, 24: 862-870.

Everaert, K.; Mahmoud, A.; Depuydt, C.; Maeyaert, M. y Comhaire, F. 2003. Chronic prostatitis and male accessory gland infection: is there an impact on male infertility. Andrologia, 35: 325-330.

Fraczek, M. y Kurpysz, M. 2005. The redox system in human semen and

peroxidative damage of spermatozoa. Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej, 59: 532-524.

Gallardo, M.; Pereira, G.; Grondona, F.; Padrón, R.; Barrios, MV.; Lantiga, A.; Domínguez, E.; Fragas, R.; Surques, B.; Reyes, A.; Gallardo, AM. y Vega, V. 2003. Relación de la alteración espermática en el líquido seminal con algunos metabolitos del estrés oxidativo. Reviews Cubana of Investigation Biomedical, 22(2): 90-94.

Girotti, AW. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of Lipid Research, 39: 1529-1542.

González, CF.; Kortebani, G. y Mazzolli, AB. 1993. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. Archives of Andrology, 30: 63-68.

Hadi, HA.; Hill, JA. y Castillo, RA. 1987. Alcohol and reproductive function. Obstetrical and Gynecological Survey, 42(2): 69-74.

Henry, JB. 2000. Diagnóstico clínico y tratamiento clínico. Novena Edición. Editorial Masson. México.

Imai, H.; Suzuki, K.; Ishizaka, K.; Ichinose, S.; Oshima, H.; Okayasu, I.; Emoto, K.; Umeda, M. y Nakagawa, Y. 2001. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. Biology of Reproduction, 64: 674-683.

Jow, WW.; Schlegel, PN.; Cichon, Z.; Phillips, D.; Goldstein, M. y Bardin CW. 1993. Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. Journal of Andrology; 14: 439-447

Lamirande, E. y Gagnon C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Human Reproduction, 10(Suppl): 15-21.

Lewis, SE.; Boyle, PM.; McKinney, KA.; Young, IS. y Thompson, W. 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 64: 868-870.

Mazzilli F.; Rossi T.; Marchesini N.; Ronconi C. y Dondero F. 1994. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. Fertility and Sterility, 62(4): 862-868.

Moustafa, M.; Sharma, R.; Thornton, J.; Mascha, E.; Abdel-Hafez, M.; Thomas, A. y Agarwal, A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturizing in spermatozoa from patients examined for infertility. Human Reproduction, 19: 129-138.

Nebot, C., y cols. 1993. Spectrophotometric Assay of Superoxide Dismutase Activity Based on the Activated Autoxidation of a Tetracyclic Catechol. Analytical Biochemistry, 214: 442-451.

Nonogaki, T.; Noda, Y.; Narimoto, K.; Shiotani, M.; Mori, T. y Matsuda, T. 1992. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. Human Reproduction, 7: 81-85.

Ollero, M.; Gil-Guzman, E.; Lopez, M.; Sharma, RK.; Agarwal, A.; Lardson, K.; Evenson, D.; Thomas, AJ. y Alvarez, JG. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Human Reproduction, 16: 1912-1921.

OMS. 1989. Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Buenos Aires: Editorial Panamericana.

Palenzona, F. 2005. Unidad Genética Médica y Reproducción Asistida (GENTIFER). Interpretación del espermatograma de fertilidad. Barquisimeto, Lara.

Pérez, M. 1990. Composición y estudio del semen. En: Padrón RS. Temas de reproducción masculina y diferenciación sexual. Editorial Científico-Técnica. La Habana.

Pérez, M.; Padrón, RS. y Abreu, M. 1992. Ausencia funcional de los conductos eyaculadores. Revista Cubana de Endocrinología, 3: 9-14.

Perry, ACF.; Jones, R. y Hall, L. 1993. Isolation and characterization of a rat cDna clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. Biochemical Journal, 283: 21-25.

Poirot, C. y Cherruau, B. 2005. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39 (2): 225-241

Quintero Pérez, W.; Mallea Sánchez, L.; Machado Curbel, AJ.; Llópiz Janer, N.; Céspedes Miranda, E.; Monzón Benítez, G. y Yepes Oliveros, S. 2000. Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 19(3): 183-185.

Rao, B.; Soufir, J.; Martin, M. y David, G. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Research, 24: 127-134.

Ricci, G.; Perticarari, S.; Fragonas, E.; Giolo, E.; Canova, S.; Pozzobon, C.; Guaschino, S. y Presani, G. 2002. Apoptosis in human sperman: its correlation with

semen quality and the presence of leukocytes. Human Reproduction, 17: 2665-2672.

Saleh, R. y Agarwal, A. 2002. oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of Andrology, 23: 737-752.

Selley, ML.; Lacey, MJ.; Bartlet, MR.; Copeland, CM. y Ardlie NG. 1991. Content of significant amounts of a cytotoxic and products of lipid peroxidation in human semen. Journal of Reproduction Fertility, 92: 291-298.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. Biometría: Principios y Métodos de Investigación Biológica. Editorial H. Blume. Ediciones Madrid.

Thiele, J.; Freisleben, H.; Fuchs, J. y Ochsendorf, F. 1995. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminiscence in washed semen. Human Reproduction, 10: 110-115.

Userpater, M.; Cavanagh, E.; Fraga, C.; Puddú, M.; Tamaroff, C.; Valtuille, R.; Ferder, L. e Inserta, F. 2004. Estrés oxidativo en hemodiálisis. Reviews of Nefrology, Diálisis and Transplant, 24(3): 111-118.

Volgt, HJ.; Heller, WD. y Borelli, S. 1986. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers and never smokers. Fertility and Sterility, 45(1):106-110.

Wentz, AC. 1986. Cigarette smoking and infertility. Fertility and Sterility, 46(3): 365-367.

WHO. 1992. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Third Edition. Cambridge.

Wolf, H. y Anderson, DJ. 1988. Immunohistologic characterization and quantification of leukocytes subpopulations in human semen. Fertility and Sterility, 49: 497-504.

Wolf, H.; Politch, JA.; Martínez, A.; Haimovich, F.; Hill, JA. y Anderson, DJ. 1990. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. Fertility and Sterility, 53: 523-536.



## **ANEXOS**



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**  
**NÚCLEO DE SUCRE**  
**ESCUELA DE CIENCIAS**

**ANEXO 1**  
**CONSENTIMIENTO VÁLIDO**

Bajo la coordinación de la Licenciada Daxi Caraballo asesora académica del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, se realizará el proyecto de investigación titulado: **EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LÍQUIDO SEMINAL Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA.**

Yo: \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_ Nacionalidad: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_ Domiciliado en: \_\_\_\_\_

En uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción, ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio indicado, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera clara y sencilla por parte del grupo de Investigadores de este proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LÍQUIDO SEMINAL Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA” en la ciudad de Cumaná, Estado Sucre.
2. Tener conocimiento claro del objetivo del trabajo.

3. Conocer bien el protocolo experimental expuesta por el investigador, en el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en: Donar de manera voluntaria una muestra de líquido seminal, la cual será obtenida por masturbación después de 48 horas y antes de siete días de abstinencia sexual.
4. Que la muestra de líquido seminal que acepto donar será utilizada única y exclusivamente para determinar infertilidad.
5. Que el equipo de personas que realiza esta investigación me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
7. Que mi participación en este estudio no implica riesgo e inconveniente para mi salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas.
9. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendido recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

## DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria por tal motivo acuerdo:

1.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en la muestra de semen, la cual acepto donar para los fines indicados anteriormente.

2.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa hacia mi persona:

---

Firma del voluntario

Nombre y apellido: \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo antes mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médico, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de compromiso con este estudio.

Por el proyecto,

Nombre: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS**

**ANEXO 2  
ENCUESTA DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**Datos del paciente:**

Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

**Antecedentes personales:**

¿Ud. fuma? No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_

¿Nunca, ocasionalmente o frecuentemente? \_\_\_\_\_

¿Ud. ingiere licor? No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_

¿Nunca, ocasionalmente o frecuentemente? \_\_\_\_\_

¿Qué tipo de actividad física practica? \_\_\_\_\_

¿Nunca, ocasionalmente o frecuentemente? \_\_\_\_\_

## ANEXO 3

### RECOLECCIÓN Y ENVÍO DE LA MUESTRA

1. Recoger la muestra después de 48 horas y no más de 7 días de abstinencia sexual. Se debe anotar el nombre del paciente, período de abstinencia, así como la fecha y hora de recolección de la misma.
2. Lo ideal es que la muestra se recoja en la intimidad de una dependencia próxima al laboratorio. De lo contrario, se debe enviar la muestra al laboratorio antes de transcurrida una hora de recolección y si la de los espermatozoides es anormalmente baja, se debe tomar otra muestra lo antes posible después de la primera recolección.
3. La muestra debe obtenerse mediante masturbación y eyacular dentro de un recipiente de vidrio o plástico limpio de boca ancha; si utiliza recipiente de plástico, verifique bien que el mismo esté limpio ya que es usual que provoquen efectos tóxicos sobre los espermatozoides. El recipiente debe estar tibio para reducir al mínimo riesgos de shock por frío.
4. No se debe utilizar condones, a menos que sea específico para este fin. El *coitus interruptus* no es aceptado para la recolección de la muestra.
5. La muestra incompleta no se podrá analizar, en particular si se pierde la primera porción del eyaculado.
6. La muestra deberá protegerse de las temperaturas externas (no menos de 20 °C ni más de 40 °C) durante el traslado al laboratorio.

## **HOJA DE METADATOS**



# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	Evaluación Del Estrés Oxidativo A Través De La Determinación De Superóxido Dismutasa En Líquido Seminal Y Su Relación Con La Calidad Espermática
<b>Subtítulo</b>	

## Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
BLANCO. MILENA C.	<b>CVLAC</b>	16 314 572
	<b>e-mail</b>	<a href="mailto:mile_b_83@hotmail.com">mile_b_83@hotmail.com</a>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

## Palabras o frases claves:

SOD, estrés oxidativo, líquido seminal, infertilidad masculina, leucocitospermia, espermatoograma.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso

– 2/5

## Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

## Resumen (abstract):

Con el propósito de evaluar el estrés oxidativo en líquido seminal y su relación con la calidad espermática, se realizó un estudio a un grupo de 70 hombres de los cuales 35 de ellos presentaban alteraciones en los parámetros seminales. Todos provenientes de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa en la ciudad de Cumaná. Las variables evaluadas en este estudio fueron: características físicas y citomorfológicas del semen, actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en suero sanguíneo (SODS) y actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma seminal (SODPS), y exposición a factores de riesgo como alcohol, tabaco y actividad física. Se encontró importante asociación ( $p < 0,001$ ) entre la infertilidad de los pacientes evaluados y la actividad de la enzima SODPS. El análisis estadístico de regresión lineal simple entre la actividad de la enzima SODPS vs. actividad de la enzima SODS, no evidenció dependencia ( $p > 0,05$ ) entre la actividad de la enzima SODPS y la actividad de la enzima SODS. Se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la infertilidad de los pacientes estudiados y el volumen seminal. Para las variables físicas (tiempo de licuefacción, viscosidad y pH) y citomorfológicas evaluadas, se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre éstas y la infertilidad de los pacientes estudiados. Así mismo, se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tiempo de licuefacción y viscosidad seminal con la actividad antioxidante de la enzima SODPS. Para las variables citomorfológicas y su asociación con la actividad antioxidante de la enzima SODPS, se encontró asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Al aplicar el estadístico Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), se encontró que el consumo de alcohol está asociado ( $p < 0,05$ ) a la infertilidad de los pacientes estudiados. Asumiendo estos resultados, es posible asociar al estrés oxidativo en líquido seminal producido por el consumo de alcohol y la leucocitospermia manifestada por los pacientes evaluados con la calidad espermática de los mismos, y por lo tanto se puede asociar a la infertilidad masculina.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso

– 3/5

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
DAXI CARABALLO	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5 859 659
	e-mail	<a href="mailto:daxicaraballo@hotmail.com">daxicaraballo@hotmail.com</a>
	e-mail	<a href="mailto:daxicaraballo@gmail.com">daxicaraballo@gmail.com</a>
WILLIAM VELÁSQUEZ	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9 278 206
	e-mail	<a href="mailto:wjvelasgez@yahoo.es">wjvelasgez@yahoo.es</a>
	e-mail	
DANIEL BELMAR	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 642 075
	e-mail	<a href="mailto:belmarlc@cantv.net">belmarlc@cantv.net</a>
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	04	01

Lenguaje: Spa

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

## Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_MCB.doc	Application/word

## Alcance:

**Espacial :** Universal (Opcional)

**Temporal:** \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciatura en Bioanálisis

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciatura

**Área de Estudio:** Bioanálisis

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

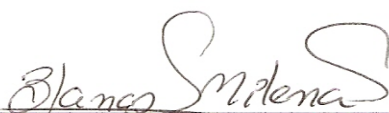
Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso

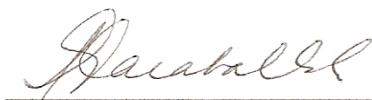
– 5/5

## Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de difundir por cualquier medio el resumen de este trabajo de investigación. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales y comerciales.



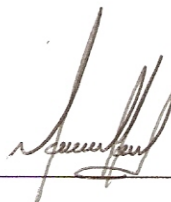
**Milena Carolina Blanco**



**Profa. Daxi Caraballo**



**Prof. William Velásquez**



**Prof. Daniel Belmar**

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:**

