



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina:  
Análisis de marcadores bioquímicos en plasma seminal y su  
asociación con parámetros del seminograma y la capacitación  
espermática

Celia Villalba Martínez



Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina:  
Análisis de marcadores bioquímicos en plasma seminal y su  
asociación con parámetros del seminograma y la capacitación  
espermática**

**CELIA VILLALBA MARTÍNEZ**

**2014**



**Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina:  
Análisis de marcadores bioquímicos en plasma seminal y su  
asociación con parámetros del seminograma y la capacitación  
espermática**

**Memoria presentada por  
CELIA VILLALBA MARTÍNEZ  
Para optar al grado de doctor**

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Tesis realizada bajo la dirección de la  
Dra. Consuelo Tormo Díaz  
Dr. Joaquín de Juan Herrero**

**Alicante 2014**



## Agradecimientos

Siento la necesidad de dar las gracias de corazón a todas las personas que de una u otra manera han intervenido en el desarrollo de esta Tesis.

En primer lugar es mi deseo agradecer con profundo respeto y cariño la dirección de la Dra. Consuelo Tormo Díaz, por su implicación absoluta en este proyecto, su paciencia y amistad.

Igualmente, quiero expresar mi agradecimiento a María Sempere por su colaboración y asesoramiento en el análisis estadístico.

A David Apraiz y al equipo de Espectrofotometría del laboratorio LABAQUA por su colaboración en la determinación de metales.

Al equipo de enfermería del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Elche, por su ayuda en el reclutamiento de muestras: Charo, Carmen, Rafa y Yolanda.

A los facultativos y residentes del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Elche y a los de Bioquímica Clínica y Patología Molecular del Hospital Clínico de Valencia, por su apoyo y amistad.

A los pacientes que aceptaron formar parte del estudio voluntariamente.

A mis padres, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí y por su ánimo y estímulo para que saliera adelante esta investigación.

A mi marido que me ha mostrado en todo momento comprensión, y un apoyo constante y paciente.

Finalmente, deseo hacer constar mi agradecimiento a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario de Elche por el apoyo mostrado al financiar el proyecto de investigación IMPLICACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INFERTILIDAD MASCULINA: ANÁLISIS DE MARCADORES

BIOQUÍMICOS EN PLASMA SEMINAL Y SU ASOCIACIÓN CON LOS PARÁMETROS DEL SEMINOGRAMA Y LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA (FIBELX 08/04), fruto del cual ha sido posible la realización de la presente Tesis.

A todos vosotros, muchas gracias por haber posibilitado que esta Tesis Doctoral viera la luz.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante









## **ÍNDICE**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Patogénesis de la infertilidad masculina</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Evaluación del semen en el estudio de la infertilidad</b>	<b>8</b>
1.2.1 Breve recuerdo de la morfología del espermatozoide	8
1.2.2 Estudio del seminograma básico	10
1.2.3 Capacitación espermática	12
1.2.4 Valores de Referencia	13
1.2.5 Determinaciones complementarias para el estudio de la infertilidad en el varón	16
1.2.5.1 Análisis microbiológico: Cultivo del semen	16
1.2.5.2 Evaluación hormonal	17
1.2.5.3 Cariotipo y estudio de cromosopatías	17
<b>1.3 Estrés oxidativo</b>	<b>18</b>
1.3.1 Génesis del estrés oxidativo	18
1.3.2 Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina	26
1.3.3 Agentes implicados en el mantenimiento del estatus oxidativo	47
1.3.3.1 Antioxidantes	47
1.3.3.1.1 Enzimas antioxidantes	48
1.3.3.1.1.1 Catalasa (CAT)	48
1.3.3.1.1.2 Glutación Peroxidasa (GPx)	49
1.3.3.1.1.3 Superóxido Dismutasa (SOD)	50
1.3.3.1.2 Vitaminas	52
1.3.3.1.2.1 Vitamina C	52
1.3.3.1.2.2 Vitamina B <sub>12</sub>	53
1.3.3.1.2.3 Ácido fólico	54
1.3.3.2 Productos del estrés oxidativo: Malondialdehído (MDA)	55
1.3.4 Aspectos generales de los Metales y Elementos Traza y su relación con el estrés oxidativo en la infertilidad masculina	56
1.3.4.1 Aluminio	57
1.3.4.2 Cadmio	58
1.3.4.3 Cobalto	59
1.3.4.4 Cobre	59
1.3.4.5 Cromo	60
1.3.4.6 Hierro	61
1.3.4.7 Manganeso	62
1.3.4.8 Mercurio	63

1.3.4.9 Níquel	64
1.3.4.10 Plomo	64
1.3.4.11 Selenio	65
1.3.4.12 Vanadio	66
1.3.4.13 Zinc	67
<b>1.4 Factores de riesgo asociados a la infertilidad masculina</b>	<b>70</b>
<b>1.5 Justificación del estudio</b>	<b>72</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
2.1 Hipótesis de trabajo	77
2.2 Objetivos Generales y Específicos	77
<b>3. SUJETOS A ESTUDIO</b>	<b>81</b>
3.1 Selección de los sujetos a estudio	83
3.1.1 Criterios de inclusión de Sujetos	86
3.1.2 Criterios de exclusión de Sujetos	87
3.2 Establecimiento de grupos de varones en atención a sus características seminales	87
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>91</b>
4.1 Recogida de las muestras de semen	93
4.2 Análisis básico del semen y de la capacitación espermática	94
4.2.1 Estudio macroscópico	94
4.2.2 Estudio microscópico	96
4.2.2.1 Recuento de espermatozoides y de movilidad espermática	96
4.2.2.2 Estudio morfológico y recuento espermático diferencial	98
4.2.2.3 Test de vitalidad espermática por exclusión de colorante	103
4.2.2.4 Test de Hos o de integridad funcional de la membrana espermática	104
4.2.2.5 Test de la aglutinación espermática	105
4.2.2.6 Test de capacitación espermática	107
4.2.3 Estudio bioquímico	110
4.3 Métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo	112
4.3.1 Determinación de Metales y Elementos Traza	112
4.3.2 Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes	116
4.3.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)	116
4.3.2.2 Glutación peroxidasa (GPx)	117

4.3.2.3 Catalasa (CAT)	118
4.3.3 Determinación de vitaminas antioxidantes	119
4.3.3.1 Vitamina B <sub>12</sub> y Ácido fólico	119
4.3.3.2 Vitamina C	119
4.3.4 Determinación de Malondialdehído (MDA)	121
<b>4.4 Diseño del Cuestionario socio-demográfico y clínico</b>	<b>123</b>
<b>4.5 Métodos estadísticos</b>	<b>126</b>

## **5. RESULTADOS** **131**

<b>5.1 Evaluación de los métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo</b>	<b>133</b>
5.1.1 Precisión analítica	133
5.1.2 Exactitud analítica	135
5.1.3 Linealidad y límite de detección	136
5.1.4 Optimización del método ICP-MS-ORC para la determinación simultánea de Metales y Elementos Traza en plasma seminal	136
<b>5.2 Análisis descriptivo de las variables estudiadas</b>	<b>137</b>
5.2.1 Descriptivo de los datos analíticos	137
5.2.1.1 Resultados del seminograma	138
5.2.1.2 Resultados de los agentes de estrés oxidativo	140
5.2.1.2.1 Resultados de los Metales y Elementos Traza	140
5.2.1.2.2 Resultados de las defensas antioxidantes	143
5.2.1.2.3 Resultados de productos de oxidación: MDA	143
5.2.2 Descriptivo de las respuestas del Cuestionario socio-demográfico y clínico	144
5.2.2.1 Datos clínicos	144
5.2.2.2 Hábitos de vida	146
5.2.2.3 Datos socio-demográficos	149
5.2.2.4 Datos ambientales	150
<b>5.3 Estudios de relación de los diferentes agentes implicados en el estrés oxidativo</b>	<b>152</b>
5.3.1 Estudios de asociación entre las variables estudiadas	152
5.3.1.1 Asociación de los resultados de las respuestas del Cuestionario socio-demográfico y clínico con las distintas variables analíticas	152
5.3.1.1.1 Asociación con los parámetros del seminograma y de la capacitación espermática	153

5.3.1.1.2 Asociación con los niveles de Metales y Elementos Traza	154
5.3.1.1.3 Asociación con los niveles de vitaminas y enzimas	161
5.3.1.1.4 Asociación con los resultados del MDA	166
5.3.1.2 Asociaciones de los niveles de Metales y Elementos Traza	167
5.3.1.2.1 Asociación con los parámetros del seminograma y de la capacitación espermática	167
5.3.1.2.2 Asociación con los niveles de enzimas antioxidantes	169
5.3.1.2.3 Asociación con los niveles de vitaminas antioxidantes	171
5.3.1.3 Asociación de los niveles de vitaminas y enzimas antioxidantes	172
5.3.1.3.1 Asociación con los parámetros del seminograma y la capacitación espermática	172
5.3.1.3.2 Asociación de los niveles de enzimas con los niveles de vitaminas	172
5.3.1.4 Asociaciones de los resultados del MDA	173
5.3.1.4.1 Asociación con los parámetros del seminograma y la capacitación espermática	173
5.3.1.4.2 Asociación con los niveles de Metales y Elementos Traza	173
5.3.1.4.3 Asociación de los niveles de defensas antioxidantes	174
5.3.2 Estudios comparativos entre grupos de sujetos	176
5.3.2.1 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del seminograma	176
5.3.2.1.1 Estudios de los agentes de estrés oxidativo	177
5.3.2.1.1.1 Estudios de los Metales y Elementos Traza	177
5.3.2.1.1.2 Estudios de las defensas antioxidantes	178
5.3.2.1.1.3 Estudios de los productos de oxidación: MDA	180
5.3.2.1.2 Estudios del Cuestionario socio-demográfico y clínico	180

5.3.2.2 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del test de capacitación	184
5.3.2.3 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del MDA	188
5.3.2.3.1 Estudios del seminograma y de la capacitación espermática	189
5.3.2.3.2 Estudios de los agentes de estrés oxidativo	190
5.3.2.3.2.1 Estudios de los Metales y Elementos Traza	190
5.3.2.3.2.2 Estudios de las defensas antioxidantes	192
5.3.2.3.3 Estudios del Cuestionario socio-demográfico y clínico	194
<b>5.4 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas encontradas para la infertilidad masculina</b>	<b>196</b>
5.4.1 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del seminograma	197
5.4.2 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del test de capacitación	201
5.4.3 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del MDA	206
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>213</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>259</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>265</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>283</b>
ANEXO I. Hoja de Petición de Seminograma	285
ANEXO II. Instrucciones de recogida de la muestra de semen	286
ANEXO III. Hoja de trabajo	287
ANEXO IV. Cuestionario socio-demográfico y Clínico	288
ANEXO V. Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras de Semen	294







## **ABREVIATURAS**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



- AA: Ácido Araquidónico
- ABC: Área Bajo la Curva
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Ag: Plata
- Al: Aluminio
- ARN: Ácido ribonucleico
- As: Arsénico
- ASMR: American Society for Reproductive Medicine
- ATP: Adenosin trifosfato
- BCPs: Bromocloropropanos
- Bi: Bismuto
- BSA: Albúmina de suero bovino
- cAMP: Adenosin Monofosfato Cíclico
- CAT: Catalasa
- CB1-R: Receptores para Cannabinoides Tipo 1
- Cd: Cadmio
- CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulador
- Cit P<sub>450</sub>: Citocromo P<sub>450</sub>
- CK: Creatin kinasa
- CL: Citrato liasa
- ClO<sup>-</sup>: Ácido hipoclorito
- Co: Cobalto
- CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono
- Cr: Cromo
- Cu: Cobre
- DE: Desviación Estándar
- DHA: Ácido docosaheptaenoico
- e<sup>-</sup>: Electrón
- EDTA: Ácido etilendiamino tetracético
- ENAC: Entidad Nacional de Acreditación
- EO: Estrés oxidativo
- EPA: Ácido eicosapentaenoico
- EROs: Especies Reactivas de Oxígeno
- ESHRE: Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana.
- E: Especificidad
- ETC: Cadena de Transporte de Electrones
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

- Fe: Hierro
- FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- FIV: Fecundación *in vitro*
- FSH: Hormona foliculoestimulante
- GGH: Gamma Glutamil Hidrolasa
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
- G-6-PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
- GPx: Glutati6n Peroxidasa
- GR: Glutati6n Reductasa
- GSH: Glutati6n reducido
- GSSG: Glutati6n oxidado
- GST: Glutathion-S-Transferasa
- $\gamma$ -GT: Gamma-glutamil transferasa
- GPT: Glutamato-piruvato transaminasa o Alanina aminotransferasa
- $H^+$  : Hidrogeniones
- HClO: 1cido hidroclosoro
- HDL: Lipoprote6na de alta densidad
- HEPES: 1cido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireraciril-Etanosulf6nico]
- Hg: Mercurio
- H.G.U.: Hospital General Universitario
- $HNO_3$ : 1cido N6trico
- $H_2O$  : Agua
- $H_2O_2$ : Per6xido de hidr6geno
- HPLC: Cromatograf6a l6quida de alta presi6n
- IA: Inseminaci6n Artificial
- IAC: Inseminaci6n Artificial Conyugal
- $IC_{95\%}$  : Intervalo de Confianza del 95%
- ICP: Espectrofotometr6a de emisi6n de plasma acoplado inductivamente
- ICP-MS: Espectrofotometr6a de emisi6n de plasma acoplada a la espectrometr6a de masas
- ICSI: Inyecci6n intracitoplasm1tica de espermatozoides
- IDR: Ingesta Diaria Recomendada
- IgA: Inmunoglobulinas tipo A
- IgG: Inmunoglobulinas tipo G
- IMC: 1ndice de Masa Corporal
- INE: Instituto Nacional de Estad6stica
- iNOS: 1xido n6trico sintasa

- I.N.T: Cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio
- ITZ: Índice de teratozoospermia
- IUI: Inseminación intrauterina
- K: Potasio
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- LH: Hormona luteinizante
- Li: Litio
- LPO: Lipoperoxidación
- MDA: Malondialdehído
- MDH: Malato deshidrogenasa
- Mg: Magnesio
- Mn: Manganeso
- MS: Espectroscopia de masas
- mtADN: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- NADH: Nicotinamida adenin dinucleótido
- NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
- NH: Número de Historia
- Ni: Níquel
- NO: Óxido nítrico
- O<sub>2</sub>: Oxígeno
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Oxígeno singulete
- OED: Observatorio Español sobre Drogas
- OH<sup>·</sup>: Radical hidroxilo
- OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud
- ORP: Odds Ratio de Prevalencia
- P: Fósforo
- Pb: Plomo
- PGI: Fosfoglucoisomerasa
- Pt: Platino
- PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados
- RI: Rango Intercuartílico
- REM: Recuento de Espermatozoides Móviles obtenidos tras capacitación
- RL: Radicales libres
- RO : Radicales alcohoxilos
- ROC: Receiver Operating Characteristic

- ROO<sup>·</sup> : Radical peroxilo
- ROOH: Hidroperóxido orgánico
- ROS: Reactives Oxygen Species
- S: Sensibilidad
- Sc: Escandio
- Se: Selenio
- SEF: Sociedad Española de Fertilidad
- SEGO: Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología
- SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
- SIP: Sistema de Información poblacional
- SOD: Superóxido Dismutasa
- Tb: Terbio
- TBARs: Antioxidantes Totales
- THC: Tetrahidrocannabinol
- TRA: Técnicas de Reproducción Asistida
- UV: Ultravioleta
- V: Vanadio
- VPN: Valor Predictivo Negativo
- VPP: Valor Predictivo Positivo
- WHO: World Health Organization
- XOD: Xantina oxidasa
- Zn: Zinc
- 8-OHdG: 8-Hidroxideoxiguanosina









## **INTRODUCCIÓN**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



A lo largo de los años se ha producido una disminución significativa de la fertilidad humana. España, al igual que otros países europeos, está desde 1981 por debajo de los 2,1 niños por pareja, nivel requisito para mantener el nivel de reemplazo poblacional. La disminución en el índice de natalidad es debida, entre otras causas, a cambios del modo de vida y costumbres sociales, y al aumento de la contracepción. Estas transformaciones demográficas, tan valoradas y deseables socialmente, tienen importantes consecuencias clínicas (Mínguez-Alarcón et al., 2012; Miyamoto et al., 2012).

La especie humana tiene un bajo potencial reproductivo. En cada ciclo ovulatorio las parejas sin problemas de fertilidad y relaciones sexuales regulares y no protegidas, tienen entre un 20-30% de posibilidades de lograr un embarazo. A continuación se expone una tabla de concepción en parejas fértiles en una escala de tiempo:

Tabla 1. (Matorras et al., 2007)

Tiempo de exposición	Porcentaje de embarazos
3 meses	57%
6 meses	72%
1 año	85%
2 años	93%

El 85% de la población general concibe en el primer año con relaciones sexuales regulares y en ausencia de medidas anticonceptivas, y de las que no conciben en el primer año la mitad lo hará en el segundo (probabilidad acumulativa del 93%) (Matorras et al., 2007).

Existe una fuerte controversia, por parte de los profesionales dedicados a la reproducción humana, sobre algo tan básico como la propia definición de esterilidad y los conceptos que la complementan.

Toda la literatura anglosajona consultada utiliza el termino "infertility" sin entrar en definiciones que nos permitan diferenciar el concepto de esterilidad del de infertilidad, por ello, dado el peso científico de la literatura anglosajona, los términos esterilidad e infertilidad con gran frecuencia resultan asimilables (Bruna et al., 2007).

Dentro del término esterilidad, a su vez, existe también cierta controversia. En general se define como la incapacidad de uno o ambos miembros de la pareja para la

concepción natural en un plazo razonable. Mientras la American Society for Reproductive Medicine (ASMR), la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO), consideran estéril a aquella pareja que no consigue un embarazo después de un año de coitos normales sin protección anticonceptiva, otras sociedades científicas como la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana (ESHRE), consideran que tiene que haber transcurrido al menos 24 meses de relaciones sexuales regulares con finalidad procreadora (Bruna et al., 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta 2 definiciones distintas para el concepto de infertilidad. La definición clínica es "una enfermedad del sistema reproductivo definida por el fracaso de alcanzar un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección", mientras que la definición epidemiológica es " mujeres en edad reproductiva susceptibles de quedarse embarazadas que aspiran a conseguir un embarazo sin éxito durante más de dos años". Las definiciones clínicas son diseñadas para la detección y el tratamiento tempranos de la infertilidad, puesto que el objetivo es entender las causas y proporcionar el tratamiento lo antes posible (WHO, 2006; Zegers-Hochschild et al., 2009). En general, se puede afirmar que la imposibilidad de concebir tras un año de relaciones sexuales sin protección debe ser motivo para iniciar un estudio (Bruna et al., 2007).

Por otro lado, se considera la esterilidad primaria como la que presenta una pareja que no ha podido lograr un embarazo después de intentarlo durante al menos un año con relaciones sexuales sin protección, mientras que la esterilidad secundaria es el término utilizado para describir a las parejas que han logrado por lo menos un embarazo previo, pero que no consiguen otro embarazo o que no llega a término (WHO, 2006; Bruna et al., 2007; Alonso et al., 2008).

La esterilidad es un fenómeno dinámico por lo que muchas de las parejas en edad reproductiva pueden presentar problemas ocasionales de esterilidad (Bruna et al., 2007). En países industrializados se admite que unas 1200 nuevas parejas por cada millón de habitantes y año tienen problemas de fertilidad. Ello supondría en España más de 44.000 nuevas parejas cada año con dificultades de este tipo, aunque muchas

de ellas gestarán espontáneamente (Thonneau et al., 1991; Edwards, 1995; Ellis et al., 1996).

La infertilidad afecta aproximadamente a  $50-80 \times 10^6$  hombres (7-15 % de hombres en edad reproductiva), a escala mundial y cada año. Estos números incluyen tanto la infertilidad primaria, como la secundaria (Agarwal et al., 2012a).

## **1.1 Patogénesis de la infertilidad masculina**

La esterilidad puede ser de causa femenina, masculina, o mixta cuando afecta a los dos miembros de la pareja. Las causas pueden ser absolutas o relativas, y en este último caso la fertilidad dependerá del otro miembro de la pareja. No siempre hay una única causa de esterilidad, podemos encontrar dos o más causas en casi un 30% de los casos (Rantala, 1988). La fertilidad de una pareja depende de las funciones coordinadas y combinadas del varón y de los sistemas reproductivos femeninos. Los defectos anatómicos, la disfunción de la gametogénesis, las endocrinopatías, las alteraciones inmunológicas, la alteración en la eyaculación y las exposiciones ambientales son causas significativas de la infertilidad (Alonso et al., 2008). Por otra parte, también puede ocurrir que ambas personas sean independientemente fértiles pero la pareja no pueda concebir junta sin asistencia.

El factor masculino interviene hasta en la mitad de todos los casos de infertilidad y afecta a un hombre de cada 20 en la población general (McLachlan et al., 2001). A continuación se exponen algunas de las causas relacionadas con la infertilidad masculina de forma resumida:

- Causas pre-testiculares
  - Ginecomastia.
  - Caracteres sexuales secundarios anormales.
  - Hipogonadismo.
  - Trastornos endocrinos: desórdenes hipotalámicos (como el síndrome de Kallmann), diabetes mellitus, alteraciones de tiroides, hiperprolactinemia, hipopituitarismo.
  - Factores psicológicos.
  - Factores exógenos: medicación, irradiación, altas temperaturas, sustancias tóxicas (drogas, alcohol, tabaco, toxinas ambientales, radiación...).

- Causas testiculares

- Neoplasias malignas de células germinativas, microcalcificaciones testiculares, neoplasma, ej: seminoma.
- Criptorcidismo.
- Varicocele.
- Traumatismo testicular.
- Cirugías.
- Hidrocele.
- Síndrome de disgénesis testicular.
- Anomalías genéticas: fibrosis quística, anomalías del cariotipo como síndrome de Klinefelter, microdeleciones en el cromosoma Y, y otras mutaciones génicas. Algunas de las anomalías genéticas más frecuentes se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Factores genéticos en la infertilidad masculina (Brugo-Olmedo et al., 2003)

Patología	Frecuencia	Fenotipo	Herencia/genotipo
Enfermedad poliquística renal	1 en 800	Riñón múltiple Quistes de epidídimo	Autosómico dominante
Fibrosis quística	1 en 2.500	Infecciones respiratorias Insuficiencia pancreática Desarrollo pobre del tracto de Wolf Azoospermia obstructiva	Autosómico recesivo Gen CFTR, cromosoma 7
Distrofia miotónica	1 en 8.000	Debilidad muscular Atrofia testicular	Autosómico dominante Cromosoma 19
Síndrome de Kallman	1 en 30.000	Anosmia Pubertad retardada Azoospermia / oligozoospermia	Recesivo ligado al X
Síndrome de la cilia inmóvil	1 en 30.000	Bronquiectasias Situs inversus Espermatozoides inmóviles	Autosómico recesivo Cromosoma 19
Síndrome de Usher	1 en 30.000	Sordera Retinitis Defectos del axonema espermático	Autosómico recesivo
Insensibilización androgénica	1 en 60.000	Testículo feminizante	Ligado al X recesivo

- Causas post-testiculares
  - Impotencia.
  - Obstrucciones canaliculares congénitas y adquiridas, que pueden ser epididimarias, de los conductos deferentes o de los conductos eyaculadores.
  - Infección de las vías genitourinarias y las glándulas accesorias masculinas: prostatitis, uretritis, orquitis, epididimoorquitis y epididimitis; paperas...
  - Hipospadias.
  - Defecto acrosomal / Defecto de penetración de óvulo.
  - Factores inmunitarios: tanto los hombres como las mujeres pueden desarrollar anticuerpos que reaccionan contra los espermatozoides.
  - Alteraciones en la eyaculación: aneyaculación, anorgasmia, eyaculación diferida, asténica, precoz, dolorosa, retrógrada ( Brugo-Olmedo et al., 2003; Dohle et al., 2010).

La mayoría de estos factores son bien conocidos y están directamente relacionados con la infertilidad masculina, en cambio otros se encuentran aún en estudio, como es el caso de las alteraciones genéticas.

Probablemente un subconjunto de los pacientes diagnosticados de infertilidad idiopática tiene un desorden genético subyacente que se hereda (en la línea germinal) o que se adquiere (somático). Aunque la mayoría de los desórdenes reproductivos genéticos severos causan disgenesia gonadal o alteración en los niveles de hormonas, la frecuencia de los fenotipos más leves está aumentando. Se ha identificado muchos genes que influyen en el desarrollo y en la función del eje hipotálamo - hipófisis - gonadal. Estos genes codifican un arsenal de factores de transcripción, proteínas de la matriz, hormonas, receptores y enzimas, que se expresan en los distintos niveles de este eje y que regulan el desarrollo paracrino y las interacciones endocrinas necesarias para la espermatogénesis y la ovulación (Achermann et al., 2002).

También las mutaciones del cromosoma Y pueden ser un factor importante debido a que éste pasa de padre a hijo y no está protegido de errores de copias, a diferencia de otros cromosomas que se autocorrigen recombinando la información genética de la madre y el padre. Por otro lado, las microdeleciones del cromosoma Y son la segunda causa genética más frecuente de fallo en la espermatogénesis, después del Síndrome de Klinefelter. Existe evidencia de que ciertos genes localizados en la región eucromática del brazo largo del cromosoma Y juegan un papel esencial en la espermatogénesis y de que microdeleciones en estas regiones pueden estar



relacionadas con azoospermias y oligozoospermias severas. A pesar de esto, el hallazgo de una microdelección no implica necesariamente que ésta sea la causa de la infertilidad ya que la función de algunos genes es desconocida y muchos se expresan en tejidos distintos a los de los testículos (Matorras et al., 2007).

Además, el índice de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático es considerado como un buen predictor de fertilidad, habiéndose comprobado relación directa entre el incremento en la fragmentación de ADN y el empobrecimiento de la calidad seminal. Aunque todavía se desconoce la medida en la que esta fragmentación afectaría al índice de fertilización o desarrollo embrionario, los conocimientos actuales parecen otorgarle un papel etiológico importante en los abortos de repetición (Matorras et al., 2007).

Otros posibles problemas pueden ser que el huevo no sea liberado en el momento óptimo para su fertilización, que no entre en la trompa de Falopio, que el espermatozoide no pueda alcanzar el huevo, que la fertilización falle, que el transporte del cigoto sea interrumpido, o que la implantación no se lleve a cabo. Se reconoce cada vez más que la calidad del huevo es de importancia crítica.

De todas las causas de infertilidad masculina anteriormente enumeradas, las más frecuentes son: varicocele (15,6%), hipogonadismo (8,9%), infección genitourinaria (8%) y criptorquidia (7,8%). Pero en primer lugar, todavía se encuentra la causa idiopática con un 30% (Dohle et al., 2010). Por tanto, sólo algunas de las causas de esterilidad son conocidas. Tras la realización de un correcto estudio de esterilidad, incluso tras la realización de las más sofisticadas pruebas diagnósticas, hoy en día, aproximadamente, entre un 15 y 30% de las parejas estériles quedan clasificadas como esterilidad de causa desconocida o esterilidad idiopática (Collins et al., 1995; Guzick et al., 1998; Jungwirth et al., 2012).

## **1.2 Evaluación del semen en el estudio de la infertilidad**

### **1.2.1 Breve recuerdo de la morfología del espermatozoide**

El semen es un líquido que contiene los espermatozoides en suspensión. El espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino, se considera una de las células más diferenciadas y es la única célula humana que posee flagelo. Su tamaño es unas 10.000 veces más pequeño que el óvulo.

Los espermatozoides en el ser humano adoptan un aspecto piriforme, y sólo sobreviven en un medio ambiente cálido, aunque entre 1 y 3 °C por debajo de la temperatura corporal.

Los espermatozoides se producen en el testículo en dos etapas que duran aproximadamente 74 días:

- I. La espermatogénesis, que es la producción de las espermátidas a partir de las células madre.
- II. La espermogénesis, que consiste en una modificación morfológica de la espermátida en espermatozoide, con la formación particularmente del acrosoma y del flagelo.

El espermatozoide consta de tres partes: la cabeza, que contiene el material genético, la parte intermedia, con las mitocondrias que le suministran energía, y la cola o flagelo que le aporta la movilidad. Todo ello está rodeado por una membrana constituida por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y por colesterol, fosfolípidos y proteínas.

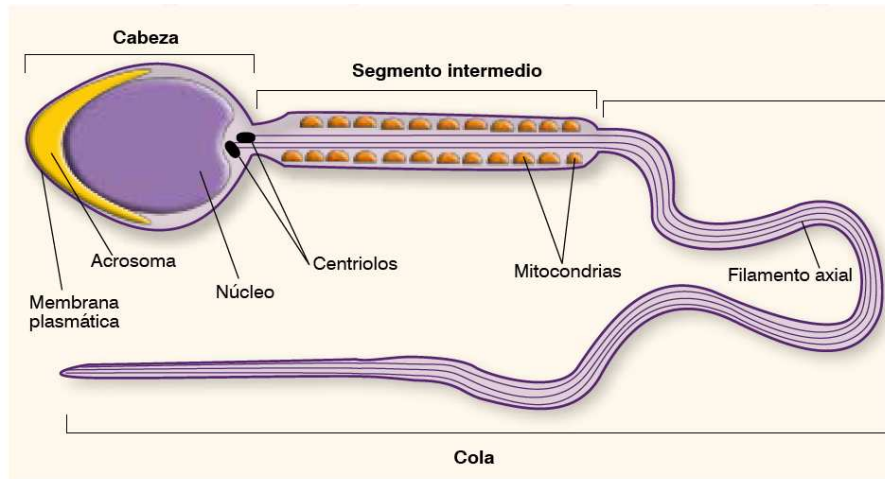
La cabeza contiene dos partes principales: el acrosoma, que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza, y la parte postacrosomal, que es donde se encuentra el núcleo que contiene la carga genética del espermatozoide. El acrosoma es una capa formada por enzimas como la hialuronidasa y la acrosina, que favorecerán la rotura de la célula de granulosa para la penetración al ovocito.

El núcleo es la única parte que entra al citoplasma del óvulo, dejando atrás la membrana ya vacía, para luego fusionarse con el núcleo de éste, completarse como célula diploide y empezar la mitosis. Las mitocondrias y el resto de los constituyentes del gameto masculino no se unen al cigoto, por ello todas las mitocondrias de la nueva célula provienen de la parte materna.

El cuerpo del espermatozoide une la cabeza y la cola. A su vez está constituido por dos partes: el cuello y la parte intermedia. El cuello es ligeramente más grueso que las demás partes del flagelo y contiene residuos citoplasmáticos de la espermátida. Tras estos elementos se encuentran dos centriolos, el distal, que origina la pieza media, y el proximal, que desaparece tras haber dado origen al flagelo. La pieza media posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide produciendo ATP.

Por último, la cola, es la parte final del espermatozoide y es la que proporciona la movilidad.

Figura 1. Partes de un espermatozoide (Toro-Montoya, 2009)



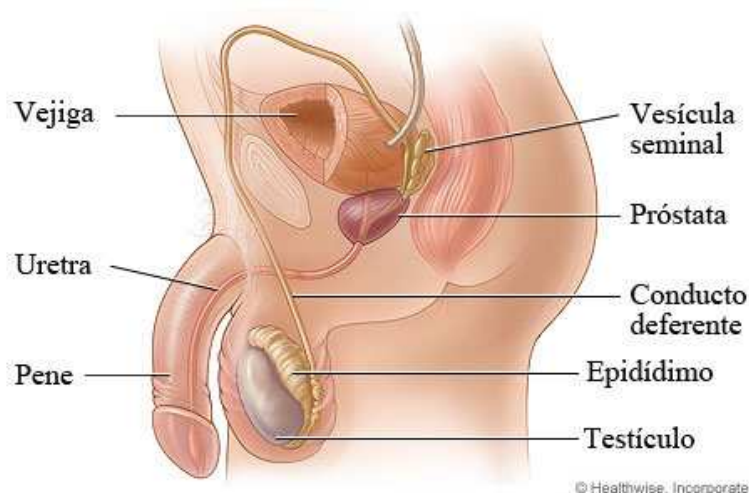
### 1.2.2 Estudio del seminograma básico

En los testículos los espermatozoides son inmóviles o móviles in situ y no fecundantes. Posteriormente son evacuados hacia el epidídimo por los conductos espermáticos intratesticulares (túbulos rectos, rete testis). El epidídimo está constituido de tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola. En él se produce al mismo tiempo reabsorción y secreción epididimaria. Sólo aquí los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su maduración bioquímica. Como la secreción de los espermatozoides entre dos eyaculaciones es continua, son almacenados en la cola del epidídimo.

En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores hasta la uretra prostática. A esta altura se añade la secreción prostática. Más tarde, al contraerse las vesículas seminales, se descarga su secreción en los conductos eyaculadores.

En total, el volumen de semen representa el 5% de la secreción epididimaria, el 30% es de secreción prostática y el 65% es secreción de las vesículas seminales.

Figura 2. Aparato reproductor masculino



<http://www.prosalud.org.ve/quienes-somos/426-Aparato%20Reproductor%20Masculino>

Por tanto, el análisis de semen nos indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas, y nos orienta sobre patologías del sistema genital.

Uno de los primeros aspectos a analizar en una pareja que acude a la consulta de infertilidad, es la calidad del semen del varón. El seminograma constituye la base fundamental para valorar el diagnóstico del varón infértil. En función de los resultados obtenidos y de los datos de la historia clínica, se podrán solicitar otras exploraciones.

El seminograma debe realizarse utilizando técnicas y criterios estandarizados como los descritos por la Organización Mundial de la Salud (WHO,1999; WHO, 2000a), y actualizados en el 2002 por la ESHRE. Los valores de referencia facilitados por la OMS en 1999 son orientativos, debiendo cada laboratorio establecer los suyos propios, aunque esta tarea es casi imposible por la dificultad de definir y obtener una población fértil de referencia. Por esta razón, la mayoría de laboratorios adoptan los suministrados por la OMS que corresponden a población fértil pero en ningún momento son valores de normalidad, ni indican fertilidad o esterilidad, por lo que varones por debajo de esos valores pueden conseguir gestaciones (baja especificidad).

El objetivo del análisis de semen básico es evaluar los parámetros descriptivos y bioquímicos de eyaculados obtenidos mediante masturbación (Kvist et al., 2004). Cada uno de estos datos nos aporta una información valiosa y nos permiten hacernos una idea de la calidad seminal que presenta el varón.

El análisis comienza con la obtención de los datos demográficos y clínicos del paciente y el estudio de los caracteres físicos del semen (estudio macroscópico), siguiendo siempre las indicaciones de la OMS (1999) (WHO, 1999). A continuación se lleva a cabo el estudio microscópico y las determinaciones bioquímicas. Todo ello se explicará con detalle en el apartado de Métodos.

### **1.2.3 Capacitación espermática**

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide después de la maduración en el epidídimo, y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito. *In vitro*, este proceso puede ser mimetizado, eliminando el plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal.

Aunque el plasma seminal ayuda a los espermatozoides a penetrar la mucosa cervical (Overstreet et al., 1980), algunos de sus componentes (por ejemplo, las prostaglandinas, zinc...) son un obstáculo para el logro del embarazo cuando se evitan las barreras naturales en las técnicas de reproducción asistida, tales como la inseminación intrauterina (IA) o fertilización *in vitro* (FIV). Por ello, la capacitación *in vitro* se realiza cuando la pareja infértil se va a someter a técnicas de reproducción asistida. Se considera la mejor alternativa para los pacientes con astenozoospermia importante y oligoastenozoospermia, es decir, aquellos pacientes cuyos sémenes presentan un número disminuido de espermatozoides móviles.

La separación de los espermatozoides del plasma seminal permite obtener una preparación final con un elevado porcentaje de células morfológicamente normales y móviles, libre de artefactos, de células no germinales y de espermatozoides muertos, lo que es importante para la práctica clínica (WHO, 2010). Además, mejora la calidad de los espermatozoides, porque disminuye la liberación de linfocinas y reduce la formación de radicales libres (Ombelet et al., 2003). Es importante la separación precoz del plasma seminal, porque éste actúa inhibiendo la capacitación espontánea del espermatozoide, ya que contiene prostaglandinas, agentes infecciosos y proteínas antigénicas.

El resultado de la preparación, junto con otros factores dependientes de la mujer, determinará la técnica de reproducción asistida a aplicar en cada caso (Wainer et al., 2004).

A pesar de que el REM (Recuento de Espermatozoides Móviles tras capacitación) es el parámetro utilizado para la selección de la técnica de reproducción asistida más adecuada, no existe acuerdo en los límites de corte para las muestras útiles para IA, FIV o ICSI. Cada laboratorio debe utilizar sus propios puntos de corte según su experiencia. En general, se considera que un semen presenta condiciones para la inseminación cuando se pueden recuperar más de  $5 \times 10^6$  de espermatozoides móviles (REM >5) que es lo que determina que el semen sea adecuado para la inseminación artificial (IA) en la mujer.

Existen evidencias según las cuales es necesaria la existencia de al menos  $5 \times 10^6$  de espermatozoides móviles progresivos para que la producción de un embarazo tras IA no sea absolutamente casual. Por ello, es legítimo indicar una FIV/ICSI cuando el valor del REM es inferior a  $5 \times 10^6$ ; no obstante, dependiendo de la experiencia de cada centro, se acepta que se indique una FIV/ICSI con un valor de REM que lo haga aconsejable, si no supera los  $10 \times 10^6$ . Aunque en general, se recomienda indicar FIV/ICSI con un valor de REM menor de  $5 \times 10^6$  sin factor inmunológico (García et al., 2006).

Dicho esto, en el Hospital General Universitario de Elche, las técnicas reproductivas recomendadas en función del REM de 2 muestras de semen consecutivas son:

- REM  $\geq 10 \times 10^6$ : Inseminación asistida (IA).
- REM = (5 -10)  $\times 10^6$ : Dudoso, se realiza un tercer seminograma.
- REM <  $5 \times 10^6$ : Se remite a la pareja al Hospital La Fe para que allí realicen ICSI o FIV.

#### **1.2.4 Valores de Referencia**

Consideramos un seminograma “normal” cuando sus resultados cumplen los valores de referencia recomendados por la OMS, y en caso contrario se clasificará como patológico. Los parámetros seminales que se consideran “normales” según los criterios de la OMS (1999) se presentan a continuación:

○ Volumen	≥ 2mL
○ pH	≥ 7,2
○ Licuación completa a los 60 minutos	
○ Concentración espermática	≥20x10 <sup>6</sup> /mL
○ Recuento total de espermatozoides	≥40x10 <sup>6</sup> esp.
○ Motilidad progresiva (rápida+lenta)	≥50%
○ Vitalidad espermática (formas vivas)	≥ 75%
○ Test de Hos	≥ 60%
○ Aglutinación	<10%
○ Porcentaje de espermatozoides con morfología normal	≥14%
○ Índice de teratozoospermia	< 1,6
○ Leucocitos	< 1x10 <sup>6</sup> /mL
○ Células de espermatogénesis	< 5x10 <sup>6</sup> /mL
○ Fructosa	120-360 mg/dL
○ Ácido cítrico.	200-600 mg/dL

Los valores de referencia del seminograma corresponden a población fértil pero en ningún momento indican fertilidad o esterilidad.

Muchos varones fértiles tienen parámetros seminales por debajo de los valores de referencia fijados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de modo que existe una amplia zona de solapamiento que dificulta la correcta clasificación (sensibilidad y especificidad inaceptables) en más de la mitad de los pacientes presuntamente infértiles (Bassas, 2009).

El semen se clasifica según los siguientes criterios:

- Concentración:
  - *Azoospermia*: ausencia total de espermatozoides.
  - *Oligozoospermia*: <20 x10<sup>6</sup> esp/mL.
  - *Polizoospermia*: >250 x10<sup>6</sup> esp/mL.
- Viabilidad: cuando más del 25% de los espermatozoides están muertos se denomina *Necrozoospermia*.

- Movilidad: cuando la motilidad progresiva (rápida+lenta) es inferior a 50% se conoce como *Astenozoospermia*.
- Morfología: cuando hay menos de un 15% de formas normales se considera *Teratozoospermia*.

Nuestro estudio se realizó durante los años 2007- 2009, por ello hemos utilizado los valores de referencia de la OMS de 1999. Pero en el año 2010, la OMS estableció unos nuevos valores de referencia, resultando así unos parámetros menos estrictos que los de 1999. Exponemos a continuación las principales diferencias entre ambas ediciones:

Tabla 3. Valores de referencia de la OMS. Año 1999 y 2010. (WHO, 1999; WHO, 2010)

Parámetros	Año 1999	Año 2010
Volumen	2,0 mL	1,5 mL
Concentración	20 x10 <sup>6</sup> /mL	15 x10 <sup>6</sup> /mL
Recuento total espermatozoides	40 x10 <sup>6</sup>	39 x10 <sup>6</sup>
Motilidad total	No detallada	≥ 40%
Motilidad progresiva (A+B)	≥ 50%	≥ 32%
Vitalidad	≥ 75%	≥ 58%
Test de Hos	≥ 60%	≥ 58%
Aglutinación	<10%	<50%
Formas normales	≥ 14%	≥ 4%

Como ya se ha comentado, el seminograma constituye la base fundamental para valorar el diagnóstico del varón infértil. Pero a partir de los resultados del análisis de semen no se puede predecir si un determinado hombre puede ser padre biológico o no. No hay propiedades específicas que se puedan medir en toda la población espermática que reflejen específicamente la capacidad fecundante del reducido número de espermatozoides que son capaces de alcanzar el lugar de fecundación. Sin embargo, el análisis del semen sí puede darnos información acerca de problemas en los órganos genitales del varón; y por tanto, puede ser usado para enfocar la investigación continuada de la infertilidad, y en función de los resultados obtenidos y de los datos de la historia clínica proceder a solicitar otras exploraciones. No obstante,



los resultados del análisis de semen se han usado para categorizar los hombres en grupos con distintas posibilidades de conseguir embarazo durante un período de tiempo determinado (Kvist et al., 2004).

### **1.2.5 Determinaciones complementarias para el estudio de la infertilidad en el varón**

Cuando el resultado del seminograma es anormal, se plantean otras exploraciones complementarias con el fin de:

- a) Identificar alteraciones potencialmente corregibles.
- b) Desvelar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia.
- c) Diagnosticar afecciones relevantes para la salud del paciente.
- d) Orientar sobre las posibles técnicas de reproducción asistida con espermatozoides propios o asesorar acerca de alternativas en las alteraciones para las que no sea posible usar gametos propios (Bassas, 2009).

#### **1.2.5.1 Análisis microbiológico: Cultivo del semen**

El cultivo del plasma seminal para evaluar la presencia de organismos anaeróbicos y aeróbicos puede contribuir a establecer el diagnóstico de infección de las glándulas accesorias masculinas.

La infección del tracto genital y de las glándulas genitales anexas puede alterar la función reproductiva por diversos mecanismos (Bassas, 2009):

- Producción de radicales libres de oxígeno que afectan a la membrana espermática y la integridad del ADN.
- Deterioro de la movilidad y la morfología espermáticas.
- Disminución de la capacidad fecundante.
- Cambios en la composición bioquímica del plasma seminal.
- Producción de anticuerpos antiespermáticos.

Los efectos de la infección del tracto reproductivo pueden prolongarse incluso después de que se haya eliminado los agentes patógenos.

El estudio bacteriológico del semen está indicado en pacientes con clínica sugestiva de infección urinaria o prostatitis (Matorras et al., 2007).

### 1.2.5.2 Evaluación hormonal

El funcionamiento testicular está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, por lo que en algunos casos (azoospermia u oligozoospermia) se hace necesaria la determinación de las hormonas involucradas en este proceso.

La GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) actúa sobre la hipófisis para que libere FSH y LH. La LH estimulará las células de Leydig, que liberan testosterona y la FSH actúa sobre las células de Sertoli y el túbulo seminífero, estimulando la espermatogénesis. Así, en situaciones de azoospermia y oligozoospermia severa, las determinaciones básicas a efectuar serán (Bassas, 2009):

- FSH: marcador de la espermatogénesis.
- LH: marcador de la función de las células de Leydig.
- Testosterona: índice de evaluación endocrina tisular. La principal función endocrina del testículo a partir de la pubertad es la síntesis de testosterona, y, por ello, determinar su concentración total en el adulto es suficiente, en la mayoría de los casos, para diagnosticar el hipogonadismo.

### 1.2.5.3 Cariotipo y estudio de cromosopatías

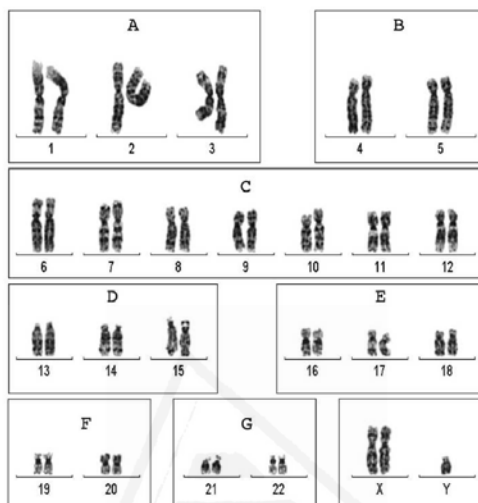
Los objetivos de la valoración genética son la detección de la existencia de problemas a este nivel causantes de esterilidad, y la identificación de posibles alteraciones hereditarias que comporten riesgo de transmisión a la descendencia. Los estudios a realizar son:

- Cariotipo: El estudio del cariotipo resulta obligado para investigar las causas del hipogonadismo primario y de la azoospermia no obstructiva, a fin de descartar el síndrome de Klinefelter (Fig. 3) y otras cromosopatías. También es recomendable en varones con esterilidad idiopática cuando hay oligozoospermia grave ( $< 5 \times 10^6$ /mL de espermatozoides), y antes de realizar FIV/ICSI (Bassas, 2009).
- Hibridación in situ fluorescente (FISH) que nos permite analizar parte de la dotación cromosómica de los espermatozoides, en concreto, los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, implicados principalmente en abortos y malformaciones fetales.
- Alteraciones del cromosoma Y: Se han descrito alteraciones en este cromosoma asociadas a oligo/azoospermia de origen secretor. Se han podido identificar regiones de este cromosoma con alteraciones en genes que controlan la

espermatogénesis, que sólo tiene repercusión en la fertilidad, siendo por lo tanto la causa de la esterilidad (Fernández, 2005).

En el caso de pacientes con agenesia uni o bilateral de conductos deferentes está indicado el estudio de mutaciones de CFTR (Matorras et al., 2007).

Figura 3. Cariotipo con tinción de bandas G correspondiente a un varón con síndrome de Klinefelter (Bassas, 2009)



## 1.3 Estrés oxidativo

### 1.3.1 Génesis del estrés oxidativo

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que se produce pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y, a su vez, se considera reducción a aquel proceso en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Toda oxidación va siempre acompañada de una reducción, son reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados. Estas reacciones son de gran importancia, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas (Elejalde, 2001).

Las reacciones de óxido-reducción tienen lugar en el metabolismo normal de cada célula, y como producto de reacción se generan continuamente los radicales libres (RL) que posteriormente serán inactivados por distintos mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Los RL son componentes normales de células y tejidos, existiendo un número de RL particular en cada estirpe celular, en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat.

Se consideran RL aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que no sigue la tendencia espontánea de formar parejas de los electrones localizados en los átomos y moléculas. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez et al., 2001).

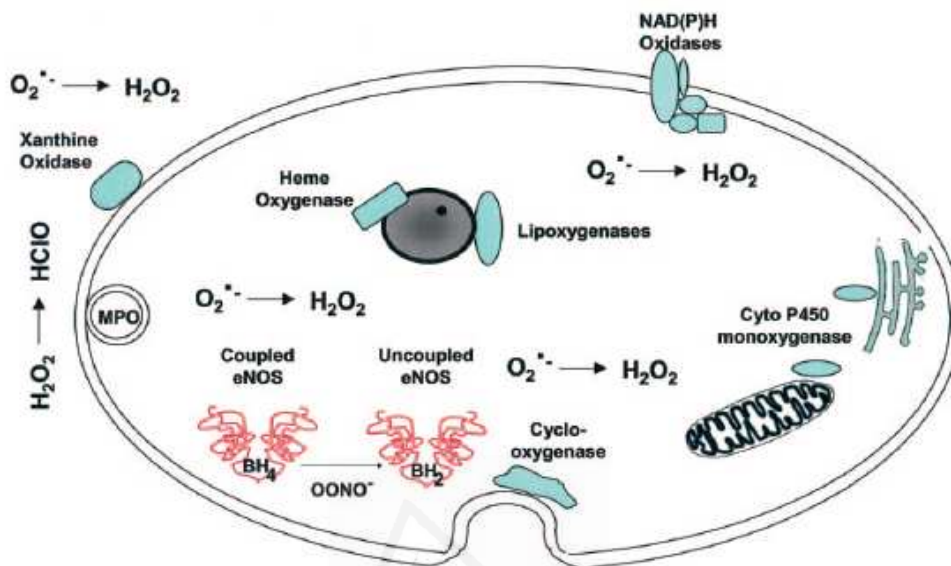
Las fuentes biológicas de RL son:

- La mitocondria constituye la principal fuente de RL. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP (adenosina trifosfato). En este proceso de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95% de estas reacciones un total de 4 electrones de moléculas, con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la posterior generación de energía, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL.
- Los peroxisomas, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).
- Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de oxígeno ( $O_2$ ) que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico ión hidroxilo ( $HO^\cdot$ ). Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios.
- La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del calcio, etc), y genera superóxido ( $O_2^-$ ).

El citoplasma, el núcleo y las membranas plasmáticas celulares también participan en la producción de especies reactivas (Agarwal et al., 2012b).

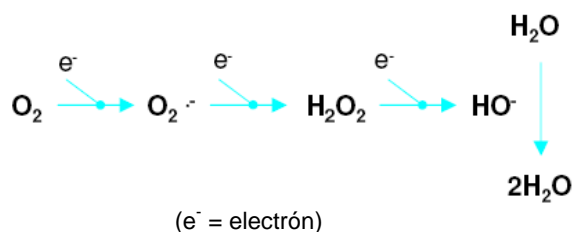
Se puede apreciar, por lo tanto, que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares (Rodríguez et al., 2001).

Figura 4. Fuentes potenciales de radicales libres de oxígeno (Griendling et al., 2003)



De todos los tipos de RL, los de oxígeno inorgánico (EROs) son los más importantes y entre ellos destacan a partir del oxígeno molecular ( $O_2$ ), el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). De los secundarios u orgánicos, el radical peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ), el hidroperóxido orgánico ( $ROOH$ ) y los lípidos peroxidados (Elejalde, 2001).

En el caso concreto de la cadena respiratoria mitocondrial, la mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa, y pueden ocurrir las siguientes transferencias de electrones:



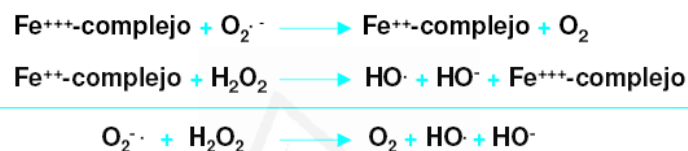
En ella aproximadamente un 3% de los electrones provienen de NADH, por la incompleta reducción del oxígeno, y se desvían hacia la formación de EROs. La sangre cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y es aquí donde éste actúa como sustrato en diversas reacciones

bioquímicas intracelulares, como resultado se desencadena una gran producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y superóxido, entre otras EROs. Las EROs son capaces de oxidar macromoléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Por otra parte, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es estrictamente un RL pero por su capacidad de generar el  $\text{HO}^\cdot$  en presencia de metales divalentes (libres o unidos a proteínas), se le considera como tal. El ejemplo tipo es la reacción con  $\text{Fe}^{2+}$  libre, que ocurre según la reacción de Fenton:

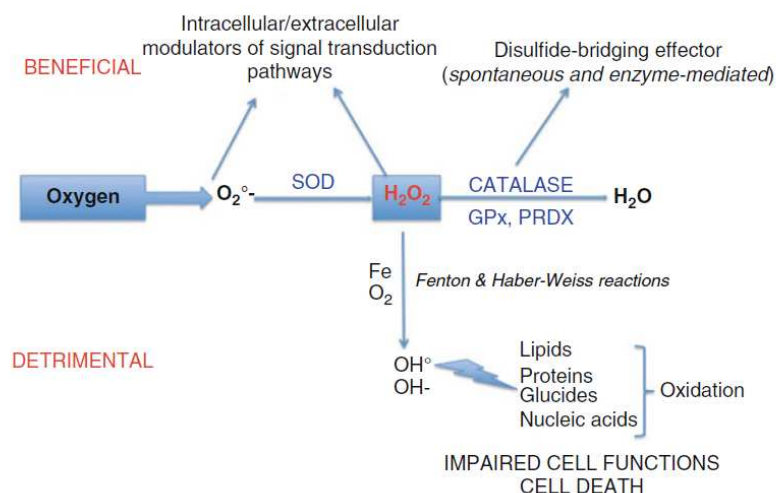


De forma similar, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar también con el grupo prostético de metaloproteínas conteniendo hierro, según la reacción de Haber-Weiss:



El  $\text{HO}^\cdot$  (radical hidroxilo) puede reaccionar con distintas macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, principalmente), en las que, por cesión de un electrón, produce otras especies reactivas a través de mecanismos y de intermediarios aún desconocidos. Se trata de un radical proveniente de oxidaciones univalentes, iniciadas por una reacción de tipo Fenton, en las que la hidroxilación y la abstracción de hidrógeno son las modificaciones más comunes que sufre el sustrato orgánico involucrado y se generan otros radicales libres orgánicos tales como: los radicales alcohilos ( $\text{RO}^\cdot$ ), peroxilos ( $\text{ROO}^\cdot$ ) y sulfoderivados (Fig. 5).

Figura 5. Generación del radical hidroxilo (Agarwal et al., 2012a)



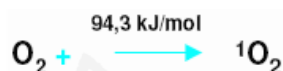
La formación de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) también puede ocurrir a nivel de la NADPH oxidasa según la siguiente reacción:



Con la participación de un complejo de proteínas, que por estrés oxidativo sufren modificaciones conformacionales, exponiendo distintos sitios de interacción proteica, que le permiten unirse a 2 ferro-proteínas integrales de membrana. De esta manera queda formado un complejo proteico con actividad NADPH-oxidasa.

Existen otras dos EROs, con características especiales: el Oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y el hipoclorito (en su forma no protonada ( $ClO^{\cdot-}$ ) o protonada), llamado también ácido hipocloroso.

El  $^1O_2$  es una forma excitada de la molécula de Oxígeno diatómico (triplete):



Esta especie reactiva tiene gran tendencia a reaccionar con moléculas orgánicas ya que, al tener un momento de espín igual a cero, comparte con éstas el estado singulete. El  $^1O_2$  puede originarse por transferencia de energía desde otra molécula reactiva, por reacciones fotoquímicas o por reacciones en ausencia de Oxígeno. Las siguientes ecuaciones representan su formación en esta última situación, que ocurre especialmente en neutrófilos, ricos en cloroperoxidasas (que aceleran la primera reacción) y en  $H_2O_2$  (el cosustrato en la segunda reacción):



La producción de radicales libre es un fenómeno natural, dinámico y continuo, el daño que estos compuestos puedan provocar depende de un delicado equilibrio con los sistemas antioxidantes que protegen a las células de nuestro organismo.

Los mecanismos de defensa para neutralizar a los radicales libres son múltiples y variados y pueden dividirse en dos grupos:

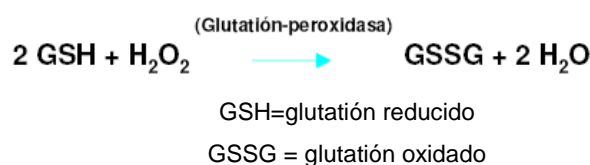
- **Enzimáticos:** de producción endógena. Las enzimas son proteínas con capacidad antioxidante las cuales no se consumen al reaccionar con radicales libres, y son dependientes de ciertos cofactores generalmente metales tales como cobre, hierro, magnesio, zinc o selenio. Las enzimas antioxidantes de

mayor importancia son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, y representan la primera barrera frente a la producción de radicales libres.

- No enzimáticos: elementos principalmente exógenos, responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos. Estos compuestos a diferencia de las enzimas se consumen durante su acción antioxidante, por lo que deben ser reemplazados, provienen principalmente de la dieta a través de los aportes de vitamina E, vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Además, existen algunos componentes de origen endógeno tales como glutatión, urato, ubiquinol, polianina, espermina y proteínas plasmáticas que también ejercen un rol protector (Rodríguez et al., 2001).

La defensa contra los diversos RL, se lleva a cabo por un lado impidiendo su formación, y por otro, neutralizándolos una vez formados. Estas defensas se efectúan en cinco niveles:

- Primer nivel: consiste en disminuir la reacción de reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.
- Segundo nivel: lo constituyen las superóxido dismutasas (SOD), metaloenzimas especializadas en captar el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ).
- Tercer nivel: formado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas está la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas. También en los mamíferos, la glutatión peroxidada (enzima citoplasmática que contiene selenio), es la más importante y cataliza la reacción siguiente:



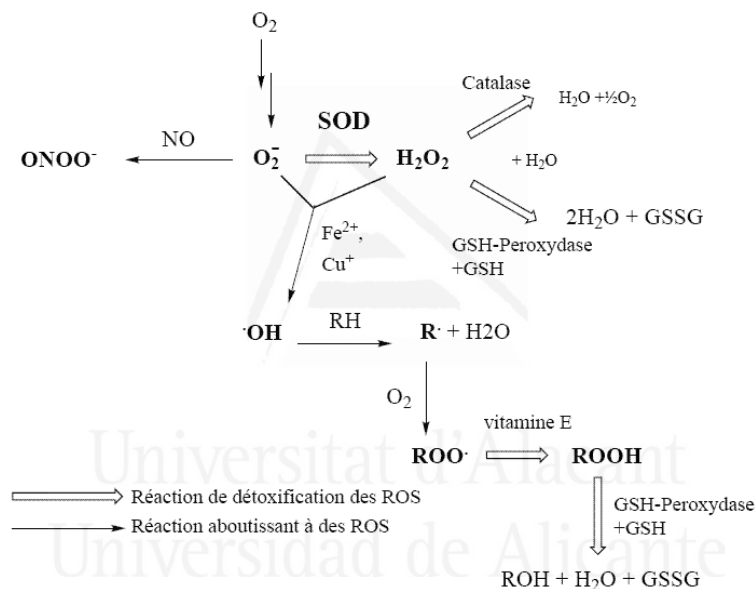
- Cuarto nivel: el radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss puede



ser neutralizado por la vitamina E o alfa-tocoferol, que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas, donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical  $\text{HO}^\cdot$  y el anión superóxido.

- **Quinto nivel:** una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. Cuando los RL han provocado rupturas de la cadena de ADN y han inducido mutagénesis, existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética.

Figura 6. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y sistema de detoxificación



[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Systeme\\_detox\\_ROS.GIF](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Systeme_detox_ROS.GIF)

El estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de especies reactivas de oxígeno (EROs). Es en esta situación de estrés oxidativo cuando se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Éstos reaccionan químicamente con las macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) en el interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.), por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular (Elejalde, 2001; Rodríguez et al., 2001).

Por su alta inestabilidad atómica, los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. La oxidación lipídica por los RL consiste en una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso, conocido como peroxidación lipídica, genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA).

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina, y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos, que impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc).

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o en la pérdida de expresión por daño al gen específico (Rodríguez et al., 2001).

El posible destino celular bajo condiciones de estrés dependerá de varios factores: el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de estrés, la reversibilidad de las modificaciones producidas a macromoléculas, la magnitud del estrés oxidativo y sus consecuencias funcionales. Existen varios sistemas de reparación de daño al ADN, y a nivel de proteínas hay muchas reacciones que son reversibles, sin embargo, quizás sean los lípidos las macromoléculas más afectadas y con consecuencias más directas sobre la integridad celular, de ahí la gran atención que se ha puesto en ellos.

Los factores exógenos, ambientales o de estilo de vida que pueden llevar al estado de estrés oxidativo son:

- Químicos: aumento de metales pesados, xenobióticos, componentes del tabaco.
- Drogas: adriamicina.
- Físicos: radiaciones ultravioleta, hiperoxia.
- Orgánicos y metabólicos: dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia, reperfusión

y ejercicios extenuantes (Rodríguez et al., 2001).

Figura 7. Daño celular y génico como consecuencia del estrés oxidativo



<http://ramanujan25449.blogspot.com.es/2012/04/el-veneno-que-respiramos.html#!/2012/04/el-veneno-que-respiramos.html>

Hay numerosas enfermedades vinculadas al estrés oxidativo muy estudiadas: aterosclerosis, cáncer, cataratas, enfermedad de Parkinson, enfermedades autoinmunes, artritis, diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, enfermedades de la piel, en cambio, la infertilidad masculina no ha sido objeto de tanta investigación, aunque en los últimos años parece haber ganado el interés de los estudiosos al demostrarse su importante implicación.

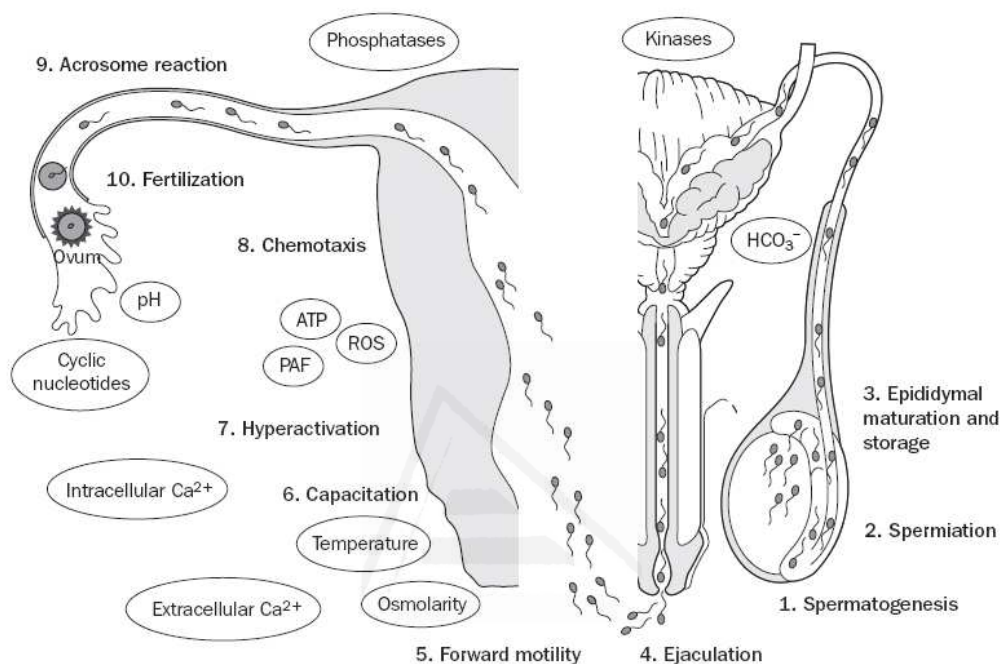
### 1.3.2 Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina

El estrés oxidativo (EO) ha sido identificado como uno de los factores que afectan a la fertilidad masculina y así ha sido estudiado extensamente en los últimos años. Hasta hace poco tiempo, las EROs fueron consideradas exclusivamente tóxicas para los espermatozoides humanos. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que pequeñas cantidades de EROs son necesarias para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fertilización, y para que tenga lugar la reacción acrosómica, la hiperactivación, la motilidad, y la capacitación (Sanocka et al., 2004; Makker et al., 2009; Agarwal et al., 2012b).

La capacitación tiene lugar en el tracto genital femenino, proceso por el cual se prepara al espermatozoide para la interacción con el oocito. Durante este proceso, se incrementan los niveles de calcio intracelular, EROs, y tirosina kinasa, conduciendo a un aumento de adenosin monofosfato cíclico (cAMP). Este aumento del cAMP facilita

la hiperactivación del espermatozoide, estado en el cual su motilidad es sumamente elevada. Sólo los espermatozoides capacitados disponen de una motilidad hiperactivada y sufren una reacción acrosómica fisiológica, adquiriendo así la capacidad fecundante (Makker et al., 2009).

Figura 8. Factores que regulan la motilidad espermática en el trayecto desde los testículos (derecha) hasta el ovario (izquierda) (Kruger et al., 2007)



Se ha observado que la incubación de espermatozoides con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimula la capacitación espermática, la hiperactivación, la reacción acrosómica, y la fusión con el oocito. También se ha demostrado que otras EROs como el óxido nítrico y el anión superóxido son capaces de potenciar la capacitación y la reacción acrosómica. Por otro lado, se ha implicado a las EROs en la interacción del espermatozoide con el oocito, ya que la peroxidación lipídica, causada por bajos niveles de EROs, conduce a la modificación de la membrana celular, facilitando así la adherencia del espermatozoide al oocito (Makker et al., 2009).

En cambio, un exceso de EROs causa la infertilidad por dos mecanismos principales. El primero, se debe a que éstos dañan la membrana del espermatozoide, reduciendo su motilidad y la capacidad de fundirse con el oocito. En el segundo mecanismo, las EROs directamente dañan el ADN de los espermatozoides, comprometiendo la contribución genómica paterna al embrión (Tremellen, 2008; Agarwal et al., 2012a).

La producción de EROs en el semen se puede dividir entre aquel generado por los propios espermatozoides (EROs intrínseco) y el producido por los leucocitos (EROs extrínseco).

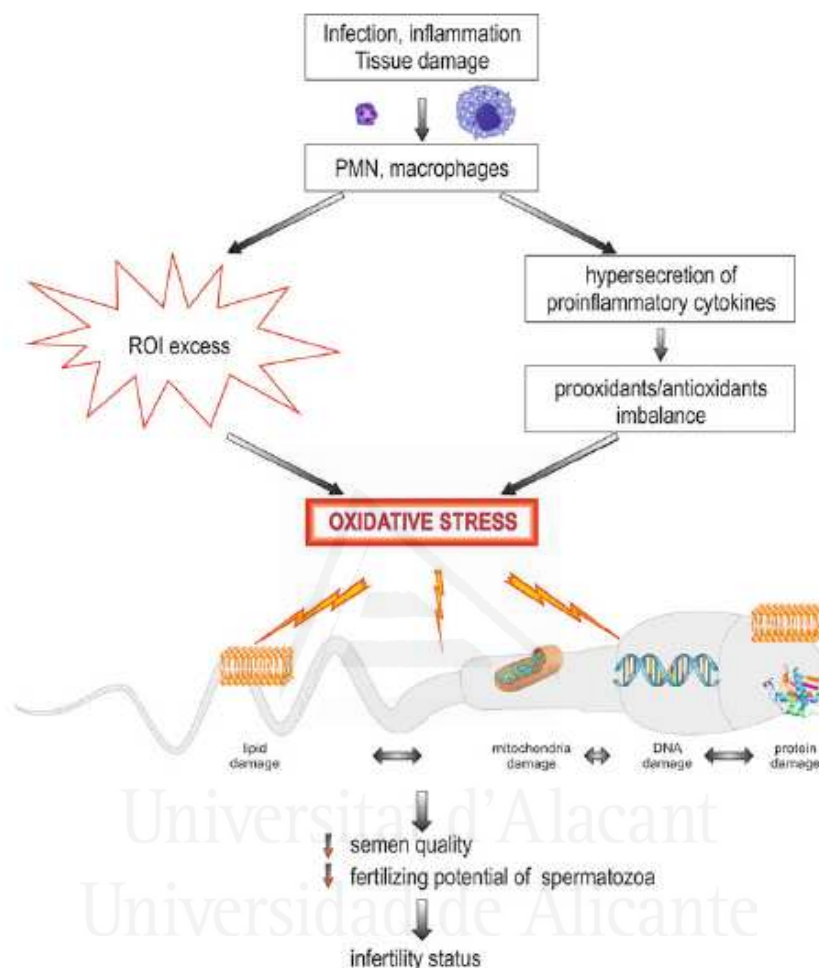
El ratio de producción de EROs por los leucocitos, parece ser 1000 veces más elevado que aquel que ocurre durante la capacitación espermática, por ello, se considera que los leucocitos son los principales productores de EROs seminal (Baker et al., 2004; Tremellen, 2008). Los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos representan aproximadamente el 50-60% y el 20-30% de todos los leucocitos seminales respectivamente. Estos leucocitos pueden ser activados por una infección o una inflamación, y son capaces de producir 100 veces más cantidad de EROs que los leucocitos inactivados. De hecho, recientemente se ha considerado dañino un nivel bajo de leucocitospermia ( $<10^6$  leucocitos/mL de semen) y por ello, una terapia para esos bajos niveles de leucocitos podría producir una mejora en las tasas de embarazo (Hamada et al., 2012).

A pesar de que tanto la producción intrínseca como la extrínseca de EROs están correlacionadas negativamente con la integridad del ADN espermático, la relación es considerablemente más fuerte para la producción intrínseca de EROs. Esto sugiere que aunque los leucocitos produzcan más EROs por célula que los espermatozoides (sobre unas 100 veces más según la OMS (WHO, 2010)), la mayor proximidad entre la producción intrínseca de EROs y el ADN del espermatozoide, hace a la producción intrínseca de EROs una variable importante a considerar en la capacidad de fertilización (Baker et al., 2004; Tremellen, 2008).

Por lo tanto, debemos concluir que hay dos fuentes de estrés oxidativo dentro del eyaculado: leucocitos y espermatozoides defectuosos. El impacto de los leucocitos seminales dependerá de los tipos de células blancas presentes, del lugar de entrada en el aparato reproductor masculino y de su estado de activación. Toda la información de la que se dispone actualmente indica que la especie de leucocito principal es el neutrófilo, y que se encuentra en estado activado en el eyaculado. Se desconoce el lugar por donde entran estas células al aparato reproductor masculino, pero tiene consecuencias patológicas directas. Si la entrada de los leucocitos es en un punto distal del comienzo del conducto deferente, como consecuencia de una infección de la glándula sexual secundaria por ejemplo, entonces su impacto directo sobre la función de los espermatozoides puede verse limitado, porque en el momento de la eyaculación el espermatozoide estará protegido por los potentes antioxidantes del plasma seminal.

A la inversa, si el neutrófilo entró en el aparato reproductor masculino a nivel de los testículos o epidídimo, entonces estas células tendrían muchas opciones de inducir el daño oxidativo en el espermatozoide (Kruger et al., 2007).

Figura 9. Esquema de las consecuencias del proceso inflamatorio en el semen (Agarwal et al., 2012a)



Como ya se ha reseñado, la segunda fuente de EROs en el eyaculado humano son los espermatozoides por sí mismos. Tal generación de radicales libres intracelulares se asocia con la interrupción de todos los aspectos de la función espermática, incluyendo su motilidad, su capacidad para la exocitosis acrosomal, su capacidad de fundirse con la membrana vitelina del oocito y la integridad de su ADN. La generación de radicales libres en exceso normalmente se asocia con defectos en la espermiogénesis, que conlleva la retención de exceso de citoplasma residual en la pieza intermedia de estas células. También es posible que la generación de EROs en exceso por los espermatozoides sea debido al ciclo redox de los xenobióticos presentes en el medio ambiente, o a carencias en la ETC (cadena de transporte de electrones) mitocondrial. Todavía se desconoce si tal generación de EROs en los espermatozoides canaliza o

daña la capacidad funcional de otro espermatozoide vecino. Los espermatozoides defectuosos generan radicales libres activamente a partir del momento que dejan los testículos, entonces las opciones de producir daño colateral a otras células de la misma población de espermatozoides podría ser importante (Kruger et al., 2007).

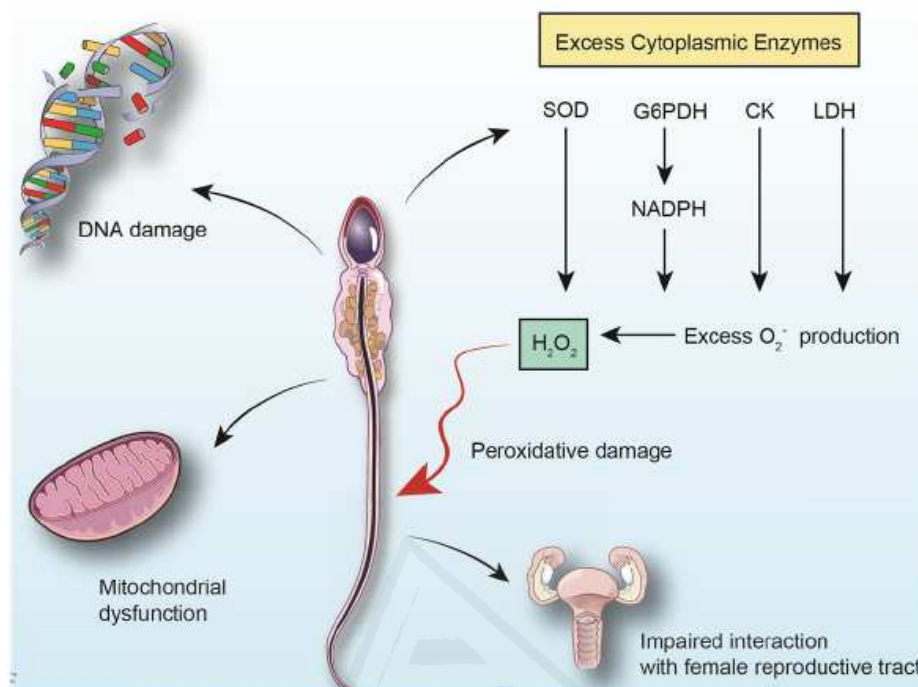
Existe una evidencia considerable en cuanto a que la generación de los elevados niveles de EROs en el espermatozoide provoca una espermiogénesis defectuosa, causando defectos morfológicos, en particular en la región de la pieza intermedia de la célula. Durante una espermiogénesis normal, las células de Sertoli eliminan el citoplasma del espermatozoide, justo antes de que estas células sean liberadas del epitelio germinal. En la mayor parte de los mamíferos, cualquier citoplasma residual que permanece después de la espermiogénesis es remodelado en una discreta y esférica gotita de citoplasma, que lentamente migra hacia la cola del espermatozoide durante el tránsito epididimal, antes de su liberación en el espacio extracelular. Sorprendentemente, los espermatozoides humanos han perdido esta capacidad de crear y deshacerse de una gotita citoplásmica. En estas células, cualquier citoplasma residual regresa hacia la región del cuello del espermatozoide y permanece allí como una inclusión imperfecta que atestigua los orígenes testiculares defectuosos de la célula (Kruger et al., 2007).

Es importante señalar que la gota citoplasmática tiene una implicación funcional y está envuelta en la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica. En cambio, la acumulación anormal de una elevada cantidad de citoplasma alrededor de la pieza intermedia tiene implicaciones patológicas y se conoce como exceso de citoplasma residual (Rengan et al., 2012). Varios grupos independientes han relacionado la presencia de tal exceso de citoplasma residual con la producción de EROs (Saleh et al., 2002; Kruger et al., 2007).

Es decir, se ha propuesto que los espermatozoides anormales que contienen exceso de citoplasma residual en la pieza intermedia, como consecuencia de una espermiogénesis defectuosa, son productores importantes de EROs. Esto se debe a que conservan un exceso de las enzimas citoplásmicas que están implicadas en el metabolismo de la glucosa, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el sistema NADPH oxidasa y la oxidoreductasa NADH-dependiente. Metabolismo que principalmente tiene lugar en dos sitios diferentes: la membrana celular y las mitocondrias (Garrido et al., 2004; Agarwal et al., 2008; Lipshultz et al., 2009; Aitken et

al., 2012). Estas EROs afectan tanto a los espermatozoides anormales que las generan, como a los espermatozoides normales de alrededor (Rengan et al., 2012).

Figura 10. Problemas relacionados con un exceso de citoplasma residual (Rengan et al., 2012)



La espermatogénesis es un proceso de replicación sumamente activo capaz de generar aproximadamente 1.000 espermatozoides por segundo. Las altas tasas de división celular inherente a este proceso implican un consumo elevado de oxígeno mitocondrial por el epitelio germinal (Aitken et al., 2008). A su vez, los espermatozoides son ricos en mitocondrias porque necesitan un suministro constante de energía para su motilidad. Lamentablemente, cuando los espermatozoides contienen mitocondrias disfuncionales, ocurre una producción aumentada de EROs. Esto podría deberse a dos fenómenos interconectados entre sí: las EROs causan daño a la membrana mitocondrial, y la membrana mitocondrial dañada causa, a su vez, un aumento de producción de EROs (Makker et al., 2009).

Las mitocondrias son organelas sumamente activas que constantemente median reacciones de transferencia de electrones por la ETC con el fin de proveer de la energía necesaria para la generación de adenosin trifosfato (ATP). Uno de los problemas inherentes con la actividad de transporte de electrones es que se rompe, y los electrones tienden a salir en tropel de la ETC y combinarse con el oxígeno para generar O<sup>2•-</sup>. La producción aberrante de EROs en las mitocondrias es, por lo tanto,

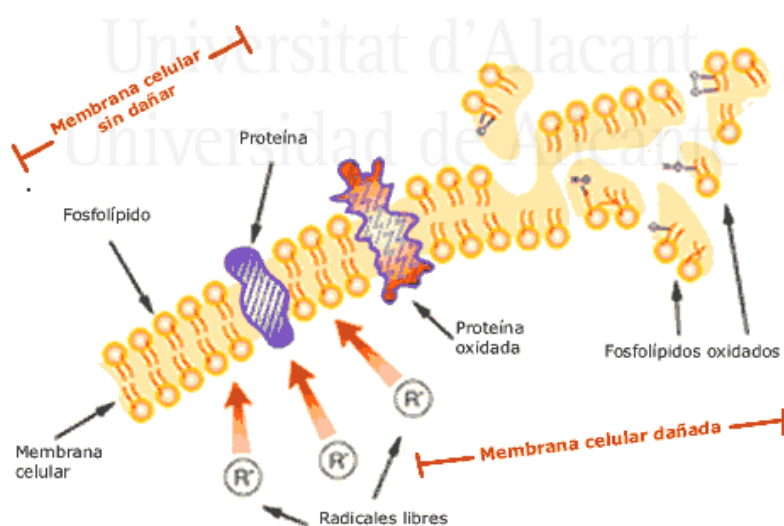


otra posible fuente de estrés oxidativo en los espermatozoides de los hombres estériles (Kruger et al., 2007).

Los espermatozoides son células muy especiales. No son sólo las más pequeñas, sino también las células más polarizadas del organismo que realizan sus funciones incluso fuera del cuerpo, en un individuo diferente, en el tracto genital femenino. Para mantener esta polarización extrema, los espermatozoides exponen la membrana celular con una composición especial, que contiene una cantidad extraordinaria de ácidos poliinsaturados grasos (PUFA) (Agarwal et al., 2012a).

Parece ser que las espermatidas y los espermatozoides maduros son sumamente sensibles a las EROs, porque sus membranas son particularmente ricas en lípidos poliinsaturados, que son imprescindibles para mantener la fluidez necesaria en la fusión de membrana durante la fecundación. No se sabe exactamente en qué momento ocurre el daño oxidativo en el espermatozoide, pero sí se conoce que tiene lugar en el plasma seminal (durante el tiempo requerido para la licuación), en el epidídimo (donde el espermatozoide es almacenado antes de la eyaculación), o en el testículo (Agarwal et al., 2011).

Figura 11. Daño oxidativo en las membranas celulares



[http://www.educ.ar/dinamico/UnidadHtml\\_get\\_54d8dfd4-7a07-11e1-807d-ed15e3c494af/index.html](http://www.educ.ar/dinamico/UnidadHtml_get_54d8dfd4-7a07-11e1-807d-ed15e3c494af/index.html)

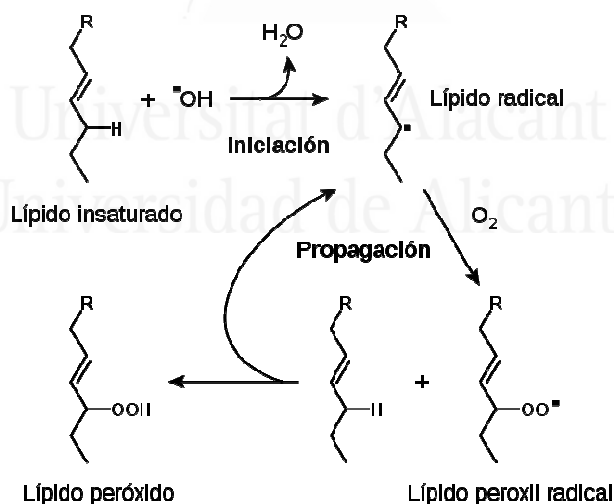
La lipoperoxidación (LPO) puede subdividirse en tres fases: iniciación, propagación y terminación. Durante la fase de iniciación, las EROs atacan al PUFA a nivel de los átomos de carbono adyacentes a los dobles enlaces que conducen a la liberación de hidrógeno de los grupos metileno vecinos, el cual es especialmente reactivo.

Ocasionalmente, este proceso crea un radical lipídico y agua. El electrón libre es transferido al lípido que crea un nuevo radical, que posteriormente es estabilizado por deslocalización del electrón libre sobre la molécula entera que causa una estructura con energía más estable que el radical libre de iniciación (Agarwal et al., 2012a).

Teniendo en cuenta que el radical lipídico resultante tampoco es una molécula muy estable, éste reaccionará espontáneamente con el oxígeno molecular para formar un peróxido lipídico. La propagación de la reacción se caracteriza por una reacción de este radical de peróxido lipídico con un ácido graso vecino, que crea otro radical graso ácido en un proceso llamado "reacción radical en cadena". En última instancia, este proceso causa daño a numerosas moléculas y hasta el 60% de los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana celular pueden ser oxidados.

La propagación de la LPO termina cuando un radical reacciona con otro radical, produciéndose así un producto no radical estable, puesto que los dos electrones libres de los dos radicales forman un enlace covalente (Agarwal et al., 2012a).

Figura 12. Mecanismo de la cadena de reacciones de los radicales libres en la peroxidación lipídica



[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid\\_peroxidation-es.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation-es.svg)

Como este proceso afecta a la integridad de la membrana, las EROs pueden perjudicar la motilidad y la morfología del espermatozoide, y pueden conducir a su muerte celular. Los espermatozoides necesitan una buena motilidad para migrar por el tracto reproductor femenino, además, para poder fecundar el ovocito el

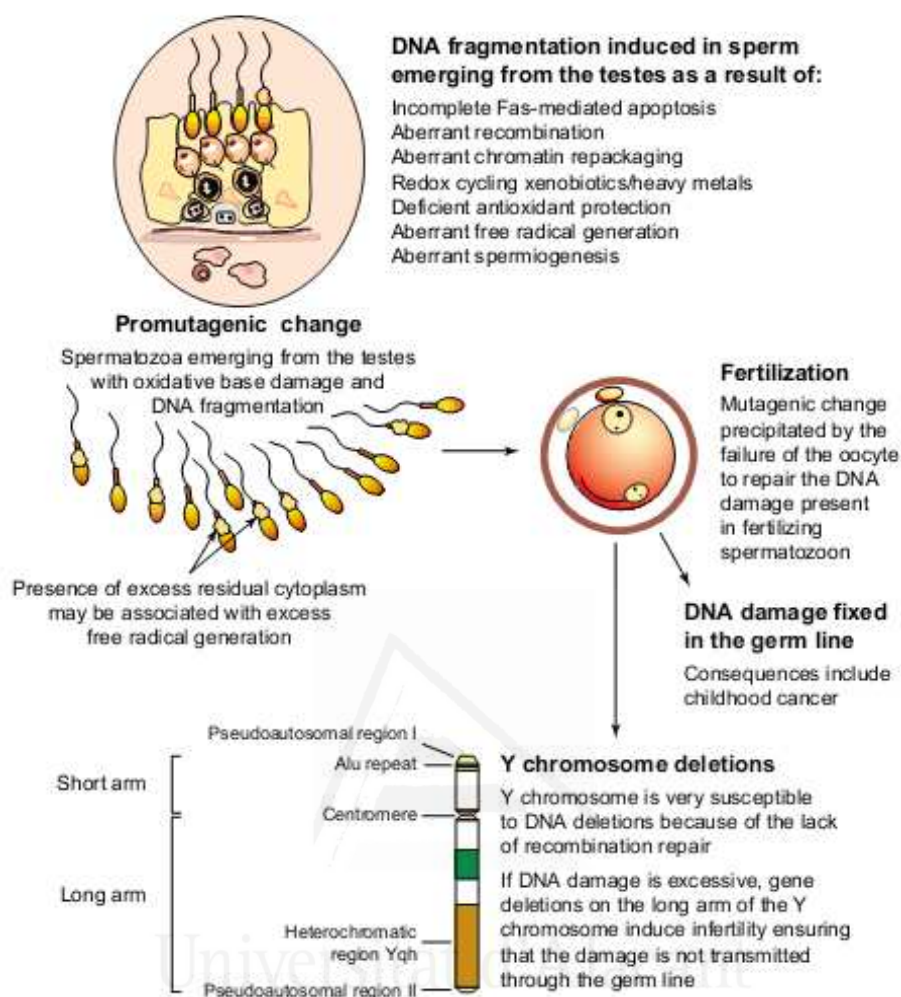
espermatozoide debe capacitarse, hiperactivarse y experimentar la reacción acrosomal, procesos que involucran a la membrana plasmática (Agarwal et al., 2011).

Las diferencias en la sensibilidad se deben a la variabilidad interindividual en la presencia y composición molecular de los ácidos insaturados grasos en la membrana celular del espermatozoide; al grado de exposición del espermatozoide a las EROs y la catálisis de los metales de transición a lo largo de la vida, y, por último, al nivel de protección de los antioxidantes, los cuales o bien rompen la cadena de oxidación y/o bien son enzimas que metabolizan a las EROs en los alrededores del espermatozoide durante su permanencia en el tracto reproductor masculino (Kruger et al., 2007).

Además, la agresión del ADN espermático por parte del estrés oxidativo puede influir profundamente sobre el desarrollo embrionario normal y en la salud a largo plazo de la progenie. Por todo ello, el estrés oxidativo se asocia con función espermática defectuosa e infertilidad (Agarwal et al., 2011).

La cromatina espermática de los mamíferos está en un estado casi cristalino y tiene muy poca capacidad para responder a cualquier daño de ADN inducido por el ataque oxidativo (Aitken et al., 2012). Por ello, el estrés oxidativo se relaciona con frecuentes roturas, tanto sencillas como dobles, de la hebra del ADN. Las EROs también pueden causar varios tipos de mutaciones génicas como polimorfismos y mutaciones puntuales, causando una disminución de la calidad del semen. Otros mecanismos que también pueden estar implicados son la desnaturalización y la oxidación de pares de bases del ADN (Makker et al., 2009). Por otra parte, el cromosoma Y es particularmente vulnerable al daño de ADN, debido en parte a su estructura génica y en parte a que no puede corregir las deleciones dobles del ADN mediante recombinaciones homólogas (Aitken et al., 2001).

Figura 13. Asociaciones propuestas entre inductores de la fragmentación del DNA en la línea germinal masculina y microdeleciones en el cromosoma Y (Aitken et al., 2001)



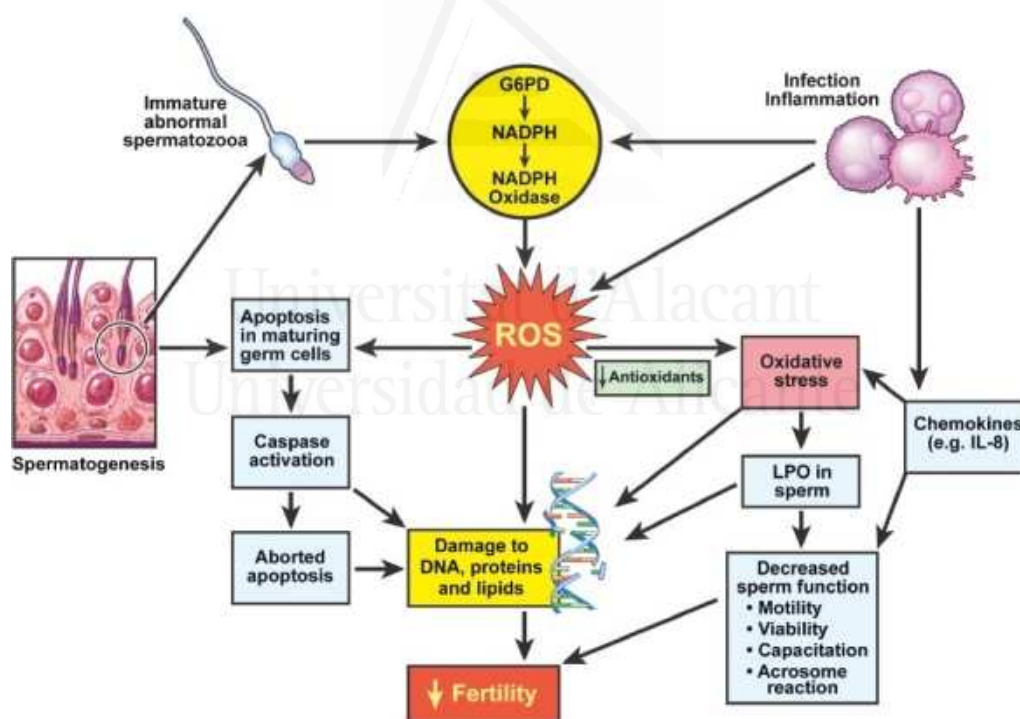
A diferencia de las células somáticas, los espermatozoides son los únicos que no son capaces de realizar la transcripción génica por sí mismos. Esto va acompañado de la falta de espacio citoplásmico para albergar enzimas antioxidantes propias, dejando al espermatozoide en una posición precaria. Sin embargo, el tracto reproductor masculino compensa la falta de capacidad antioxidante interna exponiendo al espermatozoide a una mezcla compleja de enzimas, que neutralizan las especies de oxígeno reactivas (EROs), y a antioxidantes de bajo peso molecular (Agarwal et al., 2012a).

Realmente hay dos factores que protegen el ADN del espermatozoide del estrés oxidativo: la disposición compacta característica del ADN en el espermatozoide, y los antioxidantes en plasma seminal. Cuando el grado de daño del ADN espermático es pequeño, puede repararse por los propios espermatozoides, e incluso, por el oocito.

Sin embargo, si el daño es extenso puede ocurrir una apoptosis y una fragmentación del embrión (Makker et al., 2009).

La apoptosis es una respuesta no inflamatoria al daño de tejido caracterizada por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. En el contexto del aparato reproductor masculino, esto ayuda en la eliminación de espermatozoides anormales, manteniendo así la capacidad reparadora de las células de Sertoli. Además, los altos niveles de EROs rompen las membranas internas y externas mitocondriales, induciendo la liberación de la proteína citocromo-C y activando las caspasas y la apoptosis. Pero a su vez, estos elevados niveles también provocan que la apoptosis no acabe de completarse, lo que da lugar a un fracaso en la eliminación de los espermatozoides abocados a ello, generándose así una gran población de espermatozoides anormales productores de EROs en el semen (Makker et al., 2009).

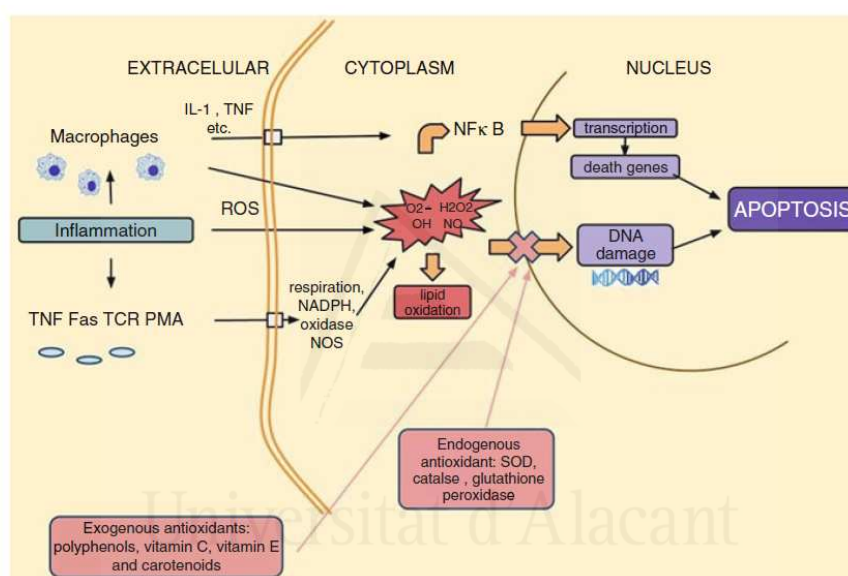
Figura 14. Mecanismo del estrés oxidativo en el semen humano (Agarwal et al., 2011)



A pesar de esto, el plasma seminal tiene una alta concentración de antioxidantes, que protegen a los gametos de las EROs. La capacidad antioxidante total del plasma seminal representa la suma potencial de las enzimas anti-EROs (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (GPx)), las sustancias de bajo peso molecular ( $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -caroteno, ascorbato, urato), y los quelantes de los metales de transición (transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina) (Agarwal et al., 2011).

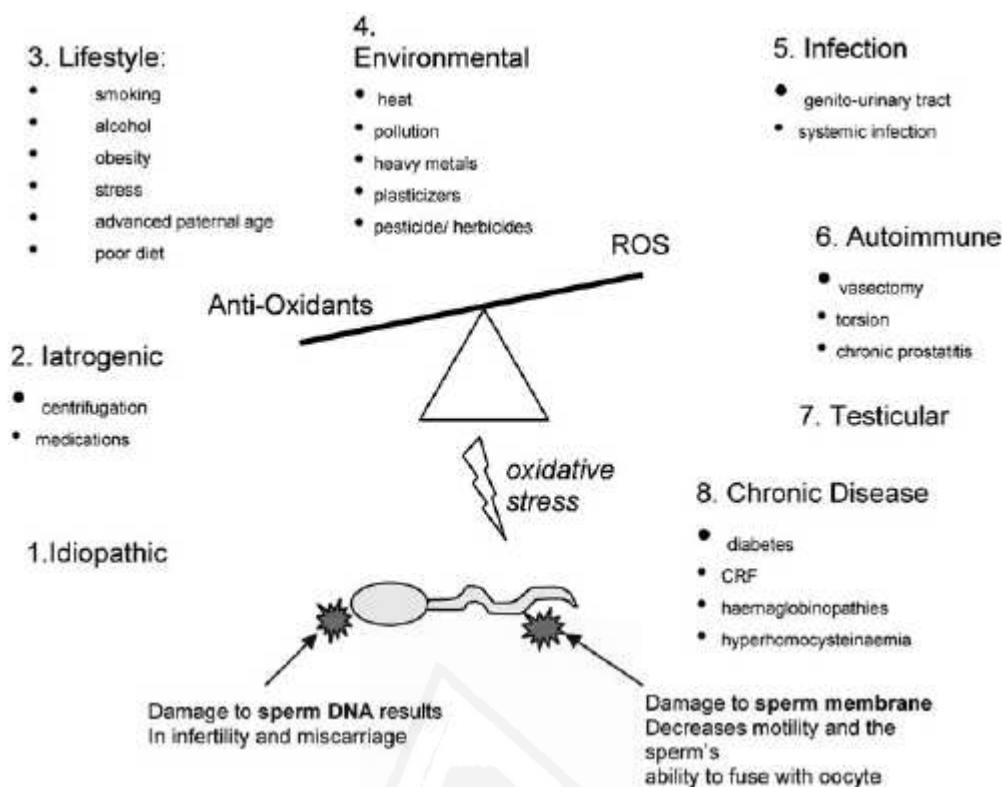
Los antioxidantes que se encuentran en el plasma seminal, ayudan a la prevención del ataque oxidativo del espermatozoide después de la eyaculación. Sin embargo, durante la espermatogénesis y el almacenamiento en el epidídimo, los espermatozoides no están en contacto con los antioxidantes del plasma seminal y dependen para su protección de los antioxidantes del epidídimo y de los testículos, y de su capacidad intrínseca antioxidante. Los espermatozoides son, por lo tanto, vulnerables al daño oxidativo durante el tránsito epididimal, especialmente cuando hay inflamación de éste, como en el caso de infección del aparato genital masculino, y en general cuando hay un exceso de producción de EROs (Tremellen, 2008).

Figura 15. Localización de los antioxidantes seminales (Agarwal et al., 2012a)



Por otra parte, el estrés oxidativo espermático puede tener distintos orígenes, tanto intrínsecos como extrínsecos, estos se resumen en la siguiente figura y se desarrollan a continuación:

Figura 16. Posibles orígenes del estrés oxidativo espermático (Tremellen, 2008)



### 1. Idiopática

Varios grupos de investigación han relacionado la infertilidad masculina idiopática con el estrés oxidativo. Una de las causas principales de esta asociación es la observación de que los espermatozoides morfológicamente anormales tienen aumentada la producción de EROs, pero también una capacidad antioxidante reducida. Estos investigadores refieren que aproximadamente un tercio de los hombres estériles presenta teratozoospermia, por lo que no es sorprendente que se relacione frecuentemente el estrés oxidativo espermático con la esterilidad masculina idiopática. Incluso los hombres con infertilidad idiopática normozoospermica presentan una producción de EROs seminal considerablemente más elevada y una capacidad antioxidante inferior que los varones fértiles, aunque la causa es aún desconocida (Tremellen, 2008).

### 2. Iatrogénica

Algunos fármacos, como el agente quimioterápico ciclofosfamida, se han relacionado con el estrés oxidativo espermático. La administración de ciclofosfamida a animales aumenta los niveles testiculares de malondialdehído (MDA) y provoca un descenso de la catalasa testicular. Los fármacos como la aspirina y el paracetamol (acetaminofeno)

también pueden producir estrés oxidativo por un aumento de la actividad del citocromo P450, aumentando así la generación de EROs (Tremellen, 2008).

En el empleo de técnicas reproductivas (TRA), como la FIV, la IA y la criopreservación, el daño de ADN inducido por el EO puede tener importantes implicaciones clínicas. Los estudios han indicado que los espermatozoides humanos aumentan considerablemente la producción de niveles de EROs en respuesta a los ciclos repetidos de centrifugación que se realizan en las técnicas convencionales de preparación espermática utilizadas para las TRA. Además se separan los espermatozoides de los antioxidantes protectores que se encuentran en el plasma seminal. Los espermatozoides seleccionados para las TRA por lo general se originan en un entorno que experimenta estrés oxidativo, y un alto porcentaje de estos espermatozoides pueden tener dañado el ADN. Cuando se realiza la inseminación intrauterina (IUI) o la fecundación *in vitro* (la FIV), tal daño no puede ser una causa de preocupación porque el daño peroxidativo colateral a la membrana celular espermática asegura que la fertilización no pueda ocurrir con una espermatozoide que contiene ADN dañado. Pero cuando se utiliza la ICSI, se evita esta barrera de selección natural y un espermatozoide con el ADN dañado se inyecta directamente en el oocito. Por tanto, las EROs pueden producirse en numerosos procedimientos de TRA, las fuentes principales son los oocitos y el metabolismo del embrión, la contaminación de los leucocitos durante la preparación del semen, y los medios de cultivo (Agarwal et al., 2006; Makker et al., 2009).

### 3. Estilo de vida

#### - Tabaco y otras drogas:

El humo del tabaco exagera la formación de EROs, evidenciada por el aumento de marcadores biológicos de estrés oxidativo en fumadores comparados con no fumadores (Bloomer et al., 2009). Según diversos estudios, fumar causa un aumento del 48% en la concentración de leucocitos y del 107% de los niveles de EROs en el plasma seminal. En los varones fumadores se encuentran disminuidos los niveles de antioxidantes seminales como las vitamina C y E, y un aumento significativo de los niveles de 8-OHdG, y de daño en el ADN, exponiendo a los espermatozoides a un riesgo adicional de daño oxidativo (Shen et al., 2000; Tremellen, 2008). Aunque sólo existan pruebas sugestivas, estos datos también proveen una exposición razonada para una futura investigación del papel de las mitocondrias con el estrés oxidativo en la línea germinal masculina en fumadores (Agarwal et al., 2012a).



En el humo de tabaco se encuentran presentes muchos productos químicos tóxicos como el óxido nítrico y otros radicales de oxidación que dañan las funciones celulares. El estado antioxidante disminuido y el estrés oxidativo aumentado en los fumadores se ha relacionado con el alto contenido oxidante del humo. Además, los fumadores suelen tener dietas más pobres que los no fumadores. Por lo tanto, los fumadores se beneficiarían de aumentar el consumo de antioxidantes en su dieta. Según una hipótesis propuesta por Whichelow et al. y Grunberg (1988), los fumadores pueden encontrar los alimentos dulces como el zumo de frutas, menos sabroso que los productos fritos. Esto puede deberse al efecto de fumar (vía nicotina) sobre su sentido del gusto (Jain et al., 2009).

Por otra parte, otros autores defienden que la exposición fetal al humo de tabaco tiene un impacto más fuerte sobre la calidad del semen que fumar durante la edad adulta (Bonde, 2010).

La marihuana es la droga de abuso más comúnmente usada por todo el mundo. Sarafian et al. (1999) relataron que el humo de la marihuana que contiene tetrahidrocannabinol (THC) es una potente fuente de estrés oxidativo celular que podría contribuir al daño celular. Debido a que la cadena respiratoria tiene la capacidad de producir EROs, una desregulación por THC puede causar un importante daño oxidativo al mtADN. El THC también cambia otra de las funciones esenciales espermáticas, como la reacción acrosómica (Agarwal et al., 2012a).

La cocaína promueve la oxidación mediante la participación de las enzimas inducidas por el óxido nítrico sintasa (iNOS) y la xantina oxidasa (Agarwal et al., 2012a).

- Dieta pobre:

Numerosos estudios han relacionado déficits dietéticos con daño oxidativo, sobre todo en relación con las vitaminas E y C, ácido fólico y Zinc (Tremellen, 2008).

La dieta mediterránea ofrece un correcto equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, por los siguientes motivos: elevado consumo de alimentos verdes, con altos contenidos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (vitamina C), bajo consumo de grasas saturadas (aceite de oliva), bajo consumo de conservas (conlleva la pérdida de las sustancias antioxidantes naturales del alimento fresco) y, posibilidad de la presencia del vino, cuyo etanol en cantidades adecuadas funcionará como antioxidante no enzimático (Elejalde, 2001).

El consumo de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva, además de mejorar el índice aterogénico (colesterol total/colesterol HDL), aumenta la resistencia a la oxidación de las LDL en comparación con una dieta pobre en grasa. También hay evidencias de que los compuestos fenólicos de la fracción no grasa del aceite de oliva virgen tienen efectos antioxidantes protegiendo de la autooxidación. El beneficio del aceite de oliva correlaciona con aumento en los niveles de ácidos grasos  $\omega$ -3, ácido oleico, vitaminas C y E y disminución del ácido linoleico como resultado de una mayor ingestión de ácido linolénico y ácido oleico. Las grasas monoinsaturadas como el aceite de oliva son más resistentes a la oxidación que las saturadas y las poliinsaturadas (Elejalde, 2001).

En concreto, los PUFAs  $\omega$ -3 (DHA, EPA y ácido linolénico) y los  $\omega$ -6 (ácido linoleico, gamma linolénico y araquidónico) son componentes estructurales de las membranas espermáticas y mantienen su fluidez lipídica. Es decir, que el éxito de la fertilización depende de ellos, pero a su vez los  $\omega$ -3 tienen un importante carácter antioxidante. Además, se han encontrado correlaciones positivas entre la concentración de DHA en las membranas espermáticas y la motilidad. Por este motivo Safarinejad et al. (2012) consideran que deben tenerse en cuenta como suplemento nutricional para incrementar la calidad seminal (Safarinejad et al., 2012).

Por todo esto, debido a que nuestras defensas endógenas antioxidantes no aparentan ser completamente efectivas, parece razonable proponer una dieta rica en antioxidantes o, como ya se está experimentando, una suplementación exógena de antioxidantes. Así una dieta rica en frutas, nueces, cereales y vegetales, y una ingesta de pequeñas cantidades de vino tinto, parece proteger de numerosas enfermedades (Elejalde, 2001).

- Alcohol:

En adultos, un número limitado de estudios ha evaluado un posible efecto de la exposición a alcohol durante la producción de espermatozoides sobre los parámetros seminales con resultados contradictorios: unos indican un efecto perjudicial, pero otros defienden lo contrario, e incluso atribuyen un efecto protector con cantidades moderadas de alcohol (Agarwal et al., 2012a).

El etanol a dosis bajas tiene efectos antioxidantes. Los efectos positivos atribuidos al vino, especialmente al vino tinto, parecen radicar en los productos fenólicos

(flavonoides) contenidos en él, puesto que reducen el colesterol LDL e inhiben la susceptibilidad de las LDL a oxidarse, entre otras funciones (Elejalde, 2001).

El consumo de alcohol excesivo causa un aumento del estrés oxidativo sistémico, debido a que el etanol estimula la producción de EROs, y además muchos consumidores de alcohol tienen dietas deficientes en protectores antioxidantes. Un estudio realizado con 46 hombres alcohólicos en edad reproductiva sugirió la presencia de estrés oxidativo dentro del testículo ya que provoca una reducción significativa de la testosterona plasmática, un aumento de los subproductos de la peroxidación lipídica y una disminución de antioxidantes en suero. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado directamente la relación entre la ingesta de alcohol y el daño oxidativo espermático (Tremellen, 2008).

- Ejercicio físico y obesidad:

Los extremos en la práctica de ejercicio físico se han relacionado con el estrés oxidativo. No es sorprendente que practicar ejercicio en exceso se relacione con estrés oxidativo, ya que desde el músculo el metabolismo aeróbico crea una gran cantidad de EROs (Tremellen, 2008). Por esta razón, probablemente sea mejor limitar la práctica de ejercicio físico moderado a 3 ó 4 veces por semana para minimizar cualquier efecto pro-oxidante (Agarwal et al., 2012a).

Por el contrario, la obesidad produce estrés oxidativo debido a que el tejido adiposo libera citoquinas pro-inflamatorias que aumentan la producción de EROs en el leucocito. Además, la acumulación de tejido adiposo dentro de la región inguinal causa un aumento de la temperatura del testículo, lo que se ha relacionado con el estrés oxidativo y la reducción de la calidad espermática (Tremellen, 2008; Martínez, 2011).

Muchos investigadores han indicado que la acumulación aumentada de adipocitos genera EROs que propaga efectos sistémicos y perjudiciales sobre la salud masculina reproductiva, mientras otros han atribuido el perfil hormonal anormal como el factor central. En realidad se trata de una mezcla de ambas propuestas, de hecho el aumento de hormonas adiposas derivadas y los niveles de adipokina pueden explicar mejor la asociación del índice de masa corporal (IMC), los parámetros espermáticos alterados, y la infertilidad (Agarwal et al., 2012a).

También hay que tener en cuenta que la mayoría de los tóxicos son liposolubles y tienden a acumularse en el tejido graso, por ello, debido a sus reservas lipídicas, los

hombres obesos tienen un riesgo más elevado. Además, con la creciente incidencia de obesidad se espera que aumente el número de hombres obesos con fertilidad reducida (Hammoud et al., 2008a).

- Estrés:

La esterilidad debe ser reconocida como uno de los principales factores causantes de estrés personal y, por tanto, que afecta a las relaciones de pareja, probablemente reduciendo la libido y la frecuencia de coitos, y de esta manera dificultando aún más y directamente la posibilidad de concebir (Domar et al., 2000). Es decir, los problemas de esterilidad, así como la investigación y el tratamiento de estos problemas, ocasionan alteraciones psicológicas y estrés (Fontes et al., 2008).

Por otro lado, la calidad de los espermatozoides de los hombres sometidos a situaciones muy traumáticas y puntuales de estrés, puede verse también seriamente alterada. El estrés psicológico produce una reducción de la calidad del semen; por un mecanismo mediado por las gonadotropinas. Sin embargo, estudios recientes han relacionado un período de estrés psicológico con una disminución de la calidad espermática mediada por un aumento de generación de EROs y una reducción de la protección antioxidante en el plasma seminal (Tremellen, 2008).

- Edad avanzada:

La influencia de la edad paterna en la fertilidad ha ganado el interés de los investigadores debido a los cambios que se están dando en el modelo reproductivo humano, a una combinación de cambios sociales, a la prolongación de la esperanza de vida, y a la confianza sobre las técnicas de reproducción asistida (TRA). Actualmente está demostrada la asociación entre la edad aumentada paterna y los parámetros espermáticos disminuidos (Agarwal et al., 2012a).

Varios estudios han descrito que el ADN espermático dañado aumenta con la edad avanzada tanto en hombres fértiles como estériles. Es posible que el aumento del daño oxidativo del ADN espermático sea la patología subyacente (Tremellen, 2008). En distintos tejidos, el envejecimiento se asocia con el estrés oxidativo. Estudios en roedores muestran que el envejecimiento de las células germinales masculinas presenta un aumento de EROs y una reducción de las enzimas antioxidantes. Este estrés oxidativo puede ser la causa del daño de ADN observado en las células germinales (Agarwal et al., 2012a).

También se ha demostrado que la edad aumentada de la población está vinculada a los niveles elevados de mutaciones en mtADN; esto es una consecuencia directa de la generación constante de EROs en las mitocondrias, junto con la falta de protección del mtADN en comparación con el ADN nuclear, el cual está provisto de histonas o protaminas. Posteriormente, las mutaciones o deleciones en mtADN conducen a defectos en la fosforilación oxidativa, la homeostasis del calcio, y otras enfermedades relacionadas con el mtADN. La asociación entre la edad aumentada paterna y la disminución de la fertilidad, probablemente se deba a la producción de EROs mitocondrial (Agarwal et al., 2012a).

En los hombres mayores de 35 años aumenta la incidencia de aneuploidia en sus espermatozoides, disminuye la motilidad espermática, y se da un aumento de las aberraciones en la cromatina espermática, asociada con distintos problemas como una disminución en la tasa de embarazo en las parejas de los varones de edad más avanzada (Agarwal et al., 2012a).

#### 4. Medio ambiente

La generación de EROs en todos los tipos celulares puede estar exacerbada por una multitud de factores externos y ambientales. El desarrollo industrial expone a hombres y mujeres a un número creciente de productos químicos diferentes y subproductos industriales en su entorno. Se sabe que muchos de estos compuestos tóxicos inducen estrés oxidativo y parece que suponen una amenaza seria para la salud general y reproductiva a nivel mundial, y sobre todo en los países en vías de desarrollo (Agarwal et al., 2012a).

Los tóxicos ambientales pueden interferir en la función masculina reproductiva a través de múltiples vías y diferentes mecanismos, afectando al sistema endocrino (p.ej. actuando como disruptores endocrinos) cambiando la expresión génica que es necesaria en la espermatogénesis, alterando la esteroidogénesis, y produciendo efectos epigenéticos, que pueden causar anomalías en el sistema reproductivo de los descendientes varones hasta cuatro generaciones después de la exposición en el útero. Y, como consecuencia aparece un recuento espermático bajo, una morfología anormal de espermatozoides y una pobre calidad de semen (Wong et al., 2011).

Estos tóxicos son sumamente heterogéneos, con estructuras químicas muy diferentes, como los metales pesados, fungicidas, pesticidas y fenoles..., que a menudo se liberan en el ambiente durante procesos industriales. Las personas asimilan estos

tóxicos ambientales por la ingestión de alimentos y aguas contaminadas, uso de productos de consumo (p.ej. tupperwares y cosméticos) y la inhalación de aire contaminado (Wong et al., 2011; Miyamoto et al., 2012).

La exposición a tóxicos ambientales se encuentra a menudo por debajo de los niveles de dosis tóxicas para causar muerte celular. Aunque la exposición aguda a tóxicos contribuya a la apoptosis y necrosis de las células testiculares, la exposición crónica y subletal prevalece en la mayoría de la población. Debido a las semividas excepcionalmente largas de algunos de estos tóxicos en el organismo de los mamíferos (p.ej. el cadmio tiene una semivida media de más de 15 años), la exposición crónica de la población a bajas dosis podría causar efectos para la salud no deseables a largo plazo (Wong et al., 2011).

Estudios recientes han destacado la importancia de evaluar los efectos de un conjunto de tóxicos ambientales sobre la función masculina reproductiva porque la población está expuesta a una serie de productos químicos que podrían ser agonistas o antagonistas entre ellos. Aunque este tipo de estudio pueda ser difícil de emprender intrínsecamente, es crucial llevar a cabo investigaciones para una completa comprensión del impacto de los tóxicos ambientales sobre el sistema reproductivo (Wong et al., 2011).

Se ha relacionado la exposición a metales pesados con daño oxidativo espermático (Massnyi et al., 2003). Por ejemplo, se ha observado un aumento de la infertilidad y de abortos en soldadores y trabajadores de fábricas de batería/pintura, que puede ser debido al daño oxidativo del ADN espermático ocasionado por la inhalación de vapores metálicos. Otros tóxicos que también se han estudiado son los ftalatos, que se encuentran en los envoltorios de los alimentos, y pesticidas (Tremellen, 2008).

Tabla 4. Lista de componentes con capacidad de producir EO en los testículos (Aitken et al., 2008)

Tabaco	Nonilfenol
Alcohol	Adriamicina
Cromo	Cisplatino
Hierro	Ciclofosfamida
Plomo	Hexaclorociclohexono
Cadmio	Trinitrotolueno
Uranio	Aflatoxina
Arsénico	Lindano
Vanadio	Quinalfos
Esteres de ftalatos	Endosulfan
Dióxido de sulfuro	Dietilmaleato
Fluoruro de sodio	Momensina
Policlorobifenilos y policloronaftalenos (PCB y PCN)	Formaldehído
Metoxicloro	Alloxan
Bisfenol A	Estreptozotocina
Ozono	Acilamida

Se ha demostrado que simplemente variando los hábitos de vida, se benefician los niveles hormonales, y los tratamientos se vuelven aún más eficaces, por ello los cambios a hábitos de vidas apropiados, y las alternativas quirúrgicas deberían ser más estudiadas (Agarwal et al., 2012a).

## 5. Enfermedades

Como ya se ha expuesto anteriormente, las infecciones (tanto en el tracto genitourinario como las sistémicas), las afecciones testiculares (varicocele, criptorquidia...), las enfermedades inflamatorias o autoinmunes (en la próstata) y las enfermedades crónicas (diabetes...), se han relacionado con estrés oxidativo (Tremellen, 2008).

En definitiva, se han encontrado evidencias de que el daño oxidativo en los espermatozoides está presente en el 30-80% del semen de los varones estériles, dependiendo de las técnicas utilizadas para medir el estrés oxidativo y la población estudiada. Puesto que el estrés oxidativo es una patología tan común, parecería lógico que todos los hombres estériles se sometieran a pruebas relacionadas. Sin embargo, sorprendentemente, esto no se realiza en la práctica clínica. Los motivos son múltiples, pero incluyen un desconocimiento general entre los médicos de la

importancia del estrés oxidativo como una causa de infertilidad masculina, una falta de ensayos coste-efectivos para el estrés oxidativo espermático, y la ausencia de una pauta de tratamiento internacionalmente aceptada (Agarwal et al., 2012a; Hamada et al., 2013).

### **1.3.3 Agentes implicados en el mantenimiento del estatus oxidativo**

#### **1.3.3.1 Antioxidantes**

En el plasma seminal, además de los procesos que generan moléculas prooxidantes, existen mecanismos encargados de eliminar dichas sustancias. Estos mecanismos desempeñan una función importante en la prevención del daño celular interno y por lo tanto, en la protección de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Alba et al., 2000).

Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia, que estando presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del mismo. Tales sustancias pueden tener acción directa, por medio de la neutralización de los radicales libres y especies reactivas no radicales, o indirecta, a través de sistemas enzimáticos con capacidad para su neutralización (Barbosa et al., 2008). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios.

Existen estudios que han demostrado que los antioxidantes tienen un efecto amplio en andrología. Éstos protegen a los espermatozoides de las EROs producidos tanto por los espermatozoides anormales, como por los leucocitos; previenen la fragmentación de ADN; mejoran la calidad del semen en fumadores; bloquean la maduración prematura espermática; estimulan a los espermatozoides y ayudan a mejorar el resultado de las técnicas reproductivas (TRA). Tres sistemas de protección antioxidante diferentes juegan papeles importantes e interdependientes para reducir el estrés oxidativo en varones: antioxidantes dietéticos, antioxidantes endógenos, y proteínas queladoras de metales (Makker et al., 2009).

Los antioxidantes endógenos comprenden aquellos presentes en el plasma seminal y espermatozoides. El plasma seminal contiene tres antioxidantes enzimáticos principales: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutathion peroxidasa/glutathion reductasa (GPx/GR), además de una amplia gama de antioxidantes no enzimáticos



como ascorbato, urato, vitamina E, piruvato, glutatión, albúmina, vitamina A, ubiquinol, taurino e hipotaurino. Los espermatozoides poseen principalmente antioxidantes enzimáticos, siendo la SOD el predominante. Los antioxidantes dietéticos están por lo general presentes en forma de vitamina C y E, beta-carotenos, carotenoides, y flavonoides (Makker et al., 2009).

Las proteínas quelantes de metales como la albúmina, ceruloplasmina, metalotionina, transferrina, ferritina, y la mioglobina, actúan mediante la inactivación de los iones metálicos de transición, que de otra manera hubieran catalizado la producción de radicales libres. La transferrina, la lactoferrina, y la ceruloplasmina, que están presentes en el semen humano, también controlan la peroxidación lipídica de la membrana celular del espermatozoide, protegiendo así su integridad (Makker et al., 2009). Mientras las vitaminas actúan donando o aceptando electrones en las reacciones de óxido-reducción, los minerales regulan la actividad de las enzimas antioxidantes (Barbosa et al., 2008).

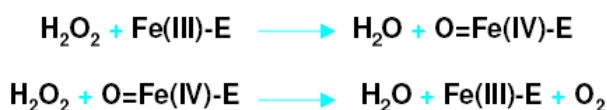
#### 1.3.3.1.1 Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes actúan a nivel intracelular. A grandes rasgos se caracterizan por utilizar iones metálicos (Fe, Zn, Cu, Mn y Se) como elementos catalíticos esenciales.

##### 1.3.3.1.1.1 Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima ubiquitina antioxidante presente en la mayoría de las células aeróbicas. Está implicada en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) intracelularmente, y se localiza fundamentalmente en los peroxisomas. Actúa sobre todo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son altas. Es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de Fe realiza el intercambio redox.

El mecanismo completo de la catalasa no se conoce, pero la reacción química se produce en dos etapas:



El Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúa como cofactor.

En resumen la reacción quedaría:



La catalasa es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ninguna concentración.

En los humanos, los niveles más altos de catalasa se encuentran en el hígado, los riñones y los eritrocitos, donde se cree que se encuentra la mayoría de la descomposición del peróxido de hidrógeno. En lo que respecta al aparato reproductor, la catalasa se origina principalmente en el plasma seminal, aunque se han encontrado bajos niveles de actividad en los espermatozoides (Alba et al., 2000).

La catalasa es la enzima más importante para la detoxificación del peróxido de hidrógeno en el plasma seminal. Los datos de la literatura indican que la catalasa proporciona la protección antioxidante más eficaz contra los efectos de los radicales libres cuando las células espermáticas se incuban junto con productores de radicales de oxígeno. Estudiando la actividad de la catalasa en el plasma seminal y en las células espermáticas, se ha observado que la actividad catalasa es considerablemente más alta en aquellas muestras en las que los espermatozoides y otros elementos celulares del eyaculado producen EROs. Los resultados obtenidos por Zelen et al. (2010) mostraron que la actividad catalasa era considerablemente inferior en todos los pacientes estériles comparados con los varones fértiles, y la disminución más pronunciada de la actividad catalasa se observó en el grupo de sujetos normozoospermicos. Otros investigadores también han mostrado que la actividad catalasa disminuye en el plasma seminal de pacientes estériles, y confirmaron una correlación estadísticamente significativa entre el número de células espermáticas y la actividad enzimática (Khosrowbeygi et al., 2007; Zelen et al., 2010).

Además, la catalasa activa la capacitación espermática NO-inducida, mecanismo complejo en el que se encuentra involucrada el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Agarwal et al., 2005a; Shiva et al., 2011).

#### 1.3.3.1.1.2 Glutación Peroxidasa (GPx)

Esta enzima también elimina el peróxido de hidrógeno en el ser humano, pero a diferencia de la catalasa, actúa a niveles bajos de éste. La GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y la de los hidroperóxidos lipídicos a agua en el primer caso,

y a alcoholes estables y agua en el segundo, mediante la oxidación del glutati6n reducido (GSH) a glutati6n oxidado (GSSG).

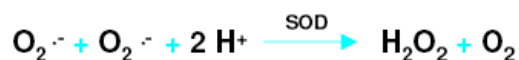


Hay dos tipos de GPx. La primera es una forma enzimática, tetramérica, y dependiente de Se, elemento que controla la sntesis de la proteina y es esencial para su actividad. Elimina tanto hidroper6xidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La otra forma no tiene Se, es dimérica y sólo es capaz de eliminar ROOH. Las GPx a nivel intracelular se localizan en el citosol y la matriz mitocondrial. Las diferentes isoenzimas que se conocen se expresan en tejidos específcos. Se sabe que la expresi6n de la GPx es inducida por estrés oxidativo y que una expresi6n aberrante de la misma está asociada a una gran variedad de patologías, incluyendo la hepatitis y varios tipos de cánceres como el de piel, riñ6n intestino o mama (Espinosa, 2007).

La GPx se localiza en los testículos, la próstata, las vesículas seminales, los conductos deferentes, el epidídimo, el plasma seminal y en los propios espermatozoides (Tremellen, 2008).

#### 1.3.3.1.1.3 Super6xido Dismutasa (SOD)

La familia de las super6xido dismutasas está constituida por metaloenzimas que convierten el O<sub>2</sub><sup>·-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios y son cuatro tipos de enzimas: CuZn-SOD, Cu-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD.



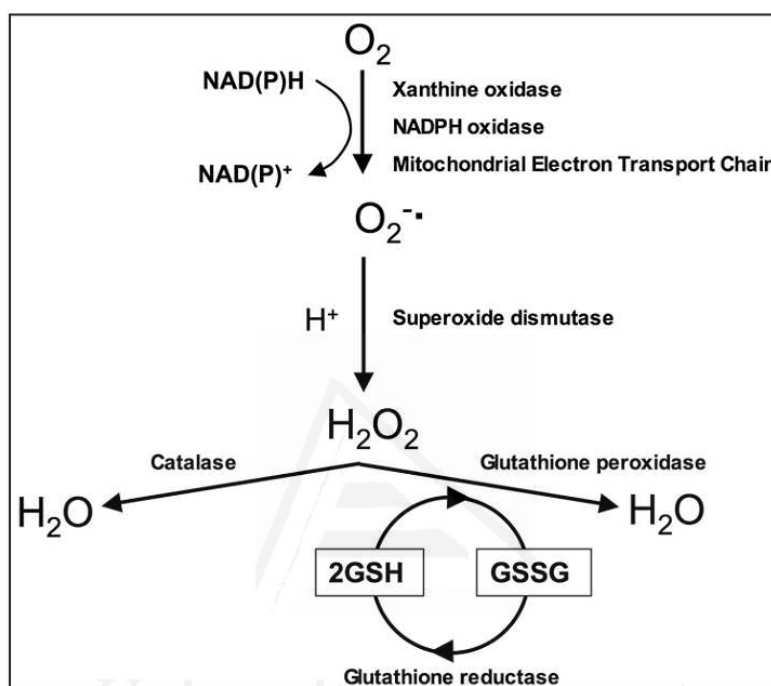
En esta reacci6n una molécula de super6xido se oxida hasta O<sub>2</sub>, mientras que la otra se reduce a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo tanto, se transforma una especie reactiva (el super6xido) en otra (per6xido de hidrógeno). Esto explicaría algunos resultados aparentemente paradójicos en los que un exceso de enzima puede llevar al individuo a una situaci6n deletérea.

La SOD previene la peroxidaci6n lipídica de la membrana plasmática, se conjuga con la catalasa o la glutati6n peroxidasa para la prevenci6n de la acci6n del per6xido de hidrógeno (Shiva et al., 2011). Además previene la hiperactivaci6n y la capacitaci6n

prematuras inducidas por los radicales superóxidos antes de la eyaculación (Agarwal et al., 2005a).

La ruta enzimática para la detoxificación de especies reactivas del oxígeno es la siguiente:

Figura 17. Principales procesos en la generación y metabolismo de las EROs (Aitken et al., 2008)



La presencia de SOD en el semen humano constituye uno de los elementos principales en la protección de las células sexuales masculinas contra el estrés oxidativo. En el plasma seminal la actividad de la SOD es elevada, su valor resulta 20 veces superior al del plasma sanguíneo. Diversos estudios informan que la CuZn-SOD es responsable del 75% de esta actividad y que la SOD extracelular lo es del 25%. Ambas isoenzimas tienen como origen primario la próstata y el epidídimo. La actividad de la Mn-SOD es insignificante en el fluido seminal. Por su parte, los espermatozoides humanos contienen excepcionalmente grandes cantidades de CuZn-SOD y poseen una ínfima cantidad de SOD extracelular. En estas células la actividad de la isoenzima que emplea el Mn también es baja (Alba et al., 2000).

La SOD es termoestable, a diferencia de las otras dos enzimas, por lo que una elevada temperatura escrotal no la inactiva ni reduce su actividad. Además, la actividad superóxido dismutasa generalmente está aumentada con la presencia de donadores de electrones y se inactiva con la de aceptores. Estos rasgos explican por

qué la actividad superóxido dismutasa se puede encontrar inalterada o aumentada en hombres estériles. Sin embargo, el mantenimiento de la actividad superóxido dismutasa conduce a la generación adicional de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el testículo, que excede la capacidad desintoxicante de la catalasa o la glutatión peroxidasa, causando un exceso de estrés oxidativo (Hamada et al., 2013).

### **1.3.3.1.2 Vitaminas**

#### 1.3.3.1.2.1 Vitamina C

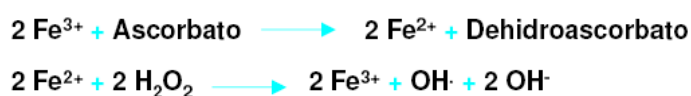
La vitamina C o ácido ascórbico, es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares, aunque actúa tanto a nivel intra como extracelular. La oxidación reversible del ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico cediendo dos electrones, es su propiedad química más importante y es la base de sus propiedades biológicas como antioxidante (Deulofeu et al., 2005).

El ácido L-ascórbico se encuentra en todas las células del organismo aunque sus concentraciones varían en los distintos tejidos. Se encuentra en concentraciones 10 veces más altas en el plasma seminal que en el suero, lo que sugiere que su papel fisiológico se encuentra en el plasma seminal, y contribuye hasta en el 65% de la capacidad antioxidante total del plasma seminal, tanto intracelular como extracelularmente. El ácido ascórbico protege a los espermatozoides contra el daño oxidativo del ADN endógeno (Makker et al., 2009; Agarwal et al., 2011; Shiva et al., 2011), por ello, se considera que la vitamina C presente en las gónadas, juega un papel crítico en la maduración espermática (FAO and WHO, 2001).

Las principales funciones bioquímicas conocidas del ácido ascórbico se podrían resumir en su acción como dador de electrones en numerosas reacciones enzimáticas, catalizadas por dioxigenasas dependientes de ácido ascórbico, y en su acción no enzimática como antioxidante, por la que elimina eficazmente los radicales libres de oxígeno formados en el metabolismo celular en el citosol y otras regiones hidrofílicas de la célula (Deulofeu et al., 2005). Esta vitamina C puede actuar directamente sobre radicales libres como el radical hidroxilo, el anión superóxido, el oxígeno singlete, especies reactivas del nitrógeno o sobre hidroperóxidos lipídicos. Otra de las funciones principales de este antioxidante es que juega un papel muy importante en la regeneración de la forma oxidada de la vitamina E (Rodríguez et al., 2001), y presenta asimismo capacidad detoxificante de metales pesados (plomo, mercurio, cadmio,

estroncio) favoreciendo su eliminación o disminuyendo su absorción intestinal (Deulofeu et al., 2005; Makker et al., 2009).

Aunque parece paradójico, bajo ciertas circunstancias (presencia de metales pesados y adecuadas condiciones de pH) el ácido ascórbico puede mostrar un efecto prooxidante e incluso mutagénico. El ácido ascórbico, manteniendo el hierro en su forma reducida de  $\text{Fe}^{2+}$ , contribuye a facilitar la reacción de Fenton que es una fuente de radicales libres. Los productos generados por estas reacciones incluyen radicales de lípidos que propagan la peroxidación de grasas y los radicales hidroxilos (Deulofeu et al., 2005). Reacción de Fenton:



Los niveles de ascorbato endógeno disminuyen dramáticamente cuando ocurre un estrés oxidativo en los testículos debido a, por ejemplo, la exposición crónica a plomo, cromo, o cadmio (Aitken et al., 2008).

Las principales fuentes de ácido ascórbico de la dieta son las frutas, las verduras y las hortalizas. Entre las frutas destacan las fresas y los cítricos (naranjas, limones, mandarinas), y entre los vegetales, las coles, las espinacas, el tomate, la coliflor, el brócoli, los pimientos, los espárragos y las patatas (FAO and WHO, 2001; Deulofeu et al., 2005).

A pesar de que el ácido ascórbico es un nutriente esencial para los seres humanos, no existe un criterio unificado sobre las cantidades recomendadas que deben ingerirse (Deulofeu et al., 2005).

#### 1.3.3.1.2.2 Vitamina B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> forma parte de un grupo de compuestos organometálicos, las cobalaminas. Pero de este grupo, solamente cuatro han sido aisladas en tejidos de mamíferos: la hidroxicobalamina, que es la forma natural de la vitamina, la glutationilcobalamina, la metilcobalamina y la adenosilcobalamina.

Las enzimas con coenzimas derivadas de la vitamina B<sub>12</sub> catalizan tres tipos de reacciones (Deulofeu et al., 2005):

- 1– Reordenamientos intramoleculares.
- 2– Metilaciones, como la síntesis de metionina.

### 3– Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos.

El efecto de la cobalamina en la reproducción está poco definido, aunque hay algunas evidencias de que esta vitamina afecta a los parámetros espermáticos. Boxmeer et al. (2007) encontraron una correlación positiva significativa entre la concentración total de cobalamina en el plasma seminal, y la concentración de espermatozoides en varones que participan en una FIV o ICSI. Asimismo, observaron una correlación positiva entre la concentración total de cobalamina en suero con la concentración de ésta en plasma seminal.

Una deficiencia de las vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> y folato causa una leve hiperhomocisteinemia en el plasma sanguíneo, lo que se asocia con varios problemas de salud, como enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, y también con desórdenes reproductivos, como la interrupción del embarazo recurrente y las malformaciones congénitas. Deberían de realizarse más estudios sobre este tema para clarificar el papel de la cobalamina en la espermatogénesis (Boxmeer et al., 2007).

La mayor parte de los microorganismos, incluyendo las bacterias y las algas, sintetizan la vitamina B<sub>12</sub>, constituyen la única fuente dietética de esta vitamina para los humanos. La cobalamina sintetizada en los microorganismos entra en la cadena alimenticia humana por la incorporación de alimentos de origen animal. En muchos animales la fermentación gastrointestinal favorece el crecimiento de microorganismos que sintetizan esta vitamina, y posteriormente la vitamina es absorbida e incorporada en los tejidos del animal (FAO and WHO, 2001). Por ello, los órganos animales constituyen la principal fuente dietética de vitamina B<sub>12</sub>, sobretodo el riñón, el hígado y el cerebro. También se encuentra vitamina B<sub>12</sub>, aunque en menor cantidad, en las ostras, el pescado, los huevos, la leche y el queso. En la carne predominan la adenosilcobalamina y la hidroxilcobalamina, mientras que los productos lácteos, incluyendo la leche humana, contienen sobretodo metilcobalamina e hidroxilcobalamina (Deulofeu et al., 2005).

#### 1.3.3.1.2.3 Ácido fólico

El ácido fólico o folato es importante para la síntesis de ADN, ácido ribonucleico (ARN) de transferencia y los aminoácidos cisteína y metionina. También forma parte de otros derivados de gran importancia metabólica como el AMPcíclico, ATP, GPT, etc (Deulofeu et al., 2005; Murphy et al., 2011).

La síntesis de ADN juega un papel importante en el desarrollo de las células germinales, y por lo tanto, el folato es importante para la reproducción. También se ha observado que el ácido fólico, la forma sintética del folato, secuestra con eficacia radicales libres oxidantes, y como tal puede ser considerado como un antioxidante. A pesar de su carácter soluble en agua, el ácido fólico inhibe la lipoperoxidación (LPO). Así pues, el ácido fólico puede proteger del daño de los radicales libres a los componentes biológicos como las membranas celulares o al ADN (Ebisch et al., 2007).

Boxmeer et al. (2007) afirmaron que la concentración total de folato en el plasma seminal correlaciona considerablemente con el existente en el plasma sanguíneo, y que los derivados del folato como el 5-metiltetrahidrofolato en el plasma seminal parecen correlacionarse con la concentración de espermatozoides. En cambio, no encontraron una correlación significativa entre la concentración total de folato en el plasma seminal y los parámetros espermáticos, lo que contrasta con los resultados de Wallock et al. (2001), que sí hallaron correlación significativa entre los derivados no metilados del folato en particular, y la concentración espermática (Boxmeer et al., 2007). Por tanto, todavía no está claro el impacto del folato dietético y el ácido fólico sintético sobre la (in)fertilidad (Ebisch et al., 2007).

El término ácido fólico proviene del latín "folium", que es indicativo de los alimentos más ricos en esta vitamina: las hojas. Las principales fuentes alimenticias de folatos son, consecuentemente, las verduras y las hortalizas: las acelgas, las espinacas, la remolacha, las coles, las judías y los guisantes. Otra buena fuente de folatos son el aguacate, los garbanzos, los frutos secos, los cereales, el hígado, el pan, la levadura y las frutas. Cabe advertir, no obstante que por su carácter hidrosoluble los folatos pueden perderse en el agua de cocción de los alimentos (FAO and WHO, 2001; Deulofeu et al., 2005). La forma en la que se presenten o cocinen condicionará su bondad como portadores de folatos.

### **1.3.3.2 Productos del estrés oxidativo: Malondialdehído (MDA)**

Las EROs atacan los componentes celulares constituidos por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), residuos de fosfolípidos, que son sumamente sensibles a la oxidación. Una vez formados los radicales peróxidos pueden reorganizarse, por una reacción de ciclación a endoperóxidos, siendo el producto final el malondialdehído (MDA) (Rodrigo, 2009). Los ácidos grasos que con más frecuencia dan lugar a la



formación de MDA son el ácido Araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) (Barbosa et al, 2008).

El MDA reacciona rápidamente con grupos amino o con proteínas y otras biomoléculas. También forma compuestos con las bases del ADN que son mutagénicos y posiblemente carcinogénicos (Mallok et al., 2011).

El MDA es un subproducto de la lipoperoxidación, que puede medirse para dilucidar la cantidad de lipoperoxidación en una muestra de semen. Los niveles de MDA tienen correlación con la motilidad espermática y con el potencial para la fusión del espermatozoide con el oocito. Este ensayo es útil en la determinación de los niveles de EROs antes de someterse a procedimientos de TRA y para el diagnóstico de pacientes subfértiles. Algunos estudios han mostrado correlación negativa entre los niveles de MDA y otros parámetros espermáticos como la concentración. Los niveles más elevados de MDA se han encontrado en pacientes con varicocele (Tortolero et al., 2005; Agarwal et al., 2012a).

El MDA se ha utilizado en ensayos bioquímicos para monitorizar el grado de daño peroxidativo sufrido por los espermatozoides gracias a la excelente correlación con el grado de afectación de la función espermática. Elevados niveles de MDA seminal representan una elevada tasa de peroxidación lipídica, que disminuye la fertilidad (Atig et al., 2012b).

#### **1.3.4 Aspectos generales de los Metales y Elementos Traza y su relación con el estrés oxidativo en la infertilidad masculina**

Los diferentes Metales y Elementos Traza pueden tener distinto comportamiento referente al EO, puesto que pueden actuar como agentes con actividad antioxidante, conocida por ser cofactores o coenzimas de enzimas antioxidantes, y pueden actuar como agentes oxidantes por resultar tóxicos a cualquier nivel de concentración en el organismo, bien por su acción oxidante o bien por otros mecanismos. También algunos metales han demostrado que pueden actuar con ambos comportamientos pudiendo tener actividad tanto oxidante como antioxidante.

Respecto a las acciones oxidantes de los metales y elementos traza se incluyen múltiples mecanismos que pueden resumirse en:

- Metales cuyo mecanismo básico es la producción de EROs, por actuar como agentes catalíticos en la reacción de Fenton (Cr, Cu, Fe y V).
- Metales que no parecen generar radicales libres por sí mismos (Hg, Ni, y Cd), pero que sin embargo, su toxicidad está asociada a peroxidación lipídica, oxidación del ADN y niveles aumentados de peróxido de hidrógeno, entre otras evidencias de daño oxidativo.
- Mecanismos a través de un desplazamiento del Fe de sus sitios de unión y la subsiguiente redistribución, resultando en un aumento de las reacciones mediadas por Fe. Aún no está claro en qué medida el aumento de los procesos oxidativos se produce como un efecto directo de estos metales (Al, Cd y Ni) o indirectamente a través de desplazamientos de hierro inducidos por ellos.

Algunos autores defienden que los metales pesados tienen una gran capacidad para inducir el estrés oxidativo en las células puesto que provocan la desintegración de las membranas lipídicas, y los espermatozoides son bastante sensibles a ello. De ahí que consideren importante medir concentraciones de metales pesados en plasma seminal para determinar el daño espermático. También parece ser que numerosos antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E, el glutatión, la coenzima Q10, y algunas frutas ricas en antioxidantes pueden disminuir el estrés oxidativo causado por los metales pesados (Mínguez-Alarcón et al., 2012).

Pero actualmente existen al menos dos problemas en la evaluación del impacto que tienen las concentraciones de metales pesados sobre la calidad del semen humano. El primero es que hay pocos estudios publicados hasta el momento. El segundo problema se relaciona con la gran diversidad de las variables estudiadas, las muestras biológicas en las que se miden las concentraciones de los metales pesados, y los parámetros que se utilizan para valorar la calidad del semen (la motilidad, la morfología, y la concentración de espermatozoides) (Mínguez-Alarcón et al., 2012).

A continuación profundizamos en cada elemento de forma individual.

#### **1.3.4.1 Aluminio**

Uno de los principales efectos perjudiciales del Aluminio (Al) es su capacidad de desplazamiento del calcio en los sistemas biológicos, con los correspondientes efectos secundarios que esto pueda conllevar. Además, el Al se puede acumular en

distintos órganos y tejidos, sobre todo en pacientes con enfermedades renales, lo que produce una gran toxicidad.

Una elevada concentración de Al en espermatozoides y plasma seminal correlaciona con un descenso de la motilidad y de la morfología normal espermática (Hovatta et al., 1998; Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Las concentraciones de Al en el aire que respiramos son muy variables, con una media de 1 a 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . El Al del agua de consumo es una de las mayores fuentes de exposición a este metal. El Al está presente también, aunque en pequeñas cantidades, en todos los alimentos debido a su propio contenido natural, por el uso de aditivos o por la utilización de materiales de Al en recipientes y líneas de envasado (Cocho et al., 1998). También puede contener Al algunos fármacos antiácidos (López et al., 2008).

#### **1.3.4.2 Cadmio**

El Cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico para el organismo. Sus características toxicológicas derivan de su semejanza química con el Zn. El Cd es biopersistente y una vez absorbido por un organismo sigue siendo residente por muchos años, aunque se excreta eventualmente. Al igual que el Hg, no cumple función fisiológica conocida.

El Cd tiene efecto tóxico sobre muchos enzimas que contienen hierro como cofactor, uno de los cuales es el Cit P<sub>450</sub>. Las células de Leydig contienen 10 veces más Cit P<sub>450</sub> que las células de Sertoli, por ello son más sensibles al incremento de niveles de Cd. Como el Cit P<sub>450</sub> es necesario para el funcionamiento de la 17- $\alpha$ -hidroxilasa y 17, 20-liasa, su afectación interfiere en la estereoidogénesis testicular (Akinloye et al., 2006).

Parece que elevadas concentraciones de Cd en el plasma seminal afectan a la calidad del semen, con una disminución de la motilidad y la concentración de los espermatozoides (Alabi et al., 1985; Xu et al., 2003; Mínguez-Alarcón et al., 2012). Los elementos químicos que particularmente afectan a la iniciación y la duración de la reacción acrosomal son el Cd y el Pb. El impacto negativo del Cd sobre la fertilidad masculina consiste en su afinidad química a los canales de Ca de las membranas celulares, y en la disminución de la capacidad de los espermatozoides de sufrir la reacción acrosomal. El Cd puede cambiar la integridad de las membranas acrosomales de los espermatozoides y causar una reacción acrosomal anormal. Por otro lado, se cree que el cadmio disminuye también la fertilidad masculina por su unión

a la estructura de la cromatina del espermatozoide. Además, la incubación de espermatozoides con Cd causa un descenso de la concentración de Zn en el núcleo de los espermatozoides. También la acumulación de Cd en los espermatozoides causa una disminución significativa en los niveles de proteínas y un aumento de la actividad catalasa (Marzec-Wróblewska et al., 2012). En cambio, no hay todavía un acuerdo respecto de las repercusiones de las bajas concentraciones de Cd y el efecto sobre la calidad seminal (Mínguez-Alarcón et al., 2012).

La inhalación de Cd suele ser la vía de intoxicación más importante. Dado que tiene muchas aplicaciones en la industria, la forma más habitual de inhalar Cd se produce en el contexto laboral. En la población general, el humo de tabaco es la principal fuente de exposición tanto al cadmio como al plomo. Un cigarrillo contiene 1.5 µg de cadmio, además, se inhala una décima parte del contenido metálico de un cigarrillo (Akinloye et al., 2006; López et al., 2008).

#### **1.3.4.3 Cobalto**

El Cobalto (Co) es considerado un elemento esencial en el hombre. La única función conocida del Co, hasta ahora, es el de ser el centro activo de la vitamina B<sub>12</sub>.

La intoxicación generalmente ocurre por aspiración del polvo de cobalto en industrias siderúrgicas. Su toxicidad es relativamente baja en comparación con otros metales, sin embargo es tóxico y cancerígeno en concentraciones elevadas. Esto se debe a que el Co puede interferir en los procesos de reparación del ADN causándole directamente daños.

El Co está implicado en la generación de RL, su mecanismo de toxicidad inducido no está plenamente esclarecido, pero sí se conoce el proceso de generación de RL mediado por el Co, que contribuye a su toxicidad y carcinogenicidad.

#### **1.3.4.4 Cobre**

Es el tercer elemento de transición más abundante en el cuerpo humano. El Cobre (Cu) es un metal esencial necesario para el funcionamiento del organismo (Calvo et al., 2013).

El Cu es un elemento importante para numerosas metaloenzimas y metaloproteínas, como la superóxido dismutasa (SOD), citocromo oxidasa, lisina oxidasa, la dopamina-

$\beta$ -hidroxilasa, y la ceruloplasmina, las cuales están implicadas en el metabolismo energético o antioxidante (Aydemir, 2006), y por tanto, previene los efectos deletéreos de las EROs sobre los espermatozoides (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

El cobre, así como el hierro, pueden promover la formación de EROs, catalizando la reacción entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, que produce el radical hidroxilo. Además, el Cu puede unirse directamente a los tioles libres de las cisteínas, conduciendo a la oxidación y uniones cruzadas entre proteínas, y por tanto inactivando enzimas o dañando las estructuras de las proteínas. El elemento traza Cu en su forma iónica es tóxico para distintas células, incluyendo los espermatozoides humanos (Aydemir, 2006).

Es decir, el cobre tiene un comportamiento ambiguo, algunos autores afirman que la deficiencia de cobre causa una disminución en la fertilidad. Varios estudios han señalado la existencia de correlación positiva entre la concentración de Cu en sangre, la concentración de espermatozoides en el eyaculado, y el recuento de espermatozoides con motilidad progresiva. Asimismo, hallan correlación positiva entre la concentración de Cu en el plasma seminal y el volumen del eyaculado, la motilidad espermática y el número de espermatozoides con motilidad progresiva (Marzec-Wróblewska et al., 2012). En cambio, otros defienden que el cobre también puede tener un impacto negativo sobre la morfología y la motilidad espermática (Marzec-Wróblewska et al., 2012), o que puede actuar sobre los receptores de FSH, interfiriendo así en la espermatogénesis. Las alteraciones endocrinas principales afectan a la testosterona, la LH, y la secreción de FSH (Kruger et al., 2004).

La cantidad diaria aconsejada en adultos es 1,5 – 3,0 mg. Los alimentos ricos en cobre son las carnes rojas, las vísceras, los crustáceos, las semillas, las leguminosas, el salvado, el chocolate y los huevos (López et al., 2008).

#### **1.3.4.5 Cromo**

En los humanos y animales el Cromo (Cr) trivalente es un nutriente esencial que juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, y puede unirse a ácidos nucleicos (Kumar et al., 2005; Marzec-Wróblewska et al., 2012). El cromo es un componente importante de las enzimas. El Cr y las enzimas se estimulan mutuamente en sus actividades, el Cr favorece la acción de las enzimas y éstas

favorecen la influencia del Cr. La deficiencia de Cr ocurre en raras ocasiones (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

El Cr se considera un metal oxidante productor de RL. Algunos estudios han encontrado relación entre exposición a Cr y alteración en la morfología espermática (Kumar et al., 2005). Otros postulan que el Cr causa atrofia testicular y reduce el número y motilidad espermática (Aruldas et al., 2005; Pereira et al., 2005; Marzec-Wróblewska et al., 2012). Además el Cr afecta a las células germinales en el compartimento adluminal, e induce aberraciones cromosómicas.

Las personas expuestas a Cr tienen menos actividad específica testicular de SOD, catalasa, GPx, GR, G-6-PDH y  $\gamma$ -GT, pero aumenta la glutatión-S-transferasa (GST). También aumenta en ellas las concentraciones de glutatión reducido,  $H_2O_2$  y  $OH^-$ , en cambio disminuye la concentración de las vitaminas A, C y E.

La administración de vitamina C y E protege a los testículos de los efectos adversos del Cr.

La minería de cromo y las industrias que trabajan con cromo liberan este metal al medio ambiente. Los seres humanos pueden estar expuestos a elevadas dosis de Cr en determinadas situaciones ambientales y laborales. La principal vía de exposición es la inhalación (Kumar et al., 2005).

#### **1.3.4.6 Hierro**

El Hierro (Fe) es un metal de transición esencial para la vida puesto que participa prácticamente en todos los procesos de oxidación-reducción. Está presente en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, tales como las catalasas, peroxidasas y oxigenasas.

Generalmente, la función elemental del Fe en las células es la protección contra los productos tóxicos de las EROs. Tanto la función de absorción como la metabólica del Fe están relacionadas con la influencia sobre otros elementos químicos. En particular el Cd, Mn, Pb y el Zn tienen actividades antagonistas. Las interacciones con el Cu son complejas y con frecuencia sinérgicas durante su cooperación en procesos de oxidoreducción. Aunque el Fe y sus compuestos no sean tóxicos para el organismo, un exceso en su concentración puede causar un aumento en el daño del ADN de los

espermatozoides e influir negativamente sobre la morfología. El Fe participa en la formación de RL mediante la producción del radical  $\text{OH}^\cdot$  (reacción de Haber-Weiss) que posteriormente puede iniciar la oxidación de lípidos u otras moléculas, además las reacciones de estos RL pueden propagarse por descomposición de peróxidos (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Además en compartimentos tanto extracelulares como intracelulares, la unión de iones Fe y Cu a proteínas específicas previene cualquier forma de catálisis dependiente de metales, incluyendo el consumo de ascorbato. Sin embargo, en presencia de EROs, los metales pueden liberarse de las proteínas de unión, induciendo radicales reactivos y la oxidación de ascorbato (Aydemir, 2006).

Todo esto hace que el Fe desempeñe una función clave en la toxicidad mediada por metales, actuando tanto como oxidante, catalizando la producción de EROs, como antioxidante, formando parte de la catalasa.

#### **1.3.4.7 Manganeseo**

El Manganeseo (Mn) es un metal de transición con actividad redox esencial para el organismo que se encuentra en concentraciones traza, pero que su aumento produce toxicidad.

Su papel en el proceso de EO se debe a su presencia en distintas enzimas, destacando la superóxido dismutasa de manganeseo (Mn-SOD), que cataliza la dismutación de superóxidos,  $\text{O}_2^\cdot$ , y la Mn-catalasa, que cataliza la dismutación de peróxido de hidrógeno.

El manganeseo participa en varios procesos fisiológicos, sobre todo como activador de enzimas que regulan el metabolismo de la glucosa, hidratos de carbono, lípidos incluyendo el colesterol, y proteínas. El manganeseo no es por lo general el componente de estas enzimas. La función de este metal no es específica y puede ser sustituido por otros metales, sobre todo por el magnesio (Mg). El manganeseo intracelular se encuentra principalmente en las mitocondrias y unido al ADN y al ARN. La disminución de la fertilidad unida con la deficiencia de Mn es un efecto secundario de la afectación de la síntesis del colesterol y de los compuestos químicos relacionados que son necesarios para la síntesis de hormonas sexuales y otros esteroides (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Por otro lado el exceso de manganeso puede perjudicar al metabolismo de otros elementos químicos y limitar su biodisponibilidad. Una cantidad elevada de Mn, en muchas ocasiones, induce una deficiencia de Cu, P y Fe (Marzec-Wróblewska et al., 2012). Una exposición a manganeso causa signos de intoxicación en trabajadores y ocasiona daño reproductivo puesto que reduce la libido y produce un desequilibrio endocrino (Figà-Talamanca et al., 2001).

También se han relacionado niveles elevados de Mn con una disminución de la motilidad y de la concentración espermática (Marzec-Wróblewska et al., 2012). Sin embargo, otros informes demuestran que el plasma seminal con un elevado porcentaje de motilidad espermática contiene concentraciones elevadas de Zn y Mn en plasma (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

#### **1.3.4.8 Mercurio**

El Mercurio (Hg) es un metal tóxico para el organismo que no tiene ninguna función biológica conocida. Se une a las proteínas y produce una alteración difusa de la función celular, inhibición de la síntesis proteica, que puede dañar el ADN e interrumpir la división celular.

El mercurio puede interferir en la espermatogénesis y afectar al epidídimo (Queiroz et al., 2006). Hay evidencias de que elevadas concentraciones de Hg en sangre producen daño espermático, con una disminución de la motilidad, de la morfología normal y del recuento de los espermatozoides. En cambio, no se ha encontrado relación entre pequeñas concentraciones de Hg en plasma seminal con alteraciones en la calidad espermática (Alabi et al., 1985; Mínguez-Alarcón et al., 2012).

Las fuentes de exposición al mercurio son la laboral (minería del mercurio, industria clorocáustica, fábricas de termómetros y de pilas alcalinas), a través de empastes de amalgama y a través de la dieta por alimentos contaminados. En la mayor parte de los productos alimenticios el mercurio se encuentra en su forma inorgánica, excepto en el pescado y sus productos, que son la principal fuente de metilmercurio en la dieta, siendo en esta forma mucho más liposoluble y más tóxico.

La vía de entrada es pulmonar (inhalación) y a través de la piel para compuestos inorgánicos, siendo la vía oral la más importante para los compuestos orgánicos (López et al., 2008).



#### **1.3.4.9 Níquel**

El Níquel (Ni) es un micronutriente esencial que no tiene sus funciones bien establecidas ya que es difícil encontrar una deficiencia sin que se produzcan déficits de otros elementos, modificaciones de otros nutrientes o contaminaciones del propio metal.

El níquel es un activador de algunas enzimas (deshidrogenasas y carboxilasas). En elevadas concentraciones es dañino, causando por ejemplo cambios en los cromosomas y provocando citogénesis neoplásicas. El exceso de níquel influye en el metabolismo de otros metales, principalmente disminuyendo los niveles de Mg, Mn y de Zn en algunos órganos parenquimales. La deficiencia de níquel también puede tener un impacto negativo sobre la calidad del semen y de la espermatogénesis (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

#### **1.3.4.10 Plomo**

Parece estar claro que moderadas y elevadas concentraciones de Plomo (Pb) en sangre, causan problemas de fertilidad en humanos, con una disminución de la motilidad y morfología de los espermatozoides. La exposición al plomo inorgánico reduce el recuento espermático en niveles de exposición por encima de 40 µg/dL en sangre y posiblemente afecta a la fertilidad con concentraciones bastante más bajas (Bonde, 2010). Existe todavía controversia con pequeñas exposiciones al Pb y el efecto sobre la calidad seminal (Mínguez-Alarcón et al., 2012).

Las interacciones entre Pb y otros elementos químicos esenciales podrían interferir en el metabolismo de los elementos químicos necesarios para la salud y la calidad del semen. Incrementos en las concentraciones de Pb favorecen la excreción de Fe y Cu, y el aumento de los niveles de Cu en la dieta disminuye la absorción de Pb. La asociación entre Pb y Se conlleva un efecto secundario en la síntesis de selenoides insolubles que se acumulan en los riñones. Algunos autores también defienden que otro impacto negativo del Pb sobre la fertilidad masculina es su afinidad química a los canales de K, mientras otros observan un posible efecto perjudicial de Pb sobre la cromatina de los espermatozoides y la espermatogénesis. La alta exposición a Pb perjudica con más probabilidad a los espermatozoides por el aumento de la peroxidación lipídica (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Se cree que el Pb puede tener un impacto negativo sobre la fecundación *in vitro* (FIV), en los casos de infertilidad masculina idiopática en la que tiene lugar una inducción de la reacción acrosomal espontánea y prematura, cuando se encuentra Pb en el plasma seminal (Marzec-Wróblewska et al., 2012; Benoff et al., 2003).

Las vías de penetración de plomo son la respiratoria (vapores, humos y partículas del polvo), la oral (sobre todo marisco y agua) y la cutánea (Telisman et al., 2000). El Pb se encuentra en pinturas con plomo, en aguas que pasan por tuberías con plomo, en recipientes y utensilios de cocina con esmaltes plomados, en latas con soldaduras con plomo, en el tabaco y en las gasolinas, especialmente en las décadas pasadas. El plomo tiene también múltiples aplicaciones en la industria siendo una fuente de exposición laboral importante.

El consumo de alcohol también está relacionado con la intoxicación con Pb, debido a la contaminación de bebidas alcohólicas con este metal. Además se han encontrado evidencias de la posible interacción de Pb y alcohol en los humanos, es decir un aumento inducido por etanol de la fracción biológicamente activa o móvil de Pb acumulado en el cuerpo (Telisman et al., 2000).

#### **1.3.4.11 Selenio**

El Selenio (Se) es un elemento ultratraza esencial con interés nutricional y clínico. A pesar de ser el menos abundante, es potencialmente el más tóxico de los elementos esenciales.

El Se es un elemento necesario para el desarrollo testicular normal, para la espermatogénesis, la motilidad y para la función espermática. El Se puede proteger contra el daño oxidativo del ADN en los espermatozoides humanos. Sin embargo, no hay consenso sobre el mecanismo exacto por el cual el Se elimina el estrés oxidativo, para mejorar la fertilidad masculina y la calidad del semen. El papel del Se podría ser mediado vía selenoenzimas, como la GPx (Atig et al., 2012b).

El Se es uno de los antioxidantes del organismo al formar parte de la enzima glutatión peroxidasa, que previene la formación de radicales libres. Su función está relacionada con otros antioxidantes (vitaminas A, C y E). Además, interviene en el mantenimiento del estado redox intracelular (tioredoxina reductasa). Una disfunción de esta enzima conduce a la acumulación de hidroperóxidos, debido a que la enzima participa en la

eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgánicos, y se relaciona con multitud de síntomas asociados con el déficit de Se (López et al., 2008; Marzec-Wróblewska et al., 2012).

El Se es capaz de interactuar en el organismo con elementos tóxicos como el As, el Cd, el Hg, la Ag, el Pb y el Pt, y puede modificar su toxicidad. Algunos de los efectos beneficiosos que produce son prevenir el daño testicular y la teratogenicidad, contraponer los efectos inhibitorios del Hg y Cd sobre la motilidad espermática y el consumo de oxígeno a bajas concentraciones, pero no a elevadas. Todo esto ocurre a través de los compuestos de Se (Selenito, Selenocisteína, Selenometionina), y aunque no se conoce bien el proceso, se cree que es mediante mecanismos que involucran la formación de complejos Se: Cd o Se: Hg, y por su implicación en las selenoenzimas. El Se se encuentra como un residuo de seleno-cisteína en cada uno de los cuatro sitios catalíticos de la enzima GPx, la cual juega un papel crucial en la defensa antioxidante en el epidídimo y en los espermatozoides eyaculados (Cocho et al., 1998; Agarwal et al., 2011; Atig et al., 2012b; Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Los efectos del déficit de Se sobre los espermatozoides son: la pérdida importante de motilidad; la rotura a nivel de la pieza intermedia; y un aumento en la incidencia de anomalías morfológicas, sobre todo en la cabeza del espermatozoide. Una disminución de la concentración de Se en el plasma seminal de hombres estériles va acompañado por niveles aumentados de MDA seminal, por ello, la disminución de la actividad del Se como antioxidante puede explicar la elevada lípoperoxidación en pacientes estériles (Atig et al., 2012b).

La ingesta diaria de Se recomendada es entre 55 y 70 µg. El selenio se encuentra en las carnes, los pescados y los mariscos, la leche, los cereales, las nueces, las frutas y las verduras. La deficiencia de selenio es traducida en una disminución de la actividad de GPx y otras selenoenzimas, dejando a la célula expuesta al ataque oxidativo de las EROs, lo que ocasiona alteraciones, entre otras, en la reproducción (López et al., 2008; Córdova et al., 2009; Moslemi et al., 2011).

#### **1.3.4.12 Vanadio**

El Vanadio (V) es un mineral que se encuentra en la sangre, en los huesos y en los tejidos. Es un elemento esencial en algunos organismos, aunque en humanos no está demostrado que sea tan necesario. El V funciona como coenzima en numerosas

enzimas del metabolismo de los azúcares, lípidos y del colesterol, tiene propiedades insulino-miméticas y se ha demostrado que estimula la proliferación y diferenciación celular. Se cree también que regula las reacciones de fosforilación y desfosforilación a través del control de ATPasas, fosfatasas y adenilciclasas, lo que tiene amplios efectos en las funciones celulares. Sin embargo, no se ha demostrado todavía que el vanadio sea un activador o inhibidor específico de alguna enzima en humanos. La carencia de V no se ha descrito en humanos.

Algunos estudios basados en la administración de metavanadato en ratas, demostraron un cambio en el epitelio espermato-génico, lo que sugiere efectos tóxicos gonadales y teratogénicos (Cocho et al., 1998).

La concentración de V en el aire ambiental varía considerablemente según la zona donde nos encontremos, siguiendo un orden ascendente: áreas rurales remotas (<1 ng/m<sup>3</sup>), aire urbano (0,25 a 300 ng/m<sup>3</sup>), grandes ciudades (20-100 ng/m<sup>3</sup>) y, cerca de industrias metalúrgicas (1 µg/m<sup>3</sup> aprox). Suponiendo una concentración media de 50 ng, puede entrar por el tracto respiratorio diariamente alrededor de 1 µg de V (Cocho et al., 1998).

La exposición en la industria ocurre con la liberación de partículas de polvo durante la explotación de las minas y el procesamiento del mineral, la limpieza y mantenimiento de hornos y calderas, el uso en industrias químicas y la utilización durante la manufactura de aceros y aleaciones. Además, también puede ingerirse a través de la alimentación, particularmente ricos en V son las setas, el perejil, el eneldo, y la pimienta negra (Cocho et al., 1998).

#### **1.3.4.13 Zinc**

Es el segundo elemento traza más abundante en el organismo después del hierro. El Zinc (Zn) constituye un metal esencial para el organismo contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la membrana celular y en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunológico. Es un mineral extraordinariamente versátil que forma parte de 300 metaloenzimas, entre ellas la sorbitol deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa, que son las enzimas más importantes que intervienen en la espermatogénesis. El zinc, como componente y activador de diversas enzimas, también juega un papel importante en el metabolismo de las proteínas e hidratos de

carbono, y probablemente de los lípidos (FAO and WHO, 2001; Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Por otro lado, el Zn tiene acción antioxidante porque inhibe la fosfolipasa impidiendo la oxidación; reduce la formación de radicales hidroxilo, a partir del peróxido de hidrógeno, mediante la competencia con los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^+$  que participan en la reacción de Fenton; disminuye la susceptibilidad de los grupos sulfidrilos de las proteínas a la oxidación; y, finalmente, desencadena la inducción de metalotioneína tras una prolongada exposición al Zn (Córdova et al., 2009).

El Zn se encuentra en elevadas concentraciones tanto en el tracto reproductivo masculino como en el semen, ya sea en los espermatozoides como en el plasma seminal, donde su concentración es bastante más alta que en otros fluidos del cuerpo (Marzec-Wróblewska et al., 2012). El Zn es muy importante en las funciones de la próstata, epidídimo y testículos. En la próstata se alcanza la mayor concentración de Zn en el organismo, su nivel se incrementa con la edad, simultáneamente al descenso que experimenta en los testículos (Cocho et al., 1998). Además se ha demostrado que influye en el proceso de espermatogénesis: controla la motilidad, estabiliza la membrana, preserva la habilidad de la cromatina nuclear espermática para la descondensación, y modula funciones espermáticas.

El Zn es uno de los factores primarios que intervienen en la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la síntesis de proteínas, los cuales son parte fundamental del desarrollo espermático. El Zn puede prevenir la oxidación uniéndose a grupos sulfidrilos de las proteínas y ocupando sitios de unión para el cobre en los lípidos y ADN (Atig et al., 2012b).

El zinc, en los espermatozoides inmaduros, se localiza principalmente en las fibras externas densas del flagelo, donde se encuentran los grupos sulfidrilos de cisteína. La mayor parte de su contenido se reduce durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, que conlleva un aumento en la estabilización de las proteínas de las fibras externas densas, debido a la oxidación de los grupos sulfidrilos a puentes disulfuro. Parece ser que esta estabilización de proteínas de las fibras externas densas es un paso esencial para la generación de la motilidad espermática, especialmente para la motilidad progresiva (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

El Zn también tiene un papel regulador en la capacitación y la reacción acrosómica de los espermatozoides, y es indispensable para la concepción y la implantación embrionaria. Varios estudios defienden que la concentración de zinc seminal correlaciona con la concentración espermática, y que un aporte nutricional pobre de zinc es un factor de riesgo importante para una baja calidad espermática y para la infertilidad idiopática masculina, ya que compromete el mecanismo reparador del ADN, y provoca que las células espermáticas sean más susceptibles al estrés oxidativo. Por otra parte, otros estudios no han encontrado ninguna relación significativa entre el zinc y los parámetros de calidad de semen (Colagar et al., 2009; Liu et al., 2010).

El Zn junto con el Mg estabiliza las membranas celulares, junto con el Fe participa en los procesos de oxidación y reducción, y junto con el Cu previene los efectos deletéreos de las EROs sobre los espermatozoides como cofactores de la Cu-Zn superóxido dismutasa (Atig et al., 2012b; Marzec-Wróblewska et al., 2012).

La capacidad antioxidante del Zn seminal supone diversos beneficios en los espermatozoides incluyendo la reducción de MDA y disminuyendo de fragmentación de ADN (Atig et al., 2012b).

La hipozinkemia puede causar displasia de la glándula sexual, la detención del desarrollo de testículo, hipogonadismo, atrofia de los túbulos seminíferos y puede conducir a cambios degenerativos en los espermatozoides después de la división meiótica. Además, el zinc tiene actividad antibacteriana en el plasma seminal y propiedades de antiperoxidación lipídica, que mantienen estable la membrana espermática (Colagar et al., 2009; Liu et al., 2010; Marzec-Wróblewska et al., 2012). Estudios recientes refieren que la ingesta insuficiente de Zn perjudica las defensas antioxidantes, lo que puede ser un factor de riesgo importante para la liberación de oxidantes y, por tanto, pueden hacer al espermatozoide más susceptible a la lipoperoxidación (Atig et al., 2012b).

La ingesta de Zn diaria recomendada (IDR) para la población española es de 15 mg. Se encuentra presente en gran número de alimentos, fundamentalmente unido a proteínas, siendo las carnes rojas, el pescado y las leguminosas buenas fuentes de este elemento (FAO and WHO, 2001; López et al., 2008). Las ostras son especialmente ricas en zinc. La deficiencia de zinc aparece en personas con dietas pobres en proteínas de origen animal y ricas en fibras y fitatos (vegetarianos), con

procesos de malabsorción, con nutrición parenteral, en alcohólicos, en personas con quemaduras importantes o sometidas a cirugía (López et al., 2008).

## 1.4 Factores de riesgo asociados a la infertilidad masculina

En nuestra legislación existe una clasificación de sustancias formalmente tóxicas para la reproducción humana “Real Decreto 363/1995” del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene, dependiente del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. En él se recogen dos grupos de sustancias:

- Tóxicos para el desarrollo, de efectos embriotrópicos, capaces de afectar a la descendencia desde el momento de la concepción y/o que se transmiten al embrión por vía placentaria.
- Tóxicos para la fertilidad, de efectos gonadotrópicos que en exposiciones previas a la concepción pueden alterar la fertilidad masculina y femenina.

Por otra parte, existe otro grupo de tóxicos, el de los mutágenos, que afectan también a la reproducción, puesto que sus efectos son transmitidos a la descendencia o condicionan su viabilidad.

Parece aconsejable centrar la atención en los dos últimos apartados: los denominados tóxicos para la fertilidad y los mutágenos, por ser los más directamente implicados en la salud reproductiva humana (Matorras et al., 2007).

Algunos de los agentes tóxicos y hábitos de vida con potencial efecto reproductivo adverso conocido se han comentado previamente y son (Matorras et al., 2007):

- Tóxicos químicos.
- Tóxicos físicos.
- Hábitos de vida.

Se considera que estos tóxicos tienen relación con la infertilidad porque ejercen su acción sobre:

- Las gónadas alterando su normal funcionamiento.
- Los gametos alterando la información hereditaria.
- El sistema endocrino comportándose como disruptores endocrinos.

Los cuadros patológicos derivados de su acción pueden manifestarse como alteraciones de (Matorras et al., 2007):

- La libido.
- Comportamiento sexual.
- Función endocrina.
- Fecundación.
- Espermatogénesis.
- Duración de la vida reproductiva.

Desde un punto de vista toxicológico se piensa que la espermatogénesis es vulnerable a los tóxicos reproductivos debido al gran número de divisiones celulares continuas, a la diferenciación celular de los espermatozoides y a los procesos de maduración (Bonde, 2010).

La línea germinal masculina es uno de los tejidos más sensibles a los efectos perjudiciales de un gran número de tóxicos conocidos. Hasta ahora las exposiciones laborales son los mayores factores de riesgo documentados para el daño de la función reproductiva masculina e incluyen: exposiciones físicas (calor radiante, radiación ionizante, radiación electromagnética de alta frecuencia); exposiciones químicas (solventes, pesticidas, metales pesados, bromocloropropanos (BCPs)); y procesos de trabajo como la soldadura metálica. Las mejoras en las condiciones de trabajo en países emergentes han disminuido dramáticamente las exposiciones peligrosas conocidas en el lugar de trabajo, pero los millones de trabajadores en países menos emergentes se encuentran en peligro ante tóxicos que afectan al aparato reproductor.

Nuevos datos muestran que la exposición ambiental de bajo nivel a agentes contaminantes biopersistentes en la dieta plantea un riesgo para la población de todo el mundo. Para otros tóxicos sólo hay pruebas sugestivas y es necesario realizar más estudios antes de formular conclusiones. Finalmente, hay datos que indican una vulnerabilidad particular del testículo fetal a los tóxicos del humo del tabaco durante la maternidad. En este momento la toxicidad reproductiva masculina debería ser afrontada desde puntos de vista completamente nuevos, incluyendo las exposiciones en periodos de vida muy tempranos (Bonde, 2010).

Todos los factores de riesgo anteriormente nombrados parecen tener un efecto negativo sobre la fertilidad, aunque también depende de la capacidad reproductora de cada hombre o mujer. Todos estos factores negativos son mucho más acusados

---



cuanto más añosa sea la persona. La mayoría de ellos se han relacionado con el estrés oxidativo, aunque con resultados todavía contradictorios, como se tratará de explicar más adelante al enjuiciar los resultados del estudio de laboratorio en el apartado Discusión.

Por último, se puede afirmar que en el momento actual, para la mayoría de estas sustancias, no existe un nivel de evidencia claro acerca de su repercusión en la reproducción. Ello se debe a la dificultad de realizar estudios controlados, randomizados, sin sesgo, en los que se tenga en cuenta el tipo de tóxico, el tiempo y el momento de exposición para determinar la actividad tóxica y sus efectos en las diferentes partes del organismo (Matorras et al., 2007).

## 1.5 Justificación del estudio

A pesar de que el factor masculino es el responsable en la mitad de los casos de parejas estériles, no se puede hallar ninguna causa identificable de infertilidad en más del 25% de los varones estériles (Agarwal et al., 2005a; Alonso et al., 2008).

En la literatura existe un número considerable de artículos que relaciona el estrés oxidativo con la infertilidad masculina y se ha vinculado a exposiciones ambientales y tóxicas constantes (Baker et al., 2004; Mínguez-Alarcón et al., 2012). De hecho, distintos estudios señalan al estrés oxidativo, inducido por tóxicos ambientales, como uno de los principales factores que contribuye a la infertilidad masculina (Wong et al., 2011).

También parece que están bien establecidas las posibles causas de la generación de estrés oxidativo, el mecanismo general por el cual afecta a la calidad seminal y los agentes implicados, sin embargo, todavía no existe unanimidad en la relación entre los distintos marcadores de estrés oxidativo con cada uno de los parámetros seminales, es más, se han encontrado resultados contradictorios, sobre todo en el caso de los metales pesados (Barber et al., 2005; Shinohara et al., 2005; Marzec-Wróblewska et al., 2012). De igual manera, tampoco se ha llegado a un consenso sobre la relación de algunos factores de riesgo con el estrés oxidativo y su repercusión en la infertilidad masculina.

Por otra parte, no existe un protocolo estándar para evaluar los oxidantes seminales, ni se ha establecido ningún acuerdo para la inclusión de un análisis de EO como parte del estudio rutinario diagnóstico de varones estériles (Agarwal et al., 2005b; Lipshultz et al., 2009).

Ante esta situación, nos planteamos por un lado estudiar la relación entre los distintos factores oxidantes y antioxidantes con la calidad del semen, y por otro, determinar los valores predictivos de estos parámetros de estrés oxidativo, y así poder establecer un protocolo de actuación clínica. Por último, pretendemos analizar los datos sociodemográficos y clínicos de los sujetos a estudio para tratar de encontrar asociaciones entre aspectos tales como el estilo de vida, los hábitos o las condiciones ambientales, con el estatus oxidativo presente en el plasma seminal, y, finalmente, su repercusión en la calidad seminal.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

Universitat d'Alicant  
Universidad de Alicante



## 2.1 Hipótesis de trabajo

La esterilidad del varón podría ser la consecuencia de la presencia de estrés oxidativo en el semen, lo que determinaría la aparición de resultados alterados en el seminograma, la disminución del rendimiento de las técnicas de capacitación del semen, y ser el responsable de la presencia de daños en los componentes esenciales del espermatozoide, que afectarían a su funcionalismo normal.

La determinación de marcadores de estrés oxidativo en el plasma seminal puede suministrarnos información adicional sobre la calidad de los sémenes y conducirnos a proponer estrategias dietéticas y/o terapéuticas, que puedan permitir la consecución de gestaciones sin precisar técnicas de reproducción de mayor complejidad o mejorar los resultados de éstas.

## 2.2 Objetivos Generales y Específicos

### Objetivo General

Determinar si la presencia del estrés oxidativo, evaluado a través de la concentración de oxidantes y antioxidantes en plasma seminal de varones que acuden a la Consulta Externa de Reproducción del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Universitario de Elche, afecta la calidad seminal, valorada a través de la realización del seminograma, así como el rendimiento de las técnicas de capacitación espermática y el daño en componentes esenciales del espermatozoide.

Asimismo, determinar qué variables socio-demográficas y clínicas se asocian con la presencia de estrés oxidativo en plasma seminal y, como consecuencia, su posible repercusión en la calidad seminal.

### Objetivos Específicos

1. Optimizar los métodos de análisis de los diferentes marcadores de estrés oxidativo para la muestra de plasma seminal y evaluar sus prestaciones analíticas para los objetivos propuestos.

2. Determinar la concentración de Metales y Elementos Traza relacionados con el estrés oxidativo en el plasma seminal: Cu, Fe, Zn, Mn, Se, Al, Hg, Co, Cr, Cd, V, Pb y Ni.
  
3. Determinar la concentración de marcadores antioxidantes en el plasma seminal: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, y las vitaminas B<sub>12</sub>, C, y folato.
  
4. Comparar el estatus oxidativo en plasma seminal, medido a través de los marcadores previamente mencionados, con:
  - a) La calidad del seminograma de acuerdo a los criterios de la OMS 1999.
  
  - b) Los valores de capacitación espermática entre los varones que presentan un recuento de espermatozoides móviles (REM)  $\geq 10 \times 10^6$  y por tanto candidatos a inseminación artificial conyugal (IAC), y aquellos con valores REM  $< 10 \times 10^6$ .
  
  - c) La presencia de daño en los componentes esenciales del semen, evaluado a través de la determinación de MDA, marcador de peroxidación lipídica.
  
5. Determinar qué variables se asocian con el estatus oxidativo en plasma seminal: variables socio-demográficas y clínicas recogidas por un Cuestionario *ad hoc* cumplimentado por el donante (estilo de vida, hábitos y profesión).
  
6. Determinar el valor diagnóstico predictivo de la presencia de los distintos parámetros del estrés oxidativo evaluados, con la determinación de sus valores de referencia y sus determinantes.
  
7. En función de los resultados obtenidos, elaborar un protocolo estándar para el estudio del estrés oxidativo en plasma seminal adecuado al laboratorio de Andrología asistencial.









## **SUJETOS A ESTUDIO**

---

Universitat d'Alicant  
Universidad de Alicante



Los sujetos a estudio fueron varones que acudieron a la Consulta Externa de Reproducción del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Universitario de Elche durante los años 2008 y 2009. Todos ellos se incluyeron dentro de los protocolos de estudio de la pareja, con el fin de encontrar la causa de la posible infertilidad de uno de los miembros de la pareja o de ambos y, en caso necesario, someterse a técnicas de reproducción asistida.

### **3.1 Selección de los Sujetos a estudio**

A los varones que acudían a la Consulta Externa de Reproducción de Ginecología y Obstetricia se les solicitó una batería de pruebas analíticas para descartar posibles causas de infertilidad, al margen de la calidad seminal. Dichas pruebas incluyen, además del estudio de la muestra de semen, la realización de determinaciones hormonales en sangre (FSH [Hormona foliculoestimulante], LH [Hormona luteinizante] y testosterona), cultivo microbiológico del semen y estudio del cariotipo en sangre periférica.

La principal prueba de laboratorio fue el estudio del seminograma y de la capacitación espermática. Para ello, el ginecólogo facilitó a los sujetos una Hoja de Petición de Seminograma (Anexo I) y las Instrucciones de recogida de la muestra de semen (Anexo II), y fueron remitidos al Laboratorio de Andrología del Servicio de Análisis Clínicos. Los varones fueron citados para el estudio y se les facilitó un recipiente estéril adecuado para la obtención y traslado del semen al laboratorio (contenedor de plástico de 100 mL de boca ancha).

El día acordado con los pacientes, a primera hora de la mañana, recogieron el semen por masturbación en el contenedor limpio y estéril facilitado desde el Servicio de Análisis Clínicos, y acudieron a entregarlo al Laboratorio de Andrología de 9:30 a 10:00 de la mañana. Se tuvo especial cuidado de que no transcurrieran más de 45 minutos entre la obtención de la muestra y su presentación en el laboratorio. Para facilitar el cumplimiento de este requisito horario se indicó a los pacientes, en el caso de no poder obtener la muestra en su domicilio, la ubicación de los aseos del Hospital más próximos al lugar de presentación del semen, donde podían realizar la recogida de la muestra.

Para garantizar la confidencialidad e intimidad del paciente, se les hizo pasar de uno en uno al Laboratorio de Andrología para la entrega de la muestra. Los varones, además, debían adjuntar la Hoja de Petición de Seminograma del ginecólogo correctamente cumplimentada y etiquetas identificativas, tanto suyas como de sus parejas, con sus datos demográficos (nombre y apellidos, fecha de nacimiento, número de historia, SIP, teléfono y dirección). Con toda la documentación recogida, nos asegurábamos de que se habían cumplido todas las condiciones pre-analíticas incluidas en las Instrucciones de Recogida de la muestra de semen, comenzábamos una Hoja de Trabajo para cada paciente (Anexo III) y, por último, identificamos las hojas o formularios y las muestras con un número interno del laboratorio, de esta manera quedaba registrada la muestra.

En la Hoja de Trabajo figuraban los datos necesarios para poder comenzar con el estudio del semen. Esta información se completaba mediante una entrevista con el paciente. Datos y documentación recogida:

- Etiquetas del paciente y su pareja con los datos personales (nombre, número de historia...).
- Pegatina numérica de identificación de la muestra correspondiente (nº de laboratorio).
- Fecha.
- Hora de obtención de la muestra o de eyaculación.
- Hora de presentación de la muestra en el laboratorio.
- Días de abstinencia sexual.
- Confirmación de que ha recogido todo el semen de la eyaculación.
- Enfermedad o fiebre mayor de 38°C en los últimos 3 meses. En caso afirmativo la muestra no era válida (las altas temperaturas pueden afectar a los espermatozoides en cualquiera de las fases previas a la eyaculación, periodo que dura aproximadamente 70-86 días).
- Ingesta de fármacos en los últimos 3 meses, información que debe aparecer en el informe de resultados final. Hay determinados fármacos que afectan de distinta manera a la calidad del semen (antidepresivos, antiulcerosos, antiepilépticos, corticoides...).

Tras la aceptación y recepción de las muestras de semen y los formularios correspondientes por el personal de enfermería del Servicio de Análisis Clínicos, a los pacientes se les explicó en qué consistía el presente estudio y la posibilidad de formar parte de él. Para ello, se hizo hincapié en que su participación era totalmente voluntaria y anónima, que su decisión no iba a condicionar la asistencia sanitaria que necesitaba y que, sólo en el caso de que existiera un excedente de semen tras la realización de los análisis solicitados, se emplearía la muestra para la investigación que se le proponía.

En caso de que aceptaran colaborar se incorporaban consecutivamente al estudio sin ningún tipo de sesgo, y se les realizaba en ese momento el Cuestionario Sociodemográfico y Clínico ya mencionado (Anexo IV). Para ello, se aislaba al paciente en una zona del laboratorio tratando de mantener su confidencialidad, se le explicaba que previamente debía firmar un documento de Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras de semen (Anexo V), para poder utilizar su muestra con fines de investigación, y se le puntualizaba que en cualquier momento podía revocar su autorización. A continuación se le entregaba el Cuestionario Sociodemográfico y Clínico, se le explicaba que, aunque eran pocas preguntas y éstas eran sencillas, permaneceríamos próximos a él por si tenía cualquier duda o requería alguna aclaración. El Cuestionario consta de 4 apartados:

- Datos Clínicos: número de años tratando de concebir, si ha tenido descendencia anteriormente, índice de masa corporal, enfermedades e ingesta de fármacos.
- Hábitos de vida: déficits dietéticos, consumo de tóxicos (fármacos, tabaco, alcohol y drogas) y ejercicio físico.
- Datos sociodemográficos: raza, país de nacimiento y profesión.
- Datos ambientales: lugar de residencia y contacto con tóxicos.

Una vez firmado el documento de Consentimiento Informado y cumplimentado el Cuestionario, se archivaban, y la muestra de semen se conservaba a temperatura ambiente hasta su análisis de rutina.

A todos los sujetos que aceptaron participar voluntariamente en el estudio se les aplicaron los criterios de inclusión/exclusión que se describen a continuación.

### 3.1.1 Criterios de inclusión de Sujetos

Se incluyeron todos aquellos sujetos que no habiendo tenido descendencia con su pareja actual en al menos los dos años previos, fueron remitidos por el Servicio de Ginecología y Obstetricia al Laboratorio de Andrología del Servicio de Análisis Clínicos para el estudio y análisis del semen.

Los pacientes se registraron en el estudio de forma consecutiva, una vez comprobado que cumplían las exigencias de recogida de muestras de semen facilitadas por el Servicio de Análisis Clínicos, exigencias acordes a las condiciones preanalíticas recomendadas por la OMS en 1999 (WHO,1999).

Los aspectos que se incluyen dentro de las instrucciones para la correcta recogida de muestras de semen son los siguientes:

- Tiempo de abstinencia sexual (3-5 días).
- Ausencia de procesos febriles en los 3 últimos meses.
- Eyaculado completo y recogido sin pérdidas.
- Aseo previo de la zona genital: lavarse el pene con jabón y aclararse abundantemente con agua para evitar restos de jabón. No se debe aplicar ningún tipo de pomada.
- Obtención y traslado del semen en las condiciones adecuadas:
  - Recoger la muestra por masturbación sin usar lubricante artificial y en un recipiente estéril de boca ancha. Las muestras resultado de un coitus interruptus no son aceptables y tampoco si se han utilizado preservativos.
  - Que no hayan transcurrido más de 45 minutos entre la recogida y su entrega al laboratorio.
  - No someterla a temperaturas extremas. Se recomienda que lo transporten guardándolo en un bolsillo en contacto con la temperatura corporal.

Además de todo lo anteriormente expuesto, y dada la limitación de volumen de los especímenes a analizar, sólo se incluyeron en el estudio aquellos sujetos con muestra suficiente de semen para llevar a cabo las determinaciones de investigación del laboratorio, tras el estudio del semen requerido para la asistencia sanitaria.

### 3.1.2 Criterios de exclusión de Sujetos

Se excluyeron aquellos sujetos que:

- Habían sido sometidos a cirugía genital en los últimos meses.
- Habían sufrido infecciones genito-urinarias en los últimos 3 meses.

## 3.2 Establecimiento de grupos de varones en atención a sus características seminales

De los 181 sujetos incluidos en el estudio ninguno cumplía los criterios de normalidad de la OMS simultáneamente para todos los parámetros del seminograma, por ello dividimos a los sujetos en dos grupos en función de aquellos parámetros más representativos de la calidad seminal. Uno de los grupos fue considerado el “grupo de referencia” y al otro se le denominó “grupo a estudio” según lo expuesto a continuación:

- Grupo de referencia: sujetos cuyas características seminales cumplen simultáneamente los siguientes criterios de normalidad de la OMS:
  - $\text{pH} \geq 7,2$ .
  - Concentración de espermatozoides  $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ .
  - Motilidad progresiva (rápidos + lentos)  $\geq 50\%$ .
  - Índice de teratozoospermia (ITZ)  $< 1,6$ .
- Grupo a estudio: sujetos que no cumplen simultáneamente los criterios de normalidad de la OMS anteriormente expuestos.

En cuanto a la capacitación espermática o capacidad de fertilización del ovocito “*in vitro*”, se estableció como punto de corte para la clasificación de los sujetos un REM  $\geq 10 \times 10^6$ , es decir, cuando se pueden recuperar más de  $10 \times 10^6$  de espermatozoides móviles tras aplicar las técnicas de capacitación, ya que en el H.G.U. Elx se considera que un semen presenta condiciones para la inseminación artificial conyugal (IAC) cuando supera esta cifra.

No disponemos de datos en la literatura científica revisada sobre una cifra concreta de malondialdehído (MDA) en plasma seminal que nos permita establecer la presencia de estrés oxidativo a través de la existencia de peroxidaciones en las estructuras lipídicas seminales. Por ello, definiremos una concentración límite para esta magnitud y la



obtendremos en función de nuestros resultados analíticos y de los grupos de sujetos definidos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

---

## **MÉTODOS**



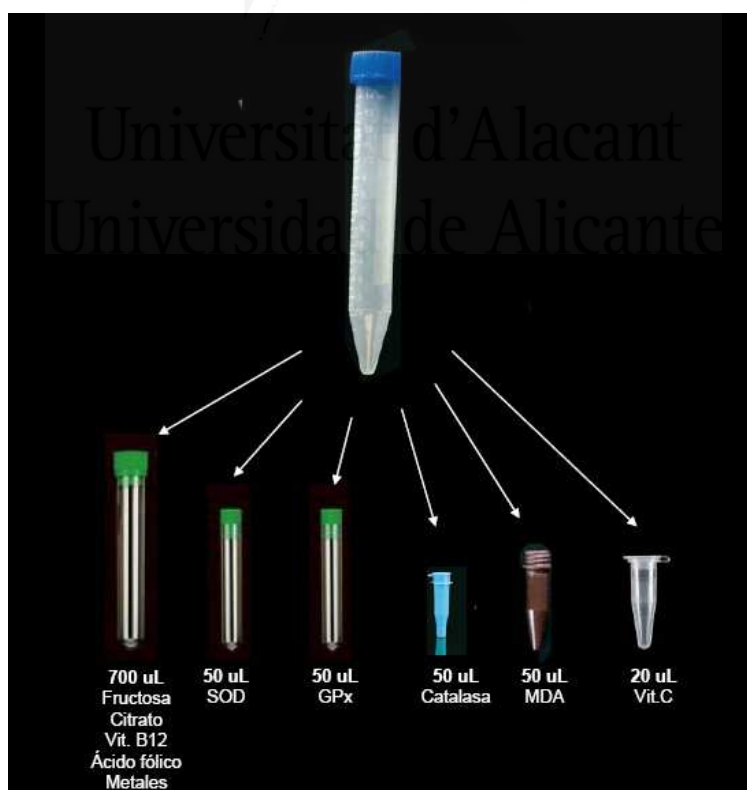
## 4.1 Recogida de las muestras de semen

Las muestras de semen de los varones participantes en el estudio se procesaron inicialmente como cualquier otra muestra de rutina para el estudio básico del semen. Una vez finalizado, con el resto de la muestra se procedió a la separación del plasma seminal de las células por centrifugación (3000 rpm, temperatura ambiente, 10 min.), preparando alícuotas para las diferentes determinaciones y realizando su almacenamiento en las condiciones adecuadas hasta el momento del procesamiento.

En total realizamos 6 alícuotas distribuidas de la siguiente manera:

- 700  $\mu$ L de plasma seminal para las determinaciones bioquímicas (fructosa y citrato), vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico y, por último, la determinación de los Metales y Elementos Traza.
- Alícuotas de 50  $\mu$ L para las siguientes determinaciones: SOD, GPx, catalasa y MDA.
- 20  $\mu$ L para la vitamina C.

Figura 18. Esquema de las alícuotas realizadas en el estudio.



La conservación de las distintas alícuotas se realizó por congelación en armarios congeladores del Servicio de Análisis Clínicos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis y la duración del almacenamiento varió en función de la estabilidad de cada una de las determinaciones (mensual para enzimas, MDA y vitamina C; trimestral para el resto de determinaciones), evitando descongelaciones innecesarias, siempre procurando garantizar su correcta conservación. Las alícuotas que debían ser remitidas al laboratorio externo para la determinación de Metales y Elementos Traza (Laboratorio Labaqua) fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta completar la totalidad de las muestras de la investigación.

## 4.2 Análisis básico del semen y de la capacitación espermática

### 4.2.1 Estudio macroscópico

El análisis comienza con el estudio de los caracteres físicos de la muestra de semen. A continuación se describen, secuencialmente y por orden, las evaluaciones y mediciones que se realizan a una muestra de semen, siguiendo siempre las indicaciones y criterios de la OMS de 1999 (WHO, 1999).

En el contenedor de plástico de 100 mL de boca ancha se evalúan los siguientes parámetros macroscópicos:

Licuefacción: tras la eyaculación el semen normal coagula y, posteriormente, en 5-60 minutos se licua. En caso de tardar más tiempo su licuefacción se considera retardada. La licuefacción completa se comprueba observando si la muestra está homogénea, en caso contrario trataremos de conseguirlo para poder continuar con el estudio del semen. Para ello, aspiramos y dejamos caer la muestra con la pipeta tantas veces como sea necesario para conseguir fluidificarlo antes de pasarlo al tubo (licuefacción mecánica).

Consistencia (Viscosidad): si el líquido seminal es muy viscoso puede dificultar el movimiento de progresión de los espermatozoides por el efecto físico de la densidad. Por otra parte, una viscosidad elevada puede interferir con la determinación de la motilidad y la concentración de espermatozoides, y con las pruebas para la detección de anticuerpos unidos a la superficie de los espermatozoides. La viscosidad de la muestra se evalúa estimando la rapidez con que sale el semen de la pipeta Pasteur de

plástico. Para ello, llenamos una pipeta con semen y permitimos la libre caída de las gotas de nuevo en el contenedor. Observamos la longitud del filamento formado, se considera “consistencia normal” cuando las gotas son pequeñas y bien definidas. Si las gotas forman filamentos cuya longitud es mayor de 2 cm, anotamos “consistencia aumentada” en la Hoja de Trabajo.

Una vez se ha trasvasado el semen a un tubo de ensayo de propileno de fondo cónico graduado, evaluamos:

Aspecto: un eyaculado normal tiene un aspecto homogéneo, gris opalescente. Puede aparecer menos opaco cuando la concentración de espermatozoides es muy baja, marrón cuando contiene glóbulos rojos, o amarillento en el caso de un paciente con ictericia o que consume algunas vitaminas. Cualquier aspecto fuera de lo normal debe ser anotado en la Hoja de Trabajo.

Volumen: refleja la actividad secretora de las glándulas sexuales masculinas (WHO, 2010). El volumen de eyaculado normal oscila entre 2 y 5,5 mL en las condiciones estándar de abstinencia. Un volumen inferior a 2 mL se denomina hipospermia y puede corresponder a una eyaculación incompleta o retrógrada, una disfunción glandular (vesículas seminales) o una obstrucción de los conductos genitales. Si el volumen del eyaculado es superior a 6 mL se denomina hiperespermia y puede ser provocado por un excesivo tiempo de abstinencia sexual o por hipertrofia o inflamación activa de las vesículas seminales. El volumen se mide decantando todo el eyaculado en un tubo de ensayo de propileno de fondo cónico con tapón de 10 mL graduado, tras la licuefacción (espontánea o mecánica).

pH: el pH, determinado principalmente por la secreción de las vesículas seminales, protege a los espermatozoides neutralizando el pH ácido de las secreciones prostáticas, así como del aparato genital femenino. El pH normal oscila entre 7,2 y 8,0. Un pH ácido indica una ausencia de secreción de las vesículas seminales o algún proceso infeccioso. Un pH alcalino señala una disminución de la secreción prostática. La medición se realiza con tiras de pH básicas (6,5-10), por comparación con la escala cromática.

A continuación procedemos a preparar la extensión para la tinción de cada muestra de semen para el estudio morfológico. Se les coloca una pegatina de identificación y se dejan secar al aire mientras seguimos procesando la muestra.



## 4.2.2 Estudio microscópico

### 4.2.2.1 Recuento de espermatozoides y de movilidad espermática

El recuento total de espermatozoides refleja la producción de espermatozoides por los testículos y evidencia el funcionamiento de los conductos post-testiculares (WHO, 2010).

En la valoración de la movilidad espermática hay un aspecto cuantitativo, cuántos espermatozoides se mueven, y un aspecto cualitativo, cómo de rápidos son y si la movilidad es rectilínea o no.

El porcentaje de espermatozoides móviles deberá ser mayor del 50%, y tener movimiento rápido y lineal en al menos el 25%, o bien presentar un mínimo de un 50% de espermatozoides con movilidad progresiva, es decir, con un movimiento de avance lineal de al menos 5  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . Una baja proporción de espermatozoides móviles es conocida como astenozoospermia (OMS, 1999).

Las cuatro categorías o tipos de movilidad se expresan como porcentajes:

- Rápidos (A): movimiento de traslación rápido, rectilíneo y cuantitativamente más importante que el desplazamiento lateral de la cabeza ( $\geq 25 \mu\text{m}/\text{seg}$  a  $37^\circ\text{C}$ ).
- Lentos (B): movimiento de traslación progresivo, pero menor que los anteriores, y generalmente no rectilíneo ( $< 25 \mu\text{m}/\text{seg}$  a  $37^\circ\text{C}$ ).
- No progresivos (C): movimiento de traslación mínimo o inexistente, simplemente se mueven alrededor de su propio eje ( $< 5 \mu\text{m}/\text{seg}$  a  $37^\circ\text{C}$ ).
- Inmóviles (D): movimiento inexistente.

Movilidad Progresiva Total: suma de los porcentajes A+B.

Movilidad Total: porcentaje de formas móviles (A+B+C).

Una motilidad baja de los espermatozoides puede constituir un impedimento para estas células en su intento de llegar al óvulo para fecundarlo.

La concentración de espermatozoides se informa como  $10^6/\text{mL}$  y el recuento en valor absoluto ( $\times 10^6$ ). La movilidad espermática se informa tanto en cifras absolutas ( $10^6/\text{mL}$ ) como en porcentaje respecto a la concentración de espermatozoides.

Para llevar a cabo estos recuentos se utiliza la cámara de Makler. Tras colocar un volumen fijo de  $10 \mu\text{L}$  de semen en la cámara de Makler y esperar un minuto para que la muestra se estabilice, se debe empezar inmediatamente su estudio para evitar que la caída de la temperatura o la deshidratación de la preparación alteren los resultados.

La cámara de Makler tiene sólo 10 micras de profundidad, por lo que es la cámara de contaje menos profunda, y permite realizar el recuento espermático sin diluir el eyaculado. Fabricada a partir de dos piezas de vidrio ópticamente plano, la pieza inferior contiene una cuadrícula para facilitar el contaje, y la superior sirve como cubierta de vidrio. Los espermatozoides se distribuyen de forma uniforme y en una única capa, y se observan en un único plano focal.

Figura 19. Cámara de Makler



El recuento de espermatozoides y la movilidad espermática se determinan a la vez colocando  $10 \mu\text{L}$  de muestra en una cámara de Makler, y se cuentan todos los espermatozoides móviles e inmóviles utilizando un objetivo de  $20\times$  en el microscopio óptico. La cámara consta de 100 cuadrados ( $10\times 10$  cuadrados). En función del número de espermatozoides presentes, se determinan los espermatozoides de un número de cuadrados concreto, llevando los resultados a los presentes en 10 cuadrados.

Si hay una elevada cantidad de espermatozoides, habrá que diluir la muestra con Ferticult Flushing medium® (FertiPro N.V.) teniendo en cuenta el factor de dilución para los cálculos. Por el contrario, todas aquellas muestras en las que no se encuentran espermatozoides por microscopia las centrifugamos a  $1500 \text{ rpm}$  durante 10 minutos para detectar la presencia de espermatozoides en el sedimento.

Solamente cuando no se encuentran espermatozoides después de una búsqueda completa y sistemática de todo el sedimento resuspendido, la muestra será clasificada como azoospérmica.

**Procedimiento:**

En cada campo se deben contar todos los espermatozoides progresivos rápidos y lentos, los no progresivos, y los espermatozoides inmóviles. Comenzamos contando el número total de espermatozoides que observamos, posteriormente los espermatozoides inmóviles, a continuación los progresivos rápidos y, por último, los no progresivos. En este momento hallaremos los lentos realizando una resta:

$$\text{Total} - \text{inmóviles} = \text{espermatozoides móviles}$$

$$\text{Móviles} - \text{rápidos} - \text{no progresivos} = \text{espermatozoides lentos}$$

También se debe observar si hay células redondas y leucocitos. El término *células redondas* abarca células epiteliales del tracto uretral y de la próstata, y células de espermatogénesis. Un eyaculado normal no debe contener más de  $5 \times 10^6/\text{mL}$ . En cuanto a los leucocitos predominan los neutrófilos, y están presentes en la mayoría de los eyaculados. Un número excesivo de esas células (leucocitospermia) sugiere la existencia de una infección y pobre calidad del semen. El recuento se realiza en la cámara completa, y el resultado se anota como hallazgo de células redondas, en caso contrario se informará como menor a 1.

**4.2.2.2 Estudio morfológico y recuento espermático diferencial**

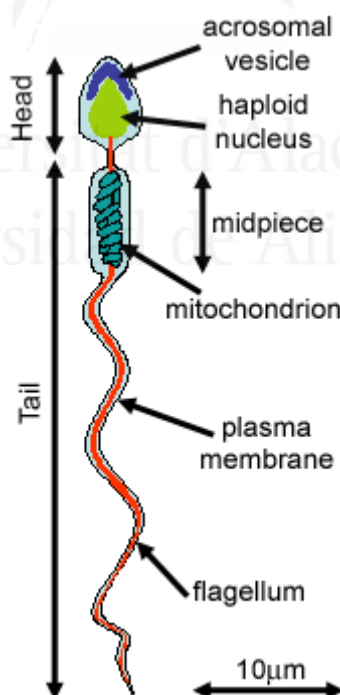
La morfología representa una prueba global de la función espermática y está directamente relacionada con la capacidad fecundante del semen. En FIV se ha comprobado que el espermatozoide fecundante es aquel que tiene una morfología normal, pero in vivo no está claro, se cree que sólo aquellos de aspecto normal serán capaces de ascender desde la vagina hasta las trompas y fecundar el ovocito. Para valorar la morfología, utilizamos los criterios estrictos de Kruger, según este autor, por debajo del 14% de formas normales la tasa de fertilización *in vitro* disminuye, llegando a ser poco probable por debajo del 5% (Kruger et al., 2004).

La tinción de Diff Quick (hematoxilina/eosina) proporciona una clara diferencia entre constituyentes celulares basófilos y acidófilos, permitiendo así un examen detallado del patrón de la cromatina que es de utilidad para el estudio de la presencia de formas inmaduras.

Cada espermatozoide sin “defectos” morfológicos es definido como ideal o normal y las características que debe cumplir son (OMS, 1999):

- Cabeza ovalada y bien definida (longitud 4,0-5,0  $\mu\text{m}$  y ancho 2,5-3,5  $\mu\text{m}$ ).
- Región acrosomal claramente definida que ocupa el 40-70% del área total de la cabeza de un tono pálido, no deben aparecer más de dos vacuolas pequeñas así como ninguna vacuola grande ni situarse dentro del área postacrosómica (región más oscura posterior).
- Pieza intermedia delgada, con un ancho menor a 1  $\mu\text{m}$  y una longitud aproximada de una cabeza y media, unida a la cabeza de forma axial.
- Las gotas citoplásmicas deben ser menores que la mitad de una cabeza normal.
- La cola debe ser recta y uniforme, más estrecha que la pieza intermedia, debe estar desenrollada y medir aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de largo. Además deberá estar simétricamente unida a la base de la cabeza.

Figura 20. Esquema de un espermatozoide considerado como “normal”



Todas las desviaciones de la morfología ideal son clasificadas como defectos. La presencia de defectos en cada región del espermatozoide se expresa como “defectos por 100 espermatozoides” para esa región. Un espermatozoide con un defecto en la cabeza, en la pieza intermedia y en la cola, es registrado como un espermatozoide con

tres defectos pero sigue siendo un único espermatozoide defectuoso. Según esto, el número total de defectos será mayor que el número de células defectuosas. A continuación se incluyen ejemplos de formas anormales de espermatozoides y de la clasificación de los diferentes tipos de defectos posibles:

- Defectos de cabeza

Incluyen formas grandes, pequeñas, alargadas, con forma de pera (piriformes), redondas, amorfas, vacuoladas, acrosomas pequeños o grandes (<40% o >70% del área de la cabeza), dobles cabezas, o combinaciones de estos defectos.

Figura 21. Ejemplos de cabeza normal (izquierda) y 4 anormales (derecha) (WHO, 2010)



- Defectos de cuello y de pieza intermedia

Incluyen inserción asimétrica, pieza intermedia ancha, irregular o estrecha (ausencia o desplazamiento de la vaina mitocondrial), o la combinación de estas anomalías.

Figura 22. Ejemplos de pieza intermedia normal (izquierda) y 4 anormales (derecha) (WHO, 2010)



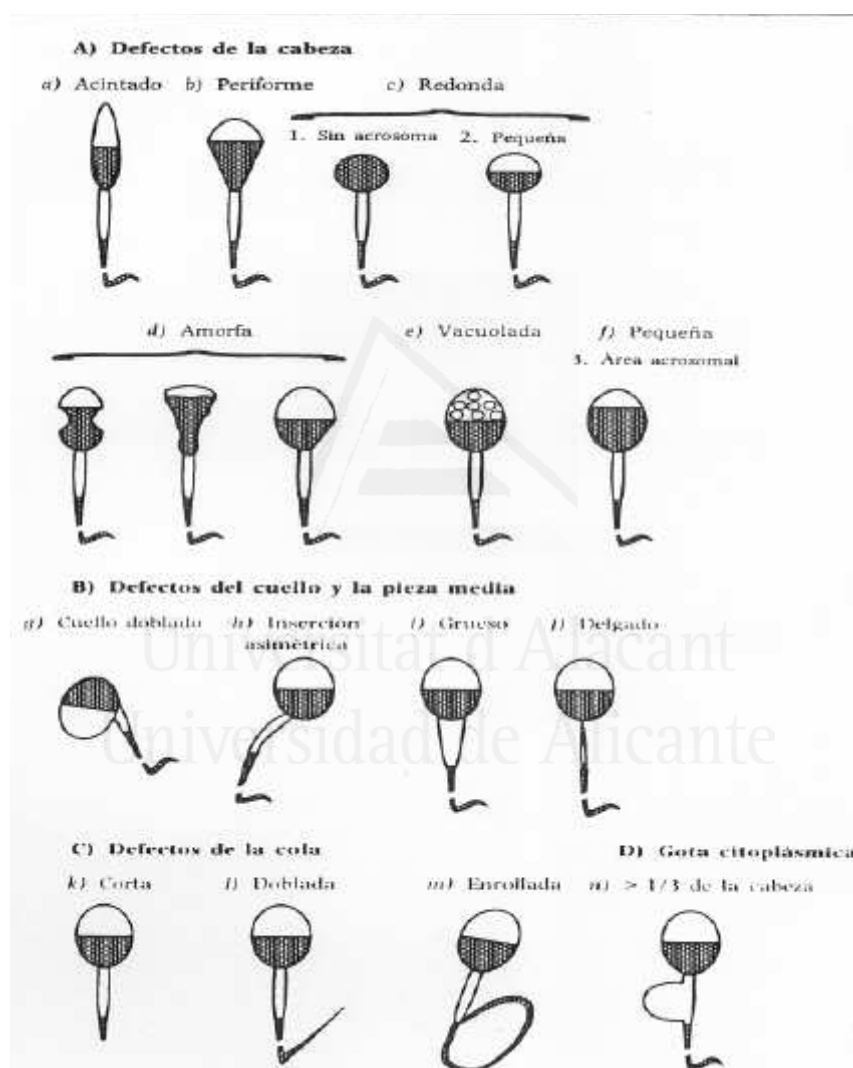
- Defectos de cola

Incluyen cola corta, doble, horquilla, rota, doblada cuando la pieza intermedia y la cola forman un ángulo  $>90^\circ$  con el eje longitudinal de la cabeza), irregular o enrollada, o las combinaciones de estas anomalías. Las colas sueltas no se cuentan. Una frecuencia alta de colas enrolladas puede indicar que el espermatozoide ha estado sometido a estrés hipoosmótico. La cola enrollada está también relacionada con el envejecimiento del espermatozoide.

Figura 23. Ejemplos de cola normal (izquierda) y 3 anormales (derecha) (WHO, 2010)



Figura 24. Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides (OMS, 2001)



Una vez realizado el examen de la extensión, hay que determinar el Índice de Teratozoospermia (ITZ). El ITZ es la media del número de defectos por espermatozoide defectuoso; se calcula dividiendo la suma de porcentajes de todos los defectos (defectos de cabeza, defectos de cuello/pieza intermedia, defectos de cola y exceso de citoplasma residual) entre el porcentaje de espermatozoides anormales (Kvist et al., 2004). Los valores pueden estar comprendidos entre 1 y 3. Cuanto más

se acerque este valor a 1 querrá decir que menor es el número de anomalías por espermatozoide. Cuanto más se acerque a 3, los espermatozoides presentarán mayor número de anomalías.

Los espermatozoides con morfología anormal frecuentemente no tienen una movilidad adecuada y tienen dificultad o son incapaces de penetrar en el ovocito.

Colorantes: kit de Diff Quick de Merck® que está compuesto por tres reactivos: metanol, hematoxilina y eosina. Están listos para su uso y se mantienen a temperatura ambiente.

### **Procedimiento:**

Para el estudio morfológico y recuento diferencial, una vez se ha secado la extensión (unas 3 horas), se fijará en metanol al menos durante 2-3 horas, aproximadamente, y se teñirá primero introduciéndolo en la eosina hasta que adquiera color rosa y posteriormente en hematoxilina hasta que se consiga un color azul uniforme.

Una vez fijada la extensión el procedimiento de la tinción consiste en:

- Drenar el exceso de solución colocando los portaobjetos verticales sobre papel absorbente.
- Teñir el portaobjetos con el colorante 1 del kit Diff Quick de Merck® durante 10 segundos y después en la solución 2 por 5 segundos. Drenar el exceso de solución en cada paso.
- Sumergir el portaobjetos en agua corriente de 10 a 15 veces para eliminar el exceso de tintura.
- Colocar el portaobjetos en forma vertical para drenar el agua y dejarlos secar completamente.
- Los portaobjetos pueden ser montados con aceite de inmersión.

Deben estudiarse un mínimo de 100 espermatozoides. Sólo se cuentan los espermatozoides completos, con cabeza y cola. Cada extensión es valorada utilizando un microscopio con un aumento total de 1000x sirviéndose de un objetivo de 100x, con

aceite de inmersión. Nos ayudaremos de un contador automático, y expresaremos el resultado sobre 100 células.

Realizado el examen de la extensión, los cálculos y resultados que se informan son los siguientes:

1. Porcentaje de espermatozoides normales.
2. Porcentaje de espermatozoides anormales.
3. Porcentaje de defectos de cabeza, porcentaje de defectos de cuello/pieza intermedia, y porcentaje de defectos de cola.
4. Índice de teratozoospermia (ITZ).

#### **4.2.2.3 Test de vitalidad espermática por exclusión de colorante**

Según el manual de la OMS (1999), si la proporción de espermatozoides móviles es menor del 50%, debe determinarse la proporción de espermatozoides vivos. El objetivo es diferenciar entre los espermatozoides muertos y los espermatozoides vivos pero inmóviles. Esta diferencia sólo tiene interés clínico cuando hay muy pocos o ningún espermatozoide móvil.

Esta técnica se basa en el principio de que las células muertas cuyas membranas plasmáticas están dañadas permiten la entrada de ciertos colorantes. Una célula con la membrana celular intacta no se tiñe con eosina, mientras que una célula muerta absorbe el colorante rojo. La nigrosina se utiliza como tinción de fondo para contrastar las células vivas sin teñir que aparecen de color blanco (Kruger et al., 2004).

Figura 25. Espermatozoides tras realizar el test de vitalidad



La fracción de espermatozoides muertos se encuentra aumentada en procesos infecciosos, problemas hormonales, presencia de anticuerpos antiespermatozoides, etc.



**Reactivos:** Se necesitan 500 mg de eosina polvo 0,5% (Merck®) a los que se añaden lentamente 100 mL de solución salina (Braun®) y se pasa a través de papel de filtro. De la solución stock preparada se separan alícuotas en tubos cilíndricos de 1 mL para su utilización diaria, y se guardan a temperatura ambiente (15-30° C) protegidas de la luz con papel de aluminio.

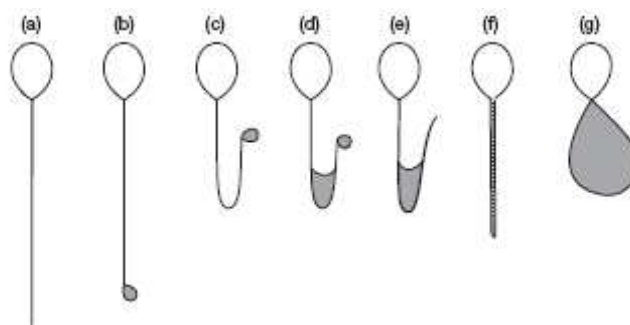
**Procedimiento:**

Mezclar 5 µL de semen bien homogeneizado con 10 µL de la solución de eosina en un porta/cubre. Esperar 10 segundos para que el colorante penetre, y observar al microscopio a 40x. Contar, con la ayuda de un contador automático, el número de espermatozoides con la cabeza rosa (muertos) y los que la tienen blanca (vivos) sobre un total de 100. El resultado es la proporción de espermatozoides vitales, “vivos”, expresado como porcentaje sin decimales.

**4.2.2.4 Test de Hos o de integridad funcional de la membrana espermática**

El Test de Hos evalúa la integridad anatomo-funcional de la membrana del espermatozoide. Se basa en la semipermeabilidad de la membrana celular intacta que causa que los espermatozoides se hinchen bajo condiciones hipoosmóticas cuando la entrada de agua produce una expansión en el volumen de la célula. A continuación se exponen ejemplos de espermatozoides positivos para el test de Hos.

Figura 26. Representación esquemática de los típicos cambios morfológicos que sufren los espermatozoides expuestos a un medio hipoosmótico. (a: normal, b-g: reactivos) (WHO, 2010)



La integridad y el buen funcionamiento de la membrana plasmática son fundamentales para el metabolismo espermático y para todas las etapas involucradas en el proceso de fertilización. La determinación del funcionamiento de la membrana plasmática es un parámetro indicador de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

**Reactivos:**

- Solución 1: 2,7 g de fructosa (Atom®) en 100 mL de agua destilada (Grifols®).
- Solución 2: 1,47 g de citrato sódico dihidratado (Atom®) en 100 mL de agua destilada (Grifols®).

Ambas soluciones se mezclan en volúmenes iguales y se alicuotan en volúmenes de 1 mL, en tubos eppendorf, para mantenerlas congeladas en la nevera del Laboratorio de Andrología hasta el momento de la prueba.

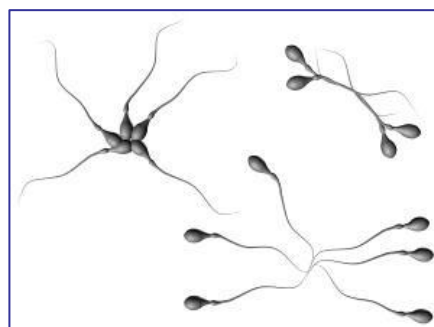
**Procedimiento:**

Se colocan 100  $\mu$ L de muestra en un tubo eppendorf que contiene 1 mL de solución de Hos (previamente preparada, descongelada y atemperada), y se dejan incubar una hora a temperatura ambiente. Se extrae una gota de la mezcla y se sitúa sobre un porta/cubre y se observa al microscopio a 40x, se valoran los cambios en la silueta de la cola del espermatozoide (hinchadas) sobre 100 espermatozoides. El resultado se expresa en porcentaje de células con la cola hinchada (%).

**4.2.2.5 Test de la aglutinación espermática**

Se debe diferenciar el concepto de agregación del de aglutinación. En los agregados hay células, detritus y espermatozoides inmóviles y móviles incluidos. Los pequeños agregados de espermatozoides y otros materiales se encuentran con frecuencia en sémenes normales, mientras que los grandes agregados son anormales, a menudo conteniendo centenares de espermatozoides. Las aglutinaciones están producidas por anticuerpos antiespermáticos y a menudo contienen una cierta proporción de espermatozoides móviles unidos cabeza/cabeza, cabeza/cola o cola/cola. Si los espermatozoides se encuentran aglutinados, no pueden llevar a cabo su función biológica.

Figura 27. Ejemplos de agregación (izquierda) y de distintos tipos de aglutinaciones (derecha) (WHO, 1999)



**Reactivos:** El reactivo que se utiliza es SpermMAR™ (FertiPro N.V.) para IgG o para IgA, que consta de 2 viales de 0,7 mL cada uno:

- Uno con partículas de látex (0,7 mL)
- Otro con antisuero (0,7 mL)

Están listos para ser utilizados, se mantienen en la nevera y sólo hay que atemperarlos para su uso.

La presencia de aglutinación espermática por observación al microscopio se debe comentar en el informe de resultados y debe ser estudiada.

El estudio de la aglutinación espermática se inicia con la realización del SpermMAR IgG Test®. En caso de ser positivo, se hace un estudio de los anticuerpos IgA siguiendo el mismo procedimiento, pero con antisuero SpermMAR IgA Test®.

**Procedimiento:**

El procedimiento de la prueba, SpermMAR™, consiste en poner por separado, gotas de igual tamaño sobre un portaobjetos: una gota de semen fresco, una gota de partículas de látex recubiertas de Ig y una gota de antisuero anti-IgG humana. Usando una punta de pipeta amarilla, mezclamos las gotas, ponemos el cubreobjetos encima y a continuación evaluamos bajo un objetivo de 40x al microscopio óptico.

Si existen anticuerpos contra los espermatozoides nadan libremente entre las partículas de látex adheridas. Al principio se ven los espermatozoides móviles que se mueven de un lado a otro con unas pocas y hasta con muchas partículas adheridas, pero eventualmente estos aglutinados se tornan tan masivos que los movimientos de los espermatozoides se ven seriamente restringidos.

En el informe final se expresa en porcentaje de espermatozoides móviles con partículas de látex. El diagnóstico de infertilidad inmunológica es probable cuando el 50% o más de los espermatozoides móviles tienen partículas adheridas, y en el caso de ser menor al 10% se informa como Negativo.

#### 4.2.2.6 Test de capacitación espermática

Existen distintas técnicas de capacitación, desde la simple dilución y centrifugación del semen, hasta otras estrategias más complicadas:

1. Dilución y lavado del semen.
2. Migración.
3. Gradientes de densidad.
4. Adherencia-Filtración.
5. Métodos avanzados: anticuerpos monoclonales, tecnología de microesferas (anexina V magnetic-activated cell sorting), electroforesis, ácido hialurónico, dextrano...

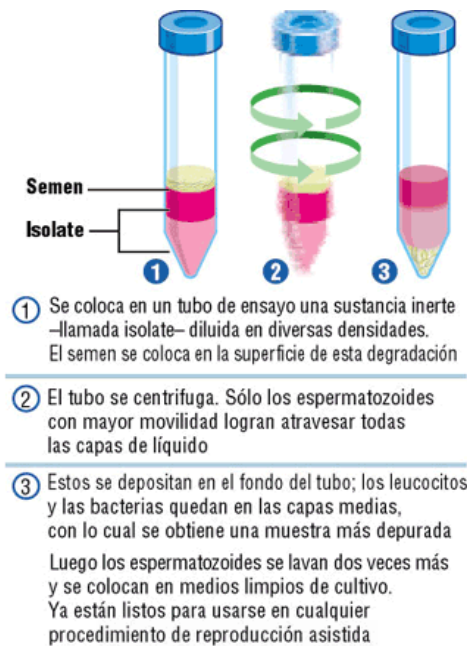
De todos los métodos anteriores, los que realmente tienen utilidad clínica son los de migración y gradientes de densidad, el resto no se utilizan (dilución y lavado del semen) o se emplean solamente en investigación.

El Método de Dilución y Lavado del semen se basa en diluir la muestra con un medio de cultivo, centrifugar y recuperar posteriormente el sobrenadante, repitiendo este proceso varias veces. Este método es adecuado cuando las muestras de semen son de buena calidad.

Las Técnicas de Migración se basan en la capacidad de movimiento de los espermatozoides, es decir, en la habilidad de migrar desde el semen al medio de cultivo. Dentro de esta categoría existen dos formas principales Swim Up y Swim down. Del Swim up hay 2 variantes, el directo y el convencional. En el primero el semen licuado se deposita debajo o sobre un medio de cultivo, y los espermatozoides con buena movilidad se dirigen al medio de cultivo de forma semejante al proceso in vivo, a través del moco cervical. El segundo, se basa en el mismo principio pero requiere un paso previo de lavado. El Swim down es similar, pero en este caso se coloca primero el medio de cultivo y después se deja resbalar el semen por la pared del tubo para que quede arriba, por lo que en este caso los espermatozoides más aptos van a nadar hacia la parte de abajo, donde está el medio de cultivo.

La Técnica de los Gradientes de Densidad es la utilizada en este estudio. A continuación se explica en profundidad.

Figura 28. Pasos a seguir en la técnica de recuperación por gradientes



<http://www.embrios.com/3rem.html>

**Reactivos:**

- Pure Sperm® 100: suspensión de sílice coloidal y esterilizada (Sílice recubierto de silano; cloruros de sodio, potasio y calcio; glucosa; HEPES; EDTA y agua de calidad WFI). Características: pH: 7,4-7,8; Osmolalidad: 300-310 mOsm/kg agua.
- Pure Sperm® Buffer: solución salina isotónica estéril (Cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactato cálcico, piruvato de sodio, citrato de sodio, HEPES, EDTA, glucosa y agua de calidad WFI). Características: pH: 7,4-7,8; Osmolalidad: 300-310 mOsm/kg agua.
- Pure Sperm® Wash: solución salina isotónica esterilizada (Cloruro de sodio, sulfato de magnesio, fosfato dihidrógeno de potasio, bicarbonato sódico, hSA Sero albúmina humano, cloruro de potasio, glucosa, lactato, piruvato, HEPES, EDTA, y agua de calidad WFI). Características: pH: 7,3-8,5; Osmolalidad: 290-300 mOsm/kg agua.
- Sperm Assist: solución salina isotónica esterilizada (Cloruro de sodio, sulfato de magnesio, fosfato dihidrógeno de potasio, bicarbonato sódico, hSA Sero albúmina humano, cloruro de potasio, glucosa, lactato, piruvato, HEPES, EDTA, y agua de calidad WFI). Características: pH: 7,3-8,5; Osmolalidad: 290-300 mOsm/kg agua.

Todos ellos con niveles de endotoxina <1,0 EU/mL y una supervivencia del espermatozoides 18 horas después de la separación por gradiente de densidad >70%.

Esta técnica se basa en el principio de que los gradientes de densidad disgregan las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra), donde ya no se desplaza más. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad (el fondo del tubo). El plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad, y las células, los espermatozoides inmaduros y muertos, se sitúan en la interfase entre los dos gradientes (Sánchez et al., 2009).

**Procedimiento:**

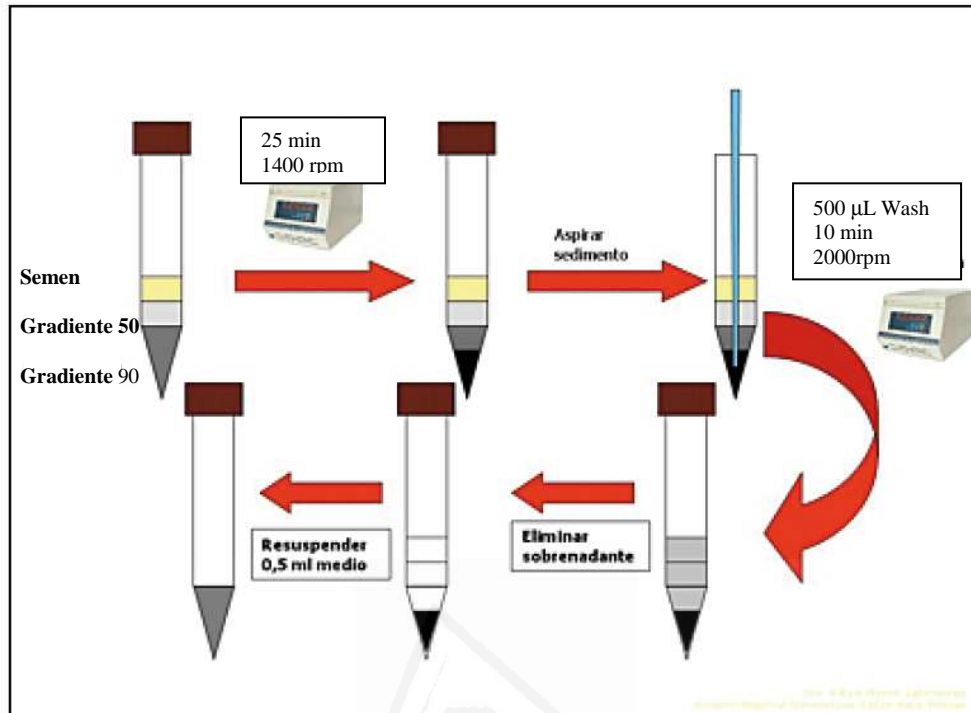
- Preparar 1 tubo con 500  $\mu$ L de *Pure Sperm*<sup>®</sup> 100 + *Pure Sperm*<sup>®</sup> Buffer (90:10) resbalando por la pared y en un ángulo aproximado de 30°, tapar y bañar las paredes por inversión del tubo (para romper la tensión superficial).
- Añadir 500  $\mu$ L de *Pure Sperm*<sup>®</sup> 100 + *Pure Sperm*<sup>®</sup> Buffer (50:50), para conseguir 2 fases se deja caer resbalando por la pared en un ángulo aproximado de 30°, por el mismo lateral del tubo que antes. Procurar no mover el tubo para que no se mezclen los gradientes.
- Añadir 1 mL de semen en el tubo lentamente procurando que se forme una fase y tapar.
- Centrifugar 25 minutos a 1400 rpm.
- Recuperar el botón con una pipeta Pasteur de cristal y pasarlo a un tubo Falcon rotulado.
- Realizar 1 lavado con 0,5 mL de *Pure Sperm*<sup>®</sup> Wash.
- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
- Desechar el sobrenadante del lavado, resuspender con 0,5 mL de *Sperm Assist*<sup>®</sup>.
- Hacer el recuento en la cámara de Makler<sup>®</sup>, siguiendo las mismas pautas descritas anteriormente.
- Cálculo del REM (Recuperación de Espermatozoides Móviles):

$$\text{REM} = V_c \times (n^0 \text{ esp}) \times V_t$$

$V_c$ = Volumen capacitado (0.5 mL)

$V_t$ = Volumen total.

Figura 29. Representación esquemática de la técnica de capacitación espermática por gradientes de densidad (Ruiz et al., 2011)



#### 4.2.3 Estudio bioquímico

Las dos magnitudes bioquímicas que habitualmente se determinan en el plasma seminal, y que tienen utilidad como indicadores del correcto funcionamiento de los distintos componentes del tracto genital masculino, son la fructosa y el ácido cítrico.

El líquido seminal es muy rico en fructosa y apenas contiene glucosa. La fructosa procede de la secreción de las vesículas seminales y de las ampollas de los conductos deferentes. Constituye la principal fuente de energía para los espermatozoides.

El líquido seminal también es rico en ácido cítrico de origen prostático y aminoácidos libres.

Tabla 5. Principales patrones bioquímicos del plasma seminal en alteraciones de la función reproductiva (N: normal) (Bassas, 2009).

	Volumen	pH	Citrato	Fructosa	Alfaglicosidasa neutra
Obstrucción distal	Muy bajo	Ácido	Bajo	Muy baja	Baja
Agenesia deferentes					
Inflamación	Bajo	N-alcalino	N	Baja	N
Obstrucción proximal	N	N	N	N	Baja
Azoospermia secretora	N	N	N	N	N
Hipospermia funcional	Bajo	N	N	N	N
Recolección incompleta					

El ácido cítrico se encuentra alterado en procesos infecciosos-inflamatorios (actuales o anteriores) de la glándula, cuando se produce pérdida de la primera porción del eyaculado y en algunas otras circunstancias. La fructosa se encuentra disminuida en vesículas hipofuncionantes, azoospermias de tipo obstructivo, etc. Y ambos compuestos en caso de hipoandrogenismo.

### Determinación de Fructosa y Citrato

Reactivos: Olympus®

- Glucosa-Fructosa (ref.: GF8815)
- Ácido cítrico (ref.: CI8820)

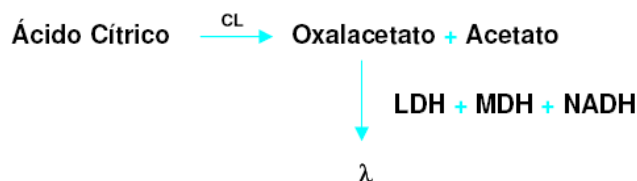
### Fundamento de la medición:

En el caso de la determinación de Fructosa, la adición de PGI (fosfoglucoisomerasa) a la muestra genera nuevo NADPH al pasar la fructosa-6P a glucosa-6P. El aumento de la radiación UV-color a 340 nm de longitud de onda debido al incremento del NADPH, es proporcional a la concentración de fructosa en la muestra.



El Ácido cítrico por acción de la citrato liasa (CL) da lugar a oxalacetato y acetato. Este oxalacetato (y su producto descarboxilado, piruvato) se transforma, en una segunda reacción en presencia de LDH (lactato deshidrogenasa), MDH (malato deshidrogenasa) y NADH. La intensidad de la radiación UV-color a 340 nm de longitud de onda, es proporcional a la concentración de citrato en la muestra.



**Procedimiento:**

El volumen seminal restante se centrifuga (3000 g, 15 min) y el sobrenadante se coloca en un tubo etiquetado y se congela a -20°C para los análisis bioquímicos posteriores. Una vez recogido un número suficiente de muestras se descongelan y se determina la concentración de fructosa y citrato simultáneamente en el Autoanalizador Olympus AU 640 por medio de métodos adaptadas. Los resultados se expresan en mg/dL.

### 4.3 Métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo

#### 4.3.1 Determinación de Metales y Elementos Traza

**Reactivos:**

Para la determinación de metales se utilizaron reactivos ultra puros.

Para la calibración se usaron los siguientes materiales:

- Solución Multielementos Certipur IV de Merck®.
- Solución Standard de Selenio Certipur de 106 mg/L de Merck®.
- Solución Standard de Vanadio 106 mg/L de Fluka®.

Como patrón interno se utilizó la mezcla de estándares internos de Agilent (Li, Sc, Ge, Y, In, Tb y Bi, de 104 mg/L).

Para la verificación de la calibración se utilizó una solución de multielementos inorgánicos de 105 mg/L.

Para la validación del método se utilizó un material sérico de referencia "Serum Control Lyophilised REC-8881 para elementos Traza, Level II" de ClinChek®.

**Fundamento de la medición:**

La determinación de Elementos Traza se realizó por espectrofotometría de emisión de plasma acoplada a la espectrometría de masas (ICP-MS). El uso de esta tecnología se ha impuesto como la metodología más adecuada con fines clínicos por su rapidez, límite de detección y mínima cantidad de muestra necesaria para el análisis. Características analíticas de este método:

- Rango lineal del orden de  $10^6$ , lo que hace innecesarias diluciones, evitando el riesgo de errores.
- Reproducibilidad con coeficientes de variación inferiores al 2% expresado como la desviación standard relativa.
- Límites de detección del orden de ng/L.

La técnica de espectrofotometría de emisión de plasma consiste en un gas (Argón) ionizado eléctricamente, cuya temperatura de ionización es muy elevada ( $1000^{\circ}\text{C}$ ). Por su parte, la espectrometría de masas es una técnica de detección que se basa en la medida de la relación carga/masa de los Elementos Traza atomizados e ionizados.

Las muestras nebulizadas son introducidas mediante una corriente de argón en la zona plasmógena donde se atomiza e ioniza. Las lentes iónicas del cuadrupolo seleccionan los iones de una determinada relación carga/masa. Posteriormente, estos iones seleccionados por el cuadrupolo son detectados por un multiplicador de electrones, que puede trabajar en modo pulsos o en modo analógico. El modo pulso se utiliza para concentraciones bajas y utiliza toda la capacidad de amplificación del detector, mientras que el modo analógico integra la señal sólo hasta obtener una intensidad suficiente, protegiendo así al detector de señales demasiado intensas. Finalmente, la intensidad leída en el detector es transformada en concentración por medio del sistema informático.

Esta técnica permite la determinación de forma simultánea de un elevado número de Elementos Traza, a diferencia de la absorción atómica que obliga a determinar cada elemento por separado con el consiguiente consumo de muestra biológica, que en nuestra investigación resultaba uno de los aspectos limitantes. Con la tecnología de ICP-MS la determinación de los Metales se puede realizar en menos de un minuto, permitiendo además la selección de cualquier otro elemento del sistema periódico sin incremento en el tiempo de análisis ni variación en el proceso analítico.

En concreto, el equipo utilizado fue el ICP-MS Agilent 7500i con automuestreador CETAC ASX-500, conectado a un sistema de introducción e integración de muestra (ISIS System). Los Metales y Elementos Traza medidos fueron: Fe, Al, Cu, Zn, Mn, Se, Hg, Co, Cr, Cd, V, Pb y Ni.

La técnica de ICP-MS empleada en este trabajo se encuentra acreditada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), según el anexo técnico nº 109/285.

### Procedimiento:

Uno de los principales problemas que presenta la matriz plasma seminal es su alta concentración de proteínas. Las determinaciones de los distintos metales se realizaron en el laboratorio Labaqua, empresa de servicios analíticos medioambientales, no habituada a trabajar con muestras con la matriz proteica de los plasmas seminales. Por este motivo se procedió al estudio de una metodología de trabajo que incluyera tanto la optimización del equipo como el pre-tratamiento de las muestras, y que sirviera para determinar los metales en las muestras remitidas por el H.G.U. de Elche.

Para la optimización del equipo con el objetivo de adaptarlo a la matriz de nuestras muestras, fue necesario:

1. Elección de masa y gas de reacción-colisión, rangos de trabajo y tiempos de integración para obtener los límites de cuantificación necesarios.
2. Optimización de parámetros instrumentales: voltajes de lentes y detector.
3. Selección del sistema de nebulización a utilizar.

A continuación se resumen las condiciones de trabajo del equipo:

Tabla 6. Resumen de las especificaciones de trabajo del IP-MS Agilent 7500i

ICP-MS AGILENT 7500i		
PARAMETRO	VALOR	UNIDADES
RF POWER	1400	W
RF Matching	1.7	V
Smpl Depth	5	mm
Torch-H	-0.8	mm
Torch-V	1	mm
Carrier Gas	0.82	L/min
MaKeup Gas	0.31	L/min
Nebulizer Pump	0.16	Rps
S/C Temp	2	degC
Nebulizer	Miramist	
Tiempo de análisis por muestra	1	min

Los elementos de alta concentración como el Fe se determinaron con un método de trabajo cuyas rectas de calibrado se expresan en mg/L. Los elementos de concentración límite intermedia, como Zn, Cu, Se y Al, se analizaron mediante ICP-MS, con rectas de calibrado desde 1 hasta 50  $\mu\text{g/L}$ , mientras que los elementos como Mn, Cd, Cr, V, Co, Ni, Hg y Pb, que necesitan límites de ng/L, se analizaron también por ICP-MS modificando los parámetros de análisis normales del laboratorio. Para ello, se aumentaron tiempos de integración por medida y el voltaje del detector a fin de conseguir límites de detección apropiados para las concentraciones requeridas (límite de 0.05  $\mu\text{g/L}$ ). La recta de calibración utilizada será de 0,1 a 2  $\mu\text{g/L}$ .

Respecto a las muestras, debido a la ausencia de valores de referencia de Metales Traza en plasma seminal, realizamos una evaluación de distintos pre-tratamientos con una serie de muestras. Probamos 2 tipos de pre-tratamientos: uno básico (con amonio 1% y EDTA 0,05%) y otro ácido ( $\text{HNO}_3$  0,5%). El segundo resultó el más indicado al originar menos problemas metodológicos y mejor correlación con los valores hallados en la bibliografía. Por este motivo sometimos todos los plasmas seminales a un pre-tratamiento ácido ( $\text{HNO}_3$  0,5%) para la determinación de los Metales Traza.

Es decir, conseguimos optimizar la metodología ICP-MS-ORC para la determinación simultánea de los Metales en plasma seminal en 2 minutos, con límites de detección del orden de ng/L, reduciendo el volumen de muestra necesario a 0,5 mL.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### 4.3.2 Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes

#### 4.3.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

**Reactivos:** Laboratorios Randox® (ref.: SD125)

- Mezcla de Sustrato:

Xantina	0,05 mmol/L
I.N.T	0,025 mmol/L

- Diluyente Ransod:

Buffer Fosfato pH 7.0	0,01 mol/L
-----------------------	------------

- Xantina Oxidasa:

80 U/L

- Standard de calibración:

3,88 U/mL

- Buffer:

CAPS	50 mmol/L, pH 10,2
EDTA	0,94 mmol/L

- Material de Control (ref.: SD 126) para garantizar la calidad de las mediciones.

#### Fundamento de la medición:

Este método emplea Xantina y Xantina oxidasa (XOD) para generar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un complejo con formazan de color rojo. La actividad de la SOD se mide como la disminución de la inhibición de esta reacción.



#### Procedimiento:

Se adaptó la técnica a un autoanalizador Cobas Mira® para su realización automatizada. Partimos de 50µL de plasma seminal, diluimos al 1:25 con 1,2 mL de Diluyente Ransod, agitamos brevemente en el vortex. La concentración de SOD se calcula midiendo la disminución de absorbancia a 500 nm.

En el Cobas Mira ponemos los reactivos siguiendo las indicaciones del fabricante: el sustrato (Xantina) y la Xantina Oxidasa. El control y las muestras se dispusieron en el rack de muestras. Los resultados obtenidos por el Cobas ya incluyen las diluciones, y

se expresan en U/mL. En cada serie de trabajo se analizó una muestra de control valorado para la aceptación de los resultados de las muestras de los pacientes.

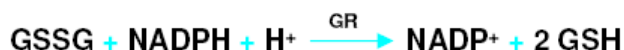
#### 4.3.2.2 Glutación peroxidasa (GPx)

Reactivos: Laboratorios Randox® (ref.: RS505)

- Sustrato Ransel:	
Glutación	4 mmol/L
GR	≥ 0.5 U/L
NADPH	0,34 mmol/L
- Hidroperóxido de cumeno	0,18 mmol/L
- Buffer:	
Tampón fosfato	0,05 mol/l, pH 7,2
EDTA	4,3 mmol/L
- Diluyente Ransel:	
- Reactivo de Drabkin's:	
Fosfato potásico	104 mmol/L
Ferricianuro potásico	60,8 mmol/L
Cianida potásica	78,8 mmol/L
- Material de Control (ref.: SC 692) para garantizar la calidad de las mediciones.	

#### Fundamento de la medición:

La actividad del enzima GPx se determinó de acuerdo con el procedimiento de Paglia y Valentine (1967). La GPx cataliza la oxidación del Glutación (GSH) por el hidróxido de cumeno (ROOH). A continuación, el glutación oxidado (GSSG), en presencia de GR y NADPH, pasa a su forma reducida y el NADPH se oxida a NADP<sup>+</sup>. La medida de la disminución de la absorbancia a 340 nm determina la actividad de la GPx.



#### Procedimiento:

Se adaptó la técnica a un autoanalizador Cobas Mira® para su realización automatizada. Determinamos la concentración de GPx en 50µL de plasma seminal. Le añadimos 1mL de Diluyente Ransel, que convierte el glutation a su forma reducida

(GSH), mezclamos (vortex) e incubamos 5 minutos. A continuación añadimos 1mL del reactivo de Drabkin's que contiene cianida para inhibir las posibles interferencias debido a la presencia de peroxidases, las cuales darían unos resultados falsamente elevados en la reacción. Lo mezclamos todo bien y analizamos las muestras antes de que pasaran 20 minutos.

El analizador Cobas Mira® calcula la concentración de GPx midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm. El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución de la muestra (41) y el producto resultante se expresa en U/L. En cada serie de trabajo se analizó una muestra de control valorado para la aceptación de los resultados de las muestras de los pacientes.

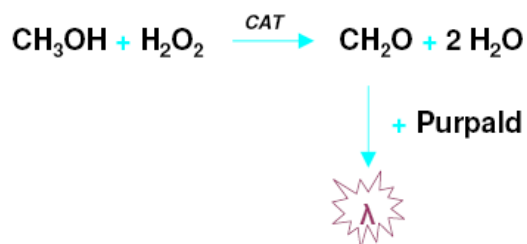
#### 4.3.2.3 Catalasa (CAT)

Reactivos: Reactivos Cayman® (ref.: 707002):

- Assay Buffer (100 mM fosfato de potasio, pH 7,0).
- Sample Buffer (25 mM fosfato de potasio, pH 7,5, con 1 mM EDTA y 0,1% BSA).
- Formaldehído Estándar.
- Catalasa (control).
- Hidróxido de potasio.
- Metanol.
- Peróxido de Hidrógeno.
- Purpald (cromógeno).
- Periodato de Potasio.

#### **Fundamento de la medición:**

El kit de ensayo de catalasa Cayman utiliza la función peroxidativa de la CAT para medir su actividad. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El formaldehído producido se mide colorimétricamente con el cromógeno 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purpald). El Purpald forma un heterociclo bicíclico con aldehídos, que entre oxidación y oxidación cambia de ser incoloro a tomar un color púrpura. Las lecturas de aumento de absorbancia se realizan a 540 nm.

**Procedimiento:**

Realizamos las pautas marcadas por el kit de ensayo de catalasa Cayman. La determinación se realizó en microplaca utilizando el lector automático de ELISA en microplaca de ADALTIS®. Los resultados se expresan en nmol/min/mL.

**4.3.3 Determinación de vitaminas antioxidantes****4.3.3.1 Vitamina B<sub>12</sub> y Ácido fólico**

Reactivos: Abbott Científica®

- Vitamina B<sub>12</sub>: (ref.: 7K61-35).
- Ácido fólico: (ref.: 1P74-35).

La vitamina B<sub>12</sub> y el ácido fólico se realizaron simultáneamente en el analizador Architect i2000 (Abbott Científica) mediante un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida. Los resultados de la B<sub>12</sub> se expresan como pg/mL y los del ácido fólico en ng/mL.

**4.3.3.2 Vitamina C**

Reactivos: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH® (ref. 65000). El kit está compuesto por:

- Columna analítica.
- Fase Móvil.
- Estándar Interno.
- Reactivo de Precipitación.
- Estándar de Calibración.
- Control Alto.
- Control Bajo.



La determinación de la Vitamina C se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se precisa un sistema isocrático sencillo con bomba de HPLC, inyector y detector UV. Las condiciones del analizador fueron:

Tabla 7. Resumen de las especificaciones de trabajo del HPLC para la determinación de vitamina C

PARÁMETROS	CONDICIONES
Auto inyector	Volumen de inyección 20 uL
Duración de los análisis	5 min aprox.
Velocidad de flujo	1-1,5 mL/min
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente (25°C aprox.)
Detector UV	Longitud de onda 245 nm
Tiempo de retención	
- Vitamina C	2,0 min aprox.
- Estándar Interno	2,6 min aprox.

#### Fundamento de medición:

La preparación de las muestras consta de una efectiva precipitación proteica, para eliminar las posibles interferencias y simultáneamente estabilizar la vitamina C. Para una exacta cuantificación se utiliza un estándar interno.

#### Procedimiento:

Previamente a iniciar la serie de análisis debemos poner a punto el analizador de HPLC:

1. Antes de montar la columna de HPLC, lavamos primero el equipo con 50 mL de agua destilada y, a continuación, con unos 50 mL de fase móvil, con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. Inyectamos varias veces metanol/agua (1:1) para que también esté limpio el inyector.
2. A continuación, montamos la columna y equilibramos el sistema durante 10 min con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min, hasta que se estabilice la línea de base.
3. Inyectamos después varias veces el estándar de calibración procesado hasta que los dos cromatogramas sean idénticos en sus tiempos de retención y áreas o alturas de pico.
4. Bombeamos entonces la fase móvil en el circuito.

#### Análisis propiamente dicho de la vitamina C:

El protocolo de la técnica dicta que el volumen necesario de muestra es de 100  $\mu\text{L}$ . Nuestra muestra consta de un volumen de 20  $\mu\text{L}$  por lo que para conseguir el volumen requerido el primer paso que realizamos es añadir 80  $\mu\text{L}$  de agua destilada a las muestras. De manera que obtenemos una dilución de 1/5.

Además, preparamos 100  $\mu\text{L}$  de los controles y el calibrador en eppendorfs de color marrón. Añadimos 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de precipitación a las muestras, controles y calibrador. Mezclamos 10 s con un vórtex. Incubamos 10 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Centrifugamos 5 min a 13.400 rpm. Pasamos la fracción sobrenadante a los pocillos para el HPLC con los adaptadores para pequeños volúmenes. Colocamos las muestras en HPLC, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$ .

El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución de la muestra (5) y el producto final se expresa en mg/L.

#### **4.3.4 Determinación de Malondialdehído (MDA)**

Reactivos: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH® (ref.: 67000 Munich). El kit está compuesto por:

- Columna analítica.
- Fase Móvil.
- Reactivo de Precipitación.
- Reactivo de Derivatización.
- Buffer de Neutralización.
- Recipientes de derivatización.
- Recipientes de reacción, protegidos de la luz.
- Calibrador (liofilizado).
- Plasma Control de Malondialdehído, Nivel I.
- Plasma Control de Malondialdehído, Nivel II.

La determinación de MDA se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se precisa un sistema isocrático sencillo con bomba de HPLC, inyector y detector fluorescente. Las condiciones del analizador fueron:

Tabla 8. Resumen de las especificaciones de trabajo del HPLC para la determinación de MDA

PARÁMETROS	CONDICIONES
Auto inyector	Volumen de inyección 20 $\mu$ L
Duración de los análisis	5 min aprox.
Velocidad de fluj:	1 mL/min
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente (25°C aprox.)
Detector fluorescente (Waters mod. 474)	$\lambda$ excitación = 515 nm $\lambda$ medición = 553 nm
Tiempo de retención	2,8 min aprox.

**Fundamento de medición:**

La preparación de muestras consta de una efectiva precipitación proteica, seguida de una derivatización. El fluoróforo que se crea con este proceso puede detectarse específicamente y en concentraciones mínimas.

**Procedimiento:**

Antes de iniciar la serie de análisis debemos poner a punto el analizador de HPLC según las instrucciones descritas previamente.

Para la conservación y análisis las muestras se protegieron de la luz, guardándolas en envases de color marrón.

**Análisis propiamente dicho del MDA:**

Añadimos a 50  $\mu$ L de las muestras (calibrador, controles, plasma seminal) 250  $\mu$ L de Reactivo de Precipitación y lo mezclamos 10 segundos con un mezclador vórtex. Centrifugamos 5 minutos a 13.000 rpm en la microcentrífuga MiniSpin®. Pasamos 200  $\mu$ L de la fracción sobrenadante a un recipiente de derivatización. Añadimos 40  $\mu$ L de Reactivo de Derivatización, enroscamos firmemente el cierre del recipiente y lo mezclamos brevemente. Incubamos 60 min a 95°C en un baño maría. A continuación, enfriamos la muestra inmediatamente, colocándola en una bandeja con hielo y agua durante 5 minutos aproximadamente. Añadimos 200  $\mu$ L de Buffer de Neutralización, lo mezclamos brevemente. Colocamos las muestras en HPLC, se inyectaron 20  $\mu$ L.

El equipo de HPLC realiza automáticamente los cálculos y permite obtener directamente las concentraciones de MDA expresadas en  $\mu$ g/L.

## 4.4 Diseño del Cuestionario socio-demográfico y clínico

Como ya se ha expuesto en el apartado de Introducción, determinados hábitos de vida, exposiciones ambientales y enfermedades, pueden estar relacionadas con un aumento de estrés oxidativo en los varones, y esta situación favorecería la aparición de problemas de fertilidad o de calidad del semen. Para conocer esta relación en nuestros sujetos a estudio, elaboramos un Cuestionario *ad hoc* con el fin de conocer los aspectos clínicos, los hábitos de vida y los datos socio-demográficos y ambientales, de cada uno de ellos. A continuación justificaremos la selección de las preguntas del Cuestionario utilizado (Anexo IV), siguiendo el orden establecido en éste.

### 1. Datos Clínicos

En este apartado nos interesaba conocer en primer lugar si los sujetos cumplían los criterios de inclusión del estudio, en segundo lugar el estado de salud general y, por último, si previamente habían demostrado fertilidad.

Para la inclusión de los varones en el estudio, les preguntábamos el número de años que llevaban tratando de concebir y, por otro lado, si padecían o habían padecido alguna enfermedad y/o fiebre. Finalmente, se les preguntaba si habían consumido fármacos, sobre todo en los últimos 3 meses. En el caso de que llevaran más de un año tratando de concebir, no padecieran ninguna enfermedad, ni hubieran ingerido ningún fármaco que pudiera afectar a la espermiogénesis, los sujetos eran incluidos en el estudio.

El conocimiento de si el sujeto tiene ya descendencia, resulta de interés para saber si puede existir un problema puntual o de incompatibilidad con la pareja actual, ya que el varón ha demostrado su fertilidad previamente.

Por otra parte, también se ha reseñado que la obesidad parece estar relacionada con la infertilidad (Matorras et al., 2007; Hammoud et al., 2008a; Hammoud et al., 2008b; Agarwal et al., 2012a), por ello tuvimos en cuenta el índice de masa corporal de los varones.

Por último, indagamos en las enfermedades febriles, ya que éstas incrementan la temperatura testicular, y es conocido que el calor tiene un efecto negativo sobre los espermatozoides, disminuyendo su número e incrementando sus anomalías (Brugo-

Olmedo et al., 2003; Tremellen, 2008; Shiraishi et al., 2009; Dohle et al., 2010). Nos centramos en los últimos 3 meses por ser este periodo la vida media de los espermatozoides. En cuanto a los fármacos destacamos los vasodilatadores, por tener una influencia directa sobre el aparato reproductor masculino al aumentar el flujo sanguíneo en la zona genital.

## **2. Hábitos de vida**

Un aspecto importante a tener en consideración en el análisis del semen son las posibles influencias exógenas que pudieran afectar a la línea germinal. Por este motivo dedicamos un apartado a los déficits dietéticos, al consumo de tóxicos y al ejercicio físico.

Para valorar las costumbres nutricionales de los sujetos se realizaron una serie de preguntas que se agrupan en las siguientes categorías:

1. Consumo de frutas y verduras.
2. Consumo de huevos, carnes y lácteos.
3. Consumo de aceites y frutos secos.
4. Complejo vitamínico en los 2 últimos meses.
5. Concentrado dietético en los últimos 2 meses.

Nos centramos en aquellos alimentos ricos en las vitaminas incluidas en nuestro estudio y preguntamos a los sujetos si cumplían las recomendaciones nutricionales mínimas de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), para valorar el estado nutricional de los sujetos y relacionarlo así con la calidad seminal (Dapcich et al., 2004).

A continuación exponemos brevemente la relación entre las vitaminas y los alimentos que las contienen y que han sido incluidos en nuestro Cuestionario (Dapcich et al., 2004; Deulofeu et al., 2005):

- La vitamina C es una vitamina muy repartida en las frutas, sobre todo en las cítricas o en el kiwi, y en las verduras y las hortalizas.
- La vitamina A se encuentra en productos de origen animal como el hígado, los aceites de pescado y en forma de beta-caroteno en vegetales como la zanahoria, la calabaza, y el perejil.
- La vitamina B<sub>12</sub> está presente en la carne, la leche, los productos lácteos y en los huevos.

- La vitamina E se encuentra en los aceites vegetales como el de girasol y el de oliva, o en los frutos secos.
- Por último, el folato está presente mayoritariamente en las hortalizas de hojas verdes y en los frutos secos (avellanas y almendras).

Además queríamos conocer si los sujetos habían consumido algún complejo vitamínico o concentrado dietético en los últimos 2 meses, ante la posible presencia de un aporte vitamínico extra.

Y para completar el conocimiento respecto a los hábitos de vida saludables, preguntamos sobre el consumo de tóxicos (tabaco, alcohol y drogas), y el ejercicio físico. Respecto al consumo de tóxicos nos interesaba saber el tipo de droga y la frecuencia de consumo, sobre todo en los últimos 3 meses. Y en cuanto al ejercicio físico, qué tipo de deporte practicaban y con qué frecuencia, para observar si había diferencias entre el hábito sedentario y la práctica de ejercicio físico, y a su vez, si influía la intensidad de éste (Sergerie et al., 2000; Waylen et al., 2009; Tremellen, 2008; Bloomer et al., 2009; Jain et al., 2009; Liu et al., 2010).

En el Cuestionario consultamos la frecuencia del consumo de alcohol en los 3 últimos meses y la cantidad ingerida en cada toma. Los varones referían número de envases, es decir, cantidad de cervezas, copas de vino...ingeridas. Para hacer estos datos comparables y poder trabajar con ellos, ajustamos las frecuencias siguiendo la escala de Walter Willett en su Cuestionario de Frecuencia Alimentaria (Willett, 1998) y los transformamos en unidades de g/día. De esta manera expondremos los resultados del consumo de alcohol de los varones en los siguientes apartados.

### **3. Datos socio-demográficos**

Para conocer la procedencia de los sujetos, incluimos la raza y el país de nacimiento. Además quisimos saber el tipo de profesión, si su puesto de trabajo conllevaba estrés laboral y si estaba en contacto con sustancias tóxicas, y en caso de que lo estuviera, el tipo de sustancia y la forma de contacto. Estas informaciones constituyen posibles parámetros que pueden influir en la calidad seminal y/o en la producción de estrés oxidativo (Queiroz et al., 2006; Tremellen, 2008).

### **4. Datos ambientales**

Para averiguar el grado de contaminación ambiental al que estaban expuestos los sujetos, preguntamos por su lugar de residencia, para dilucidar entre medio rural o urbano, y, finalmente, el posible contacto directo o indirecto con tóxicos derivado de la

ubicación del hogar (Cuquerella et al., 2003; Queiroz et al., 2006; Saradha et al., 2006; Tremellen, 2008).

## 4.5 Métodos estadísticos

Los resultados, tanto de las determinaciones realizadas en el laboratorio como las informaciones recopiladas a través del Cuestionario, se incorporaron en una base de datos para su posterior análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con la ayuda del programa informático IBM-SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows versión 17, excepto para el estudio de curvas ROC que se utilizó el Programa MedCalc versión 11.3.0. Se asumió un nivel de significación del 0,05 en todas las pruebas estadísticas realizadas en el estudio.

Inicialmente se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si nuestras variables seguían una distribución normal o no.

Comenzamos realizando un estudio descriptivo de cada variable atendiendo al tipo de cada una de ellas. Para las variables categóricas se presentan tablas de frecuencia en las que se indica el tamaño y el porcentaje para cada resultado. Para las variables de tipo numérico que seguían una distribución normal se ofrece la Media, la Desviación Típica y los valores máximo y mínimo, y para aquellas que no seguían una distribución normal, la Mediana y el Rango Intercuartílico.

Analizamos todas las variables de nuestra investigación para estudiar las relaciones de cada una de ellas (marcadores de estrés y respuestas del Cuestionario) con los resultados de calidad seminal, capacitación o daño lipídico seminal. Las relaciones se dividieron entre los Estudios de Asociación por medio del análisis de correlación y los Estudios Comparativos entre grupos de sujetos, según los resultados de calidad seminal, capacitación o daño lipídico seminal. Con este fin se realizaron las tres agrupaciones de sujetos descritas en el apartado 3.2 (Establecimiento de grupos de varones en atención a sus características seminales), de forma resumida:

1. Se creó una variable dependiente partiendo de los parámetros del seminograma más relevantes según la bibliografía consultada, siendo éstos los que cumplieran a la

vez los criterios de la OMS en las variables ITZ, pH, recuento espermático y motilidad progresiva (rápidos + lentos) o (A+B), creándose así dos grupos.

2. Se creó una variable dependiente partiendo de la variable REM usando como punto de corte  $\geq 10 \times 10^6$  según el algoritmo de trabajo de nuestro hospital, creándose así dos grupos.

3. Se creó una variable dependiente partiendo de la variable MDA usando como punto de corte  $\geq 40 \mu\text{g/L}$ , siendo éste el valor de la mediana, creándose así dos grupos.

Para las variables con una distribución normal de los resultados se realizó una prueba bivariada de tipo paramétrico y en caso de no seguir una distribución normal, una de tipo no paramétrico.

Para medir las posibles relaciones entre las variables de tipo normal se aplicaron los siguientes métodos estadísticos:

- Correlación de Pearson en el caso de medir la relación entre dos variables numéricas normales.
- Test ANOVA cuando se tratase de una variable numérica que siguiera una distribución normal con otra de tipo categórico con más de dos categorías que, además, cumpliera las hipótesis básicas de dicha prueba, siendo éstas normalidad e igualdad de varianzas. En el caso de fallar alguna hipótesis se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.
- T de Student para muestras independientes si se trataba de una variable numérica que seguía una distribución normal y una variable categórica de dos categorías.

Para medir las posibles relaciones entre las variables de tipo no normal se aplicaron los siguientes métodos estadísticos:

- Correlación de Spearman en el caso de medir la relación entre dos variables numéricas en el que alguna de ellas no siguiera una distribución normal.
- Test de Kruskal-Wallis si se trataba de una variable numérica, que no siguiera una distribución normal, con otra de tipo categórico con más de dos categorías.
- Prueba U de Mann Whitney si nos encontrábamos ante una variable numérica que no siguiera una distribución normal, y una variable categórica de dos categorías.



A continuación se realizó un estudio de Regresión Logística binaria multivariante tanto de forma asociativa como de forma predictiva.

En el estudio de Regresión Logística de forma asociativa se presenta un modelo ajustado con las variables más relevantes atendiendo al tamaño que se obtiene al eliminar los blancos. Se presenta en una tabla con los Odds Ratio de Prevalencia (ORP) tanto crudos como ajustados, intervalo de confianza (IC) para el ORP al 95%, tamaño de cada grupo, p-valor y ajuste global del modelo mediante la Chi-cuadrado de máxima verosimilitud. Al presentar los ORP crudos y ajustados nos permite comprobar si la variable es confusora o no en el modelo ajustado.

Para el estudio de la Regresión Logística predictiva se ajustó el modelo para aquellas variables que en el estudio bivariado habían sido significativas a través del Método de Wald hacia atrás, mediante curvas de rendimiento diagnóstico o curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). De esta manera valoramos la capacidad diagnóstica de las determinaciones que presentaron diferencias estadísticamente significativas a través del estudio de Sensibilidad y Especificidad. Se excluyeron del estudio las variables que presentaban un tamaño de muestra reducido, con el fin de no perder observaciones y poder estadístico. Para los puntos de corte sugeridos se presentaron los valores de sensibilidad, especificidad, área bajo la curva (ABC) con su intervalo de confianza al 95%, valor pronóstico positivo (VPP) y valor pronóstico negativo (VPN). Se definió como test válido todo aquel cuya ABC era superior a 0,5, siendo éste un valor bueno de exactitud global (Franco et al., 2007). Se presentó el gráfico con las curvas superpuestas para discriminar así el mejor predictor, considerándose que éste era el que presentaba la curva en un nivel superior al resto.







## **RESULTADOS**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 5.1 Evaluación de los métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo

El estudio se centró en la evaluación de la inexactitud analítica, la imprecisión intra e interserial, la linealidad y el límite de detección, se utilizó para ello el protocolo propuesto por González (2004). Métodos y procesos evaluados:

- El método de HPLC para la determinación de MDA y Vitamina C.
- Los métodos espectrofotométricos para la determinación de enzimas antioxidantes en el analizador Cobas (SOD y GPx).
- El método colorimétrico para el análisis de Catalasa (CAT) utilizando el lector automático de ELISA en microplaca de ADALTIS®.
- El método ICP-MS-ORC para la determinación simultánea de Metales y Elementos Traza en plasma seminal.

### 5.1.1 Precisión analítica

Determinamos la imprecisión intraserial (repetibilidad) analizando un espécimen formado por un pool de muestras, de forma repetida (15 veces) en la misma serie de trabajo. Los resultados obtenidos se ofrecen en la tabla 9:

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Tabla 9. Imprecisión intraserial

	<b>VIT C (<math>\mu\text{g/dL}</math>)</b>	<b>MDA (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>GPx (U/L)</b>	<b>SOD (U/mL)</b>	<b>CAT (nmol/min/mL)</b>
1	51,0	12,2	316	52,9	18,32
2	50,5	15,8	321	55,4	18,94
3	48,0	13,9	324	59,1	19,41
4	48,0	11,8	323	45,6	19,02
5	48,5	10,0	324	58,1	19,17
6	47,0	12,7	330	54,1	17,70
7	48,0	11,1	331	56,8	17,85
8	49,5	12,1	328	63,6	19,57
9	47,0	11,5	329	55,5	17,54
10	47,0	12,7	331	56,8	20,66
11	48,0	11,5	338	59,5	19,33
12	49,0	10,3	365	55,3	21,36
13	48,0	10,4	326	48,7	19,96
14	51,0	11,0	334	54,0	20,73
15	50,0	11,8	319	54,3	20,42
<b>Media</b>	48,7	11,9	329	55,3	19,33
<b>Desviación estándar</b>	1,4	1,5	11,5	4,3	1,16
<b>Coefficiente de Variación</b>	2,9	12,4	3,5	7,8	6,0

Determinamos la imprecisión interserial (reproducibilidad) analizando el mismo espécimen formado por un pool de muestras por triplicado, durante 4 días de trabajo consecutivos. Los resultados se recogen en la tabla 10:

Tabla 10. Imprecisión interserial

	<b>VIT C (<math>\mu\text{g/dL}</math>)</b>	<b>MDA (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>GPx (U/L)</b>	<b>SOD (U/mL)</b>	<b>CAT (nmol/min/mL)</b>
<b>DIA 1</b>	22,7	11,3	364	63,2	9,56
<b>DIA 2</b>	18,5	13,0	344	69,5	9,43
<b>DIA 3</b>	21,8	10,8	366	66,3	9,73
<b>DIA 4</b>	21,6	12,8	358	62,2	-
<b>Media</b>	21,2	12,0	358	65,3	9,57
<b>Desviación estándar</b>	1,8	1,1	9,9	3,3	0,15
<b>Coefficiente de Variación</b>	8,7	9,1	2,8	5,1	1,6

### 5.1.2 Exactitud analítica

Para evaluar la inexactitud analítica utilizamos materiales de control con valores asignados mediante métodos definitivos o de referencia. Se escogió dos materiales de control con dos niveles de concentración: bajo y alto para las determinaciones de vitamina C y MDA, y un nivel para las determinaciones enzimáticas. Se analizó cada material por triplicado, en cuatro series de trabajo diferentes. Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 11. Exactitud analítica de Vit C y MDA

	VIT C ( $\mu\text{g/dL}$ )		MDA ( $\mu\text{g/L}$ )	
	BAJO	ALTO	BAJO	ALTO
	5	20	13.4	50.4
<b>DIA 1</b>	5,1	19,5	14,9	39,2
<b>DIA 2</b>	5,0	19,3	12,2	47,7
<b>DIA 3</b>	5,3	21,7	12,9	52,5
<b>DIA 4</b>	5,0	21,3	11,5	52,8
<b>Valor del Control</b>	5	20	13,4	50,4
<b>Media</b>	5,1	20,4	12,9	48,0
<b>Error media relativo (%)</b>	2,0	2,2	-3,7	-4,7

Tabla 12. Exactitud analítica de GPx, SOD y CAT

	GPx (U/L)	SOD (U/mL)	CAT (nmol/min/mL)
		601	351
<b>DIA 1</b>	466	421,4	14,73
<b>DIA 2</b>	569	426,4	13,03
<b>DIA 3</b>	480	416,0	15,54
<b>DIA 4</b>	536	371,6	-
<b>Valor del Control</b>	601,0	351,0	14,00
<b>Media</b>	512,8	408,8	14,40
<b>Error media relativo (%)</b>	-14,6	16,5	2,80



### 5.1.3 Linealidad y límite de detección

Para determinar la linealidad se prepararon, a partir del estándar o control de mayor concentración, cinco soluciones de distinta concentración las cuales se encontraban dentro de los intervalos establecidos para cada tipo de análisis. Se analizaron cada uno de los niveles por duplicado. Para establecer el límite de detección de la técnica, se analizaron diez replicados de un blanco de solución salina, calculándose la media y la desviación estándar de las medidas obtenidas. La linealidad y el límite de detección que se obtuvieron fueron:

Tabla 13. Linealidad, límite de detección y de cuantificación de las distintas técnicas

	VIT C (µg/dL)	MDA (µg/L)	GPx (U/L)	SOD (U/mL)	CAT nmol/min/mL)
<b>Lineal hasta</b>	100	227	1200	3,9	35,00
<b>Límite de detección</b>	0,2	2	7,3	0,2	0,25
<b>Límite cuantificación</b>	0,5	6	22,0	0,6	2,00

### 5.1.4 Optimización del método ICP-MS-ORC para la determinación simultánea de Metales y Elementos Traza en plasma seminal

Para poder realizar la medida de los Metales y Elementos Traza en plasma seminal tuvimos que optimizar el método de ICP-MS-ORC Agilent 7500ce, además de realizar el pre-tratamiento de las muestras ya explicado previamente en el apartado de Métodos. Con ello conseguimos determinar simultáneamente los Metales y Elementos Traza en plasma seminal en 2 minutos, con límites de detección del orden de los ng/L y reduciendo el volumen de muestra a 0,5 mL.

La ausencia de materiales de referencia con la misma matriz que el plasma seminal hizo que fuese necesario utilizar una serie de muestras biológicas para la evaluación del método (repetibilidad, reproducibilidad e incertidumbre). La validación del ICP-MS-ORC para los Metales y Elementos Traza propuestos en plasma seminal dio como resultado: repetibilidad (<10%); reproducibilidad (<13%); incertidumbre (≈15%); límite de detección (<0,05 µg/L). Podemos comprobarlo en la siguiente tabla de resultados de la validación de los Metales y Elementos Traza en semen humano:

Tabla 14. Tabla de resultados de la validación de los Metales y Elementos Traza en semen humano

	REPETIBILIDAD (%)	REPRODUCIBILIDAD (%)	INCERTIDUMBRE (%)	LÍMITE DE DETECCIÓN (µg/L)
Al	5,119	11,442	10,351	0,2
Cd	...	...	...	0,00219
Co	5,415	10,354	8,501	0,00250
Cu	5,207	11,116	8,316	0,38
Cr	7,527	12,908	11,686	0,00658
Fe	7,592	11,308	11,418	0,15
Mn	5,159	12,020	11,102	0,01347
Hg	...	...	...	0,017
Ni	9,780	12,130	13,323	0,00551
Pb	7,322	12,106	11,701	0,0074
Se	8,941	9,876	9,541	0,11
V	5,850	10,425	9,773	0,00088
Zn	7,959	12,451	12,281	0,09

## 5.2 Análisis descriptivo de las variables estudiadas

De los 211 sujetos que se seleccionaron inicialmente para participar en el estudio de acuerdo a los criterios de inclusión descritos, sólo 181 fueron finalmente incluidos por disponer de suficiente muestra seminal para poder realizar todas o, en su defecto, la mayoría de las determinaciones del estudio.

Los apartados siguientes, recogen las tablas y gráficos del análisis descriptivo de la población estudiada.

### 5.2.1 Descriptivo de los datos analíticos

Una vez finalizadas las distintas determinaciones analíticas, realizamos un descriptivo de los resultados obtenidos, tanto del estudio del seminograma como de los marcadores del estatus oxidativo.

### 5.2.1.1 Resultados del seminograma

En primer lugar presentamos los parámetros cualitativos del seminograma, tanto macroscópicos como microscópicos (Tabla 15):

Tabla 15. Parámetros cualitativos del seminograma

	n	% Normales	% Anormales
<b>Aspecto</b>	181	70,7	29,3
<b>Licuefacción</b>	181	61,3	38,7
<b>Consistencia</b>	181	61,9	38,1
<b>Aglutinación</b>	181	96,5	3,5
<b>Células</b>	173	76,9	23,1
<b>Leucocitos</b>	174	88,5	11,5

Todos los parámetros anteriores se encuentran dentro de los valores de referencia de la OMS 1999 en más del 60% de los sujetos.

En cuanto a los parámetros cuantitativos del seminograma, los resultados obtenidos indican que los varones guardaron de media 4 días de abstinencia antes de realizarse el estudio, por lo que cumplieron con las indicaciones de recogida explicadas.

Tabla 16. Días de abstinencia y estudio macroscópico cuantitativos del seminograma

	n	Mediana	RI
<b>Días de abstinencia</b>	180	4,0	3,0 - 4,8
<b>Volumen en mL</b>	181	3,0	2,3 - 4,0
<b>pH</b>	178	8,0	7,9 - 8,1

Los otros 2 parámetros como el volumen y el pH presentaron un valor medio que se encuentra entre los valores de referencia de la OMS, al igual que la concentración de espermatozoides. En cambio, no es el caso de la motilidad espermática, aunque cabe destacar que el porcentaje de motilidad progresiva, con una media de 44,9% ( $\pm 25,8$  DE), se encuentra próximo al valor de 50% que establece la OMS 1999, y de hecho, con los nuevos criterios de la OMS 2010 sí que se encontraría dentro de los valores de referencia ( $\geq 32\%$ ). Estos datos se presentan en las tablas 17-A y 17-B:

Tablas 17-A y 17-B. Concentración y motilidad de los espermatozoides

	n	Mediana	RI
<b>Concentración espermática (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	181	32,0	12,8 – 75,5
<b>Inmóviles (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	178	14,0	6,0 – 27,0
<b>Rápidos (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	176	0,0	0,0 – 2,0
<b>Lentos (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	176	15,0	3,0 – 43,8
<b>Progresivos (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	176	15,0	3,0 – 49,5
<b>No progresivos (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	176	0,5	0,0 – 2,0

	n	Media ± DE	Mínimo	Máximo
<b>Motilidad total (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	176	33,7 ± 41,7	0,0	197,0
<b>% (A + B)</b>	181	44,9 ± 25,8	0,0	97,6

En el caso de las formas normales y el ITZ, las medias se encuentran justo en el límite de normalidad, en cambio la vitalidad presenta una media por debajo de los valores de referencia de la OMS de 1999 (>75%), como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 18. Vitalidad y morfología de los espermatozoides

	n	Media ± DE	Mínimo	Máximo
<b>% Vivos</b>	53	62,0 ± 21,8	0,0	97,0
<b>% Formas normales</b>	170	14,0 ± 8,0	1,0	75,0
<b>% Formas anormales</b>	170	86,2 ± 8,1	25,0	99,0
<b>% Defecto cabeza</b>	170	67,9 ± 11,9	34,0	93,0
<b>% Defecto parte intermedia</b>	170	39,4 ± 12,4	11,0	79,0
<b>% Defecto cola</b>	170	36,3 ± 11,5	9,0	81,0
<b>Índice de teratozoospermia</b>	170	1,6 ± 0,2	1,0	2,2

Por otra parte, se obtuvo una media del REM elevada, mayor de 5 x10<sup>6</sup>, lo que indica que los sujetos, en general, presentaban sémenes que capacitaban bien (Tabla 19).

Tabla 19. Descriptivo del REM

	n	Mediana	RI
REM (x10 <sup>6</sup> )	100	8,55	0,74 – 28,38

Finalmente, en cuanto a las determinaciones bioquímicas en plasma seminal, la fructosa sí que se encuentra entre los valores de referencia de la OMS (120-360 mg/dL), pero para el citrato se obtuvo una media que supera el intervalo de la OMS (200-600 mg/dL). Esto indica que las glándulas sexuales de los sujetos funcionaban correctamente. Las medias se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 20. Determinaciones bioquímicas en plasma seminal

	n	Media ± DE	Mínimo	Máximo
Fructosa (mg/dL)	170	283,1 ± 143,3	9,0	769,0
Citrato (mg/dL)	169	745,2 ± 424,3	1,3	3924,0

### 5.2.1.2 Resultados de los agentes de estrés oxidativo

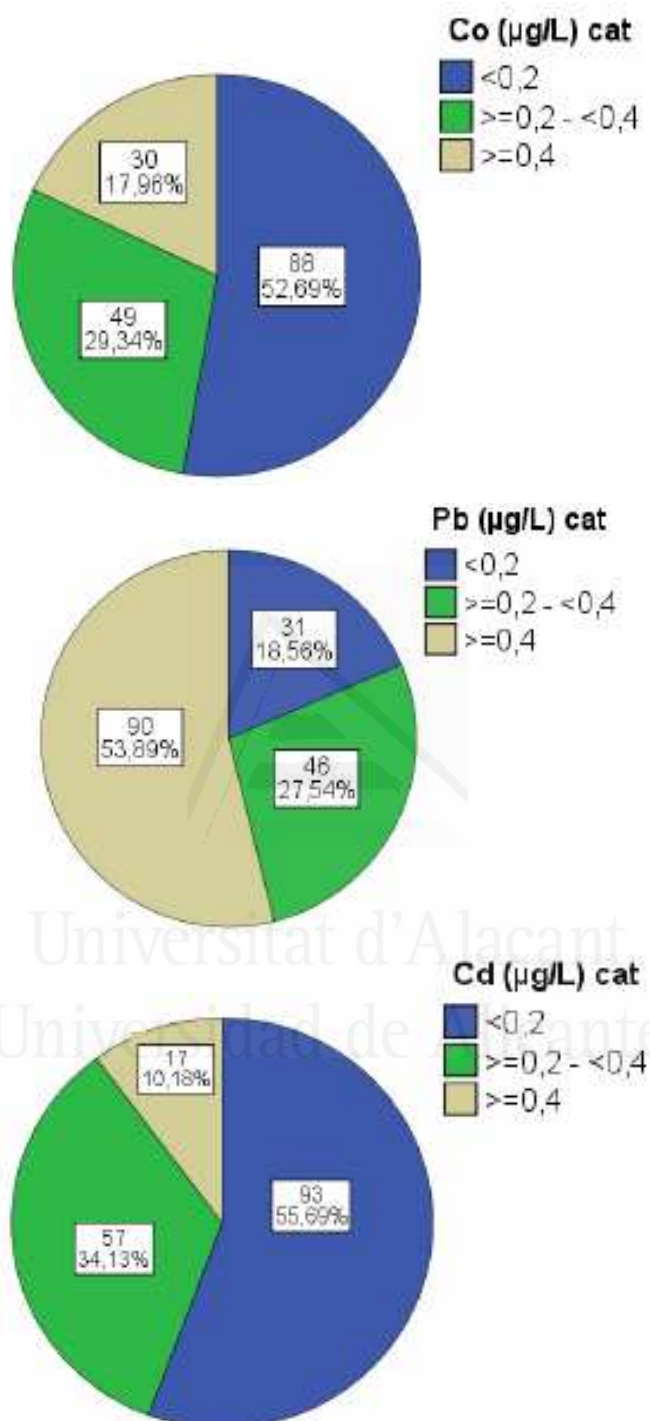
#### 5.2.1.2.1 Resultados de los Metales y Elementos Traza

- Cobalto, Cadmio y Plomo

Debido al escaso volumen de muestra y al elevado número de Metales y Elementos Traza incluidos en el estudio, sólo conseguimos 167 muestras de los 181 pacientes. En ocasiones, la poca cantidad de muestra disponible para determinar la presencia de los metales Cd, Co y Pb nos obligó a tener que diluir la muestra para poder analizarlos, y a subir los límites de detección en función de la dilución. De esta manera obtuvimos valores como (<0,2 µg/L), (≥0,2-<0,4 µg/L), y (≥0,4 µg/L) en la mayoría de los casos, y optamos por exponerlos así para la totalidad de la población analizada.

Tanto para el Co como para el Cd, más del 50% de los sujetos presentaron <0,2 µg/L en el líquido seminal, en cambio para el Pb el 53,9% de los sémenes contenían más de 0,4 µg/L, tal y como se puede observar en los siguientes gráficos:

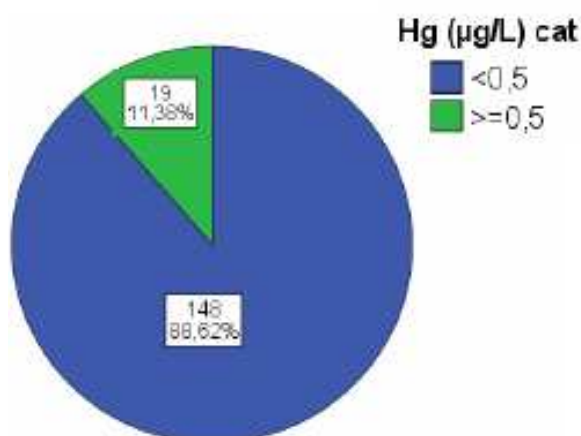
Figuras 30, 31 y 32. Distribución de los varones en función de las concentraciones de los metales Cd, Co y Pb en el plasma seminal



- Mercurio

La mayoría de los resultados obtenidos en las determinaciones de Hg eran variables continuas, pero también obtuvimos un gran número de muestras con resultado  $<0,5 \mu\text{g/L}$ , por ello decidimos agruparlos en ( $<0,5 \mu\text{g/L}$ ) y ( $\geq 0,5 \mu\text{g/L}$ ). De esta manera la distribución de los 167 valores queda:

Figura 33. Distribución de los varones en función de las concentraciones de Hg en el plasma seminal



▪ Aluminio, Cobre, Cromo, Hierro, Manganeso, Níquel, Selenio, Vanadio y Zinc  
El resto de los metales analizados se trataron como variables continuas, así los valores medios obtenidos fueron (Tablas 21 y 22):

Tablas 21. Descriptivo de los metales Cr, Se y Zn

	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	167	2,27 $\pm$ 0,75	0,90	4,67
Se ( $\mu\text{g/L}$ )	167	66,43 $\pm$ 25,65	16,58	150,10
Zn ( $\mu\text{g/mL}$ )	167	152,93 $\pm$ 98,47	12,15	781,70

Tablas 22. Descriptivo de los metales Al, Cu, Fe, Mn, Ni y V

	n	Mediana	RI
Al ( $\mu\text{g/L}$ )	167	15,84	11,07 - 27,30
Cu ( $\mu\text{g/L}$ )	167	59,24	45,46 - 77,29
Fe ( $\mu\text{g/L}$ )	167	86,44	73,28 - 110,60
Mn ( $\mu\text{g/L}$ )	167	2,62	1,87 - 4,06
Ni ( $\mu\text{g/L}$ )	167	2,21	1,59 - 3,24
V ( $\mu\text{g/L}$ )	164	0,37	0,28 - 0,48

El metal presente en mayor concentración entre todos los analizados es el Zn, con un valor medio de 152,93  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm$  98,47 DE) en plasma seminal, le sigue pero con mucha diferencia el Fe, el Se y el Cu.

### 5.2.1.2.2 Resultados de las defensas antioxidantes

También realizamos el descriptivo de las defensas antioxidantes, tanto de las enzimas como de las vitaminas estudiadas.

- Vitaminas

Los resultados obtenidos de las vitaminas estudiadas en plasma seminal fueron:

Tabla 23. Descriptivo de las vitaminas antioxidantes estudiadas.

	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
VIT C ( $\mu\text{g/dL}$ )	164	56,87 $\pm$ 43,16	1,00	253,00
VIT B <sub>12</sub> (pg/mL)	149	1088,23 $\pm$ 579,14	83,00	4178,00
	n	Mediana	RI	
FOLATO (ng/mL)	155	9,60	6,80 - 12,70	

- Enzimas antioxidantes

De igual manera, las medianas de las 3 enzimas antioxidantes estudiadas en plasma seminal se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 24. Descriptivo de las enzimas antioxidantes estudiadas

	n	Mediana	RI
SOD (U/mL)	171	234,80	160,80 - 310,40
GPx (U/L)	172	9737,50	8979,00 - 11326,25
CAT (nmol/min/mL)	132	14,42	10,46 - 19,40

### 5.2.1.2.3 Resultados de productos de oxidación: MDA

Por último se determinó la peroxidación lipídica presente en el plasma seminal, mediante la cuantificación de los niveles de malondialdehído (MDA).

Tabla 25. Descriptivo del MDA

	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
MDA ( $\mu\text{g/L}$ )	163	39,88 $\pm$ 16,68	9,50	105,90



## 5.2.2 Descriptivo de las respuestas del Cuestionario socio-demográfico y clínico

A continuación se presenta el estudio descriptivo que realizamos con las respuestas del Cuestionario Socio-Demográfico y Clínico.

El número de cuestionarios cumplimentados por los sujetos del estudio fue de 170, los 11 restantes no fueron contestados correctamente o ni siquiera lo realizaron alegando distintos motivos.

Para facilitar el estudio estadístico con los datos obtenidos en el Cuestionario, se ha realizado una agrupación en el tipo de fármacos (según su actividad terapéutica) y en la profesión (según sea trabajo sedentario, con esfuerzo físico o sin trabajo actual).

En un primer sondeo se tomaron sólo las preguntas con respuesta si/no en los siguientes apartados:

- Consumo de fármacos (en los últimos 2 meses).
- Uso de vasodilatadores (en los últimos 2 meses).
- Consumo de alcohol.
- Consumo de drogas.
- Realiza ejercicio físico.

En el caso de que hubiera una distribución entre las dos posibles respuestas, sin que una de ellas resultara mayoritaria, se habría estudiado la influencia de las cantidades y de las frecuencias correspondientes, pero no fue así, por ello no las exponemos.

### 5.2.2.1 Datos clínicos

- Edad e Índice de masa corporal (IMC)

La media de edad de los sujetos ronda los 35 años, con un Índice de Masa Corporal medio superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, lo que indica que los sujetos presentaban sobrepeso según las recomendaciones formuladas por la Consulta de Expertos de la OMS en Obesidad, celebrada en 1997 (WHO, 2000b). Estos datos se presentan en la tabla 26.

Tabla 26. Descriptivo de la edad y del IMC

	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
Edad (años)	168	35,27 $\pm$ 4,24	23,00	49,00
	n	Mediana	RI	
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	162	26,11	24,56 - 28,34	

- Hijo/s con otra pareja

El 90,9% de los sujetos declaró no haber tenido descendencia previamente con otra pareja.

Tabla 27. Descriptivo de fertilidad previa demostrada

	n	No (%)	Sí (%)
¿Ha tenido hijos con otra pareja?	165	90,9	9,1

- Presencia de enfermedades y consumo de medicamentos

La mayoría de los participantes de este estudio no padecía ninguna enfermedad crónica (90,5%), por leve que fuera, ni ninguna afección en menos de 3 meses (94,7%). En concreto, se les preguntó si habían pasado fiebre en los 3 meses anteriores a la recogida de la muestra, respondiendo de forma negativa el 95,8% de los sujetos y de los que declararon haberla sufrido ninguno de ellos superó los 38°C.

Tabla 28. Enfermedades e ingesta de fármacos

	n	No (%)	Sí (%)
¿Padece alguna enfermedad crónica?	169	90,5	9,5
¿Ha padecido alguna enfermedad reciente (menos 3 meses)?	169	94,7	5,3
¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?	168	95,8	4,2
¿Ha consumido vasodilatadores?	169	98,8	1,2
¿Ha consumido fármacos durante los últimos 2 meses?	169	48,5	51,5

En cuanto al consumo de fármacos, el 98,8% no había consumido vasodilatadores nunca, y de los que confesaron haber consumido algún fármaco (48,5%) en la mayoría de los casos lo hizo solamente un día.

A los varones que habían consumido algún medicamento, se les preguntó sobre el tipo de fármaco. La respuesta fue muy variada, los consumidos con mayor frecuencia fueron: antibióticos, analgésicos, antihistamínicos y antiinflamatorios. Sólo el 1,2% había sido tratado con vasodilatadores.

### 5.2.2.2 Hábitos de vida

- Déficits dietéticos

Más del 50% de los sujetos estudiados cumplían las recomendaciones dietéticas respecto al consumo de limón, tomate, hortalizas de hoja verde, carne, leche, queso, aceite de oliva y frutos secos. Por el contrario, en el consumo de naranja, kiwi, zanahoria, calabaza o calabacín, huevo y aceites vegetales, más del 50% no alcanzaban las recomendaciones. Ver tabla 29.

Tabla 29. Descriptivo de la ingesta de nutrientes antioxidantes

	n	No (%)	Sí (%)
<b>Ingiera limón como complemento al menos 2 veces a la semana</b>	165	43,6	56,4
<b>Ingiera naranja 2/3 veces por semana</b>	167	56,9	43,1
<b>Ingiera tomate 3 o más veces por semana</b>	169	21,3	78,7
<b>Ingiera kiwi 1 vez a la semana</b>	167	82,6	17,4
<b>Ingiera zanahoria al menos 2 veces por semana</b>	168	60,1	39,9
<b>Ingiera calabaza o calabacín al menos 1 vez por semana</b>	164	60,4	39,6
<b>Ingiera brócoli, espinacas y/o hortalizas al menos 2 veces por semana</b>	154	22,1	77,9
<b>Ingiera huevo 4 veces por semana</b>	168	63,7	36,3
<b>Ingiera carne 2/3 veces por semana</b>	169	3,6	96,4
<b>Bebe leche 1-2 vasos diariamente</b>	169	30,2	69,8
<b>Ingiera queso al menos 3 veces por semana</b>	169	21,3	78,7
<b>Ingiera aceites vegetales diariamente</b>	167	65,9	34,1
<b>Ingiera aceite de oliva diariamente</b>	169	9,5	90,5
<b>Ingiera avellanas, nueces almendras al menos 1 vez por semana</b>	165	40,0	60,0
<b>¿Ha consumido algún complejo vitamínico en los últimos 2 meses?</b>	169	82,8	17,2
<b>¿Ha consumido algún concentrado dietético en los últimos 2 meses?</b>	166	95,2	4,8

En los últimos 2 meses el 82,8% no había consumido ningún tipo de complejo vitamínico, ni el 95,2% ningún concentrado dietético.

- Consumo de Tóxicos

A los sujetos se les preguntó también sobre sus costumbres en cuanto al consumo de tóxicos, tanto de drogas legales (tabaco y alcohol) como ilegales. Los datos reclutados se exponen a continuación:

Tabaco y Alcohol:

Tabla 30. Consumo de tabaco y alcohol

	n	No (%)	Sí (%)
¿Es fumador?	168	64,9	35,1
¿Acostumbra a estar en ambientes cargados de humo de tabaco?	126	72,2	27,8
¿Ha bebido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses?	168	61,9	38,1

Menos del 50% era fumador y/o refería encontrarse en ambientes cargados de humo de tabaco habitualmente. Sólo el 22% de los sujetos que confesaron ser fumadores, fumaban más de 10 cigarrillos al día, como se observa en la tabla siguiente:

Tabla 31. Frecuencia de consumo de tabaco

	n	No fumador (%)	Ex Fumador (%)	≤10 cig/día (%)	>10 cig/día (%)
<b>Sujetos</b>	168	41,7	23,2	13,1	22

Por otro lado, sólo un 38,1% de los sujetos reconocía haber consumido con frecuencia alcohol en los 3 últimos meses y, en su caso, la media de consumo era de 3,35 g de alcohol al día.

Tabla 32. Cantidad de ingesta de alcohol/día

	n	Media ± DE	Mínimo	Máximo
<b>Ingesta de alcohol (g/día)</b>	167	3,35 ± 8,09	0	50,70

Este consumo se sitúa muy por debajo del límite de riesgo para la salud según la OMS, que para varones es de 40 g/día. (Ezzati et al., 2004; Anderson et al., 2008).

## Drogas:

En las tablas siguientes (33 y 34) se muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del consumo de drogas ilegales. Los sujetos que refirieron haber consumido en algún momento algún tipo de droga contestaron si lo habían hecho en los 3 últimos meses.

Tabla 33. Consumo de droga en los últimos 3 meses

	n	No (%)	Sí (%)
<b>Sujetos</b>	168	76,2	23,8

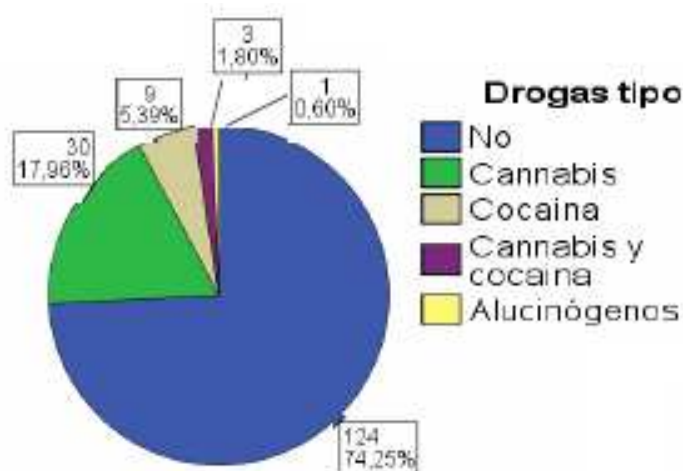
Tabla 34. Frecuencia del consumo de droga

	n	No (%)	Esporádicamente (%)	Semanalmente (%)	Diariamente (%)
<b>Sujetos</b>	168	76,2	18,5	1,2	4,2

El 25,7% confesó consumir o haber consumido drogas en algún momento. De ellos, el 23,8% lo había hecho en los últimos 3 meses, pero el 18,5% declaró hacerlo de forma esporádica.

La droga más consumida fue el cannabis (18,0%) seguida de la cocaína (5,4%), y un pequeño grupo de sujetos (1,8%) confesó consumir ambas.

Figura 34. Distribución de los varones en función del tipo de droga consumida



- Sedentarismo.

También tuvimos en cuenta el hábito sedentario de los sujetos, los resultados se presentan a continuación:

Tabla 35. Hábito sedentario de los sujetos

	n	No (%)	Sí (%)
<b>Sujetos que realizan ejercicio físico</b>	168	30,4	69,6

El 69,6% de los sujetos afirmaron realizar ejercicio físico, pero sólo lo practicaban diariamente el 21,4% de ellos.

Tabla 36. Frecuencia de la práctica de ejercicio físico

	n	Diariamente (%)	De 2 a 3 días a la semana (%)	Nada o Esporádicamente (%)
<b>Sujetos</b>	168	21,4	47,6	31,0

Los tipos de deporte también fueron muy diversos, la gran mayoría de los que declararon practicar ejercicio andaba una hora al día, y/o acudía al gimnasio, el resto también practicaba natación, padel, ciclismo, deporte intenso...aunque de forma esporádica.

### 5.2.2.3 Datos socio-demográficos.

- Raza y País de nacimiento.

La sección de datos socio-demográficos la comenzamos considerando la raza de los sujetos y su nacionalidad. Estos datos se exponen a continuación:

Tabla 37. Raza

	n	Blanca (%)	Negra (%)
<b>Sujetos</b>	164	96,3	3,7

Tabla 38. País de nacimiento

	n	España (%)	Otros (%)
<b>Sujetos</b>	163	81,0	19,0

- Profesión.

Continuamos con el tipo de profesión y sus condiciones laborales, para ello les preguntamos por el esfuerzo físico requerido en su puesto de trabajo y, a su vez, si conllevaba estrés laboral.

Tabla 39. Tipo de profesión

	n	Trabajo con esfuerzo físico (%)	Trabajo sedentario (%)
<b>Sujetos</b>	157	52,2	47,8

El 47,8% de los sujetos tenían un puesto de trabajo sedentario, que no suponía ningún esfuerzo físico (trabajo de oficina). Ante la pregunta de si su puesto de trabajo conllevaba estrés, el 78,9% contestó afirmativamente, aunque realmente sólo el 18% reconoció un nivel de estrés intenso. Ver tabla 40.

Tabla 40. Estrés laboral en la profesión

	n	No (%)	Leve (%)	Moderado (%)	Intenso (%)
<b>Sujetos</b>	161	21,1	18,6	42,2	18,0

#### 5.2.2.4 Datos ambientales.

Para finalizar con el Cuestionario solicitamos información sobre el lugar de residencia y sus condiciones ambientales.

La tabla siguiente muestra la distribución de frecuencias de la población de estudio en función del lugar de residencia en el momento del reclutamiento. Este parámetro se estableció mediante la estimación del número de habitantes del lugar de residencia, clasificando la variable como “residencia rural” cuando la población era menor de 10.000 habitantes y “residencia urbana” para poblaciones con un número de habitantes igual o mayor a 10.000 (Tabla 41).

Tabla 41. Lugar de residencia

	n	Medio rural (%)	Pueblo o ciudad de tamaño medio (%)	Gran ciudad (%)
<b>Sujetos</b>	163	7,4	24,5	68,1

También se recogió información sobre si los varones mantenían contacto con sustancias tóxicas, ya fuera directa o indirectamente, en su lugar de trabajo o por la presencia de industrias próximas a sus hogares que pudieran desprender este tipo de sustancias. La mayoría de los sujetos no estaba en contacto con ninguna sustancia tóxica ni en su lugar de trabajo (70,7%) ni en su residencia (92,8%). Tampoco tenían cerca de su hogar ninguna industria que trabajara con productos tóxicos (94,6%).

Tabla 42. Contacto directo con alguna sustancia tóxica

	n	No (%)	Sí (%)
<b>En su profesión</b>	164	70,7	29,3
<b>En el lugar de residencia</b>	167	92,8	7,2

Tabla 43. Contacto indirecto con alguna sustancia tóxica en el lugar de residencia

	n	No (%)	Sí (%)
<b>Sujetos</b>	167	94,6	5,4

De los sujetos que reconocieron estar en contacto con alguna sustancia tóxica, sólo mantenían este contacto diariamente el 16,6% en su lugar de trabajo, y el 3,1% en su hogar (Tabla 44).

Tabla 44. Frecuencia de contacto con alguna sustancia tóxica

	n	NP (%)	Diariamente (%)	Semanalmente / Mensualmente (%)
<b>En su profesión</b>	163	71,2	16,6	12,3
<b>En el lugar de residencia</b>	160	92,5	3,1	4,4

El tipo de exposición al producto tóxico más frecuente fue por inhalación, un 14,1% lo mantenía en su lugar de trabajo, y un 4,5% en su lugar de residencia.

Tabla 45. Tipo de exposición a alguna sustancia tóxica

	n	NP	Inhalación (%)	Contacto directo (%)	Inhalación y contacto directo (%)
<b>En su profesión</b>	163	71,2	14,1	4,3	10,4
<b>En el lugar de residencia</b>	155	92,9	4,5	1,3	1,3



## **5.3 Estudios de relación de los diferentes agentes implicados en el estrés oxidativo**

Una vez analizadas la distribución y las medidas de tendencia central de las variables, decidimos estudiar las relaciones existentes entre los diferentes agentes implicados en el estrés oxidativo y las variables del semen, así como las respuestas del Cuestionario, considerando por un lado todos los sujetos del estudio en general, y por otro dividiéndolos en grupos.

En el primer caso, las relaciones se evaluaron estudiando las asociaciones entre los parámetros que valoran la calidad del semen o la capacitación espermática, las variables incluidas en el Cuestionario Socio-Demográfico y Clínico, y los marcadores de estrés oxidativo por medio de análisis de correlación.

Para el segundo caso, las comparaciones se realizaron en 3 modelos de agrupación de sujetos. En primer lugar nos basamos en los resultados de los parámetros más significativos del seminograma (concentración, morfología y movilidad espermática). En segundo lugar en función del REM, y en tercer lugar de los resultados del MDA (principal indicador de la presencia de estrés oxidativo). De esta manera clasificamos a los varones en base a los 3 puntos clave de nuestro estudio: la calidad seminal, la capacitación espermática y la peroxidación lipídica en el plasma seminal.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación, pero debido a su elevado volumen, en la mayoría de los casos sólo se exponen aquellos de los que obtuvimos relaciones estadísticamente significativas, para tratar de evitar tanto repeticiones como una sucesión de datos de poco interés.

### **5.3.1 Estudios de asociación entre las variables estudiadas**

Comenzamos estudiando las asociaciones existentes entre todas las variables estudiadas para conocer el tipo de relación que hay entre ellas.

#### **5.3.1.1 Asociación de los resultados de las respuestas del Cuestionario socio-demográfico y clínico con las distintas variables analíticas**

En primer lugar nos propusimos conocer qué variables socio-demográficas y clínicas recogidas por el Cuestionario se asociaban con la calidad seminal y con el estatus oxidativo en plasma seminal. Los resultados obtenidos se presentan en los siguientes 4 subapartados:

### 5.3.1.1.1 Asociación con los parámetros del seminograma y de la capacitación espermática

Los parámetros del seminograma que correlacionamos con las respuestas del Cuestionario fueron aquellos que considerábamos que representaban los aspectos más importantes de la calidad seminal, como son la concentración de espermatozoides, la motilidad, su morfología y su capacitación.

Por un lado, observamos que tanto la concentración espermática ( $p=0,009$ ) como el REM ( $p<0,001$ ) se asociaban con el país de nacimiento, siendo la mediana en ambos casos menor en los sujetos cuyo país de nacimiento era España. A su vez, el REM se asociaba con el contacto con tóxicos en el lugar de trabajo ( $p=0,039$ ), de manera que se encontraron valores mayores de REM en aquellos varones que sí que habían tenido contacto, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 46-A. Relación entre los parámetros del seminograma y las respuestas del Cuestionario

<b>Concentración espermática (<math>\times 10^6/\text{mL}</math>)</b>			
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>
<b>País de nacimiento</b>			
España	132	30,0	0,009*
Otros	31	63,0	
<b>REM (<math>\times 10^6</math>)</b>			
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>
<b>País de nacimiento</b>			
España	78	5,82	<0,001*
Otros	10	51,25	
<b>¿En su profesión está en contacto con tóxicos?</b>			
No	67	5,95	0,039*
Sí	21	25,00	

\* $p<0,05$

Por otro lado, la motilidad total se correlacionó positivamente con la edad ( $n=161$ ;  $r=0,157$ ;  $p=0,046$ ), es decir, que los sujetos de mayor edad disponían de una mejor motilidad total.

A su vez, respecto a la morfología espermática, observamos una asociación estadísticamente significativa entre las formas anormales y la ingesta de kiwi

( $p=0,019$ ), siendo mayor la media de formas anormales en aquellos varones que consumían kiwi más de una vez a la semana.

Por último, el ITZ se asociaba con el consumo de drogas, puesto que nos encontramos un ITZ mayor cuando el sujeto reconocía haber consumido drogas ( $p=0,012$ ), sobre todo si el consumo era esporádico ( $p=0,024$ ). Por otra parte se asociaba con el país de nacimiento ( $p=0,016$ ), siendo el ITZ mayor para los sujetos nacidos en España (Tabla 46-B).

Tabla 46-B. Relación entre los parámetros del seminograma y las respuestas del Cuestionario

<b>Formas anormales (%)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ingiere kiwi 1 vez a la semana</b>				
No	129	85,6	8,5	0,019*
Sí	28	89,6	5,5	
<b>ITZ</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ha consumido drogas?</b>				
No	116	1,624	0,215	0,012*
Sí	42	1,718	0,176	
<b>Frecuencia consumo de drogas en los últimos 3 meses</b>				
No	120	1,625	0,212	0,024*
Esporádicamente	29	1,743	0,184	
Semanal-diario	9	1,655	0,169	
<b>País de nacimiento</b>				
España	123	1,669	0,198	0,016*
Otros	30	1,570	0,200	

\* $p<0,05$

### 5.3.1.1.2 Asociación con los niveles de Metales y Elementos Traza

Al analizar la relación “presencia de fiebre en los últimos 3 meses” con los distintos Metales y Elementos Traza, se encontró diferencias estadísticamente significativas para el Cu ( $p=0,008$ ), Mn ( $p=0,011$ ), Se ( $p=0,025$ ) y Zn ( $p=0,026$ ). En los cuatro casos los valores medios de los metales fueron mayores en el grupo de sujetos que no había padecido fiebre.

En cuanto al país de nacimiento también se hallaron diferencias entre aquellos que habían nacido en España y los que habían nacido en otro país, para el Cu ( $p=0,027$ ), Mn ( $p=0,016$ ), y Cr ( $p=0,044$ ), siendo los valores medios de los tres metales mayores en el grupo de sujetos de otro país.

Solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el Cu ( $p=0,029$ ) cuando se preguntó sobre el consumo de tabaco. Aquellos sujetos que no habían fumado presentaban una mediana mayor que los que sí lo hacían, ya fuera actualmente o con anterioridad.

Para el Ni se encontraron asociaciones con la presencia de alguna enfermedad en menos de 3 meses, con el consumo de drogas y con la práctica de ejercicio físico. Se obtuvieron medianas del metal más elevadas en el caso de no haber padecido ninguna enfermedad ( $p=0,028$ ), ante la confesión de haber consumido drogas ( $p=0,001$ ), sobre todo en aquellos que lo hacía de forma semanal o diaria ( $p=0,017$ ) y finalmente, en los que sí realizaban ejercicio físico ( $p=0,041$ ).

El V presentó asociaciones con dos parámetros del Cuestionario. Por un lado, al igual que el Ni, presentó una mediana superior en aquellos sujetos que habían consumido drogas diariamente ( $p=0,043$ ), y por otro, en aquellos que declararon que cerca de su hogar se encontraba alguna industria que trabajara con tóxicos ( $p=0,012$ ).

Por último, el Cr registró asociaciones con dos parámetros más del Cuestionario. En primer lugar, al igual que el V, alcanzó una mediana superior en aquellos sujetos que declararon que cerca de su hogar se encontraba alguna industria que trabajara con tóxicos ( $p=0,029$ ), y por otro, en aquellos que su profesión no conllevaba estrés laboral ( $p=0,010$ ).

Todo lo anteriormente comentado se incluye sintetizado en las tablas 47-A y 47-B.

Tablas 47-A. Relación entre los Metales y Elementos Traza con las respuestas del Cuestionario

<b>Cu (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>			
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?</b>			
No	149	59,60	0,008*
Sí	6	41,14	
<b>Frecuencia de consumo de tabaco</b>			
No fumador	63	67,51	0,029*
Ex fumador	37	59,10	
≤ 10 cig/día	20	56,46	
> 10 cig/día	35	53,96	
<b>País de nacimiento</b>			
España	121	58,13	0,027*
Otros	29	69,40	

\* $p < 0,05$ 

<b>Mn (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>			
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?</b>			
No	149	2,66	0,011*
Sí	6	1,62	
<b>País de nacimiento</b>			
España	121	2,55	0,016*
Otros	29	3,56	

\* $p < 0,05$

Ni ( $\mu\text{g/L}$ )			
	n	Mediana	P-valor
<b>¿Ha padecido alguna enfermedad reciente (menos de 3 meses)?</b>			
No	148	2,23	0,028*
Sí	8	1,58	
<b>¿Ha consumido drogas?</b>			
No	115	2,10	0,001*
Sí	40	2,65	
<b>Frecuencia consumo de drogas en los últimos 3 meses</b>			
Sin exposición	119	2,11	0,017*
Exposición semanal/mensual	27	2,57	
Exposición diaria	9	2,72	
<b>¿Realiza ejercicio físico?</b>			
No	49	2,04	0,041*
Sí	106	2,33	

\* $p < 0,05$ 

V ( $\mu\text{g/L}$ )			
	n	Mediana	P-valor
<b>Frecuencia consumo de drogas en los últimos 3 meses</b>			
Sin exposición	134	0,34	0,043*
Exposición semanal/mensual	7	0,52	
Exposición diaria	4	0,53	
<b>¿Cerca de su hogar hay industrias que trabajen con productos tóxicos?</b>			
No	140	0,34	0,012*
Sí	11	0,52	

\* $p < 0,05$

Tabla 47-B. Relación entre los Metales y Elementos Traza con las respuestas del Cuestionario

<b>Cr (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>País de nacimiento</b>				
España	121	2,23	0,75	0,044*
Otros	29	2,55	0,74	
<b>¿Su profesión conlleva estrés laboral?</b>				
No	30	2,61	0,69	0,010*
Sí	118	2,21	0,75	
<b>¿Cerca de su hogar hay industrias que trabajen con productos tóxicos?</b>				
No	143	2,25	0,73	0,029*
Sí	11	2,76	0,94	
<b>Se (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?</b>				
No	149	67,99	25,70	0,025*
Sí	6	43,90	19,19	
<b>Zn (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?</b>				
No	149	156,74	100,21	0,026*
Sí	6	64,62	29,71	

\* $p < 0,05$ 

Los metales Cd ( $p=0,005$ ), Co ( $p=0,008$ ) y Hg ( $p=0,044$ ), se asociaron con resultados significativos ante la pregunta de si los sujetos habían demostrado fertilidad con otra pareja anteriormente. En los tres casos predominó la respuesta negativa.

También se encontraron asociaciones entre aquellos sujetos que declararon haber consumido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses y la concentración de Hg ( $p=0,023$ ). La mayoría de los sujetos con una concentración de Hg menor de  $0,5 \mu\text{g/L}$  en el plasma seminal no había consumido alcohol, en cambio, aquellos que admitieron consumir predominaba una concentración superior o igual a  $0,5 \mu\text{g/L}$  de Hg.

En el caso del Pb, se encontró una asociación con el lugar de residencia de los sujetos, puesto que la mayoría de ellos se encontraban en el grupo de los que vivían en una gran ciudad ( $p=0,049$ ).

Todos estos resultados se presentan de forma sintética en las tablas 47-C y 47-D:

Tabla 47-C. Relación entre los Metales y Elementos Traza con las respuestas del Cuestionario

¿Ha tenido hijos con otra pareja?					
	NO		SÍ		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Cd</b>					
<0,2	80	93,0	6	7,0	0,005*
$\geq 0,2$ -<0,4	48	92,3	4	7,7	
$\geq 0,4$	10	66,7	5	33,3	
<b>Co</b>					
<0,2	79	95,2	4	4,8	0,008*
$\geq 0,2$ -<0,4	38	90,5	4	9,5	
$\geq 0,4$	21	75,0	7	25,0	
<b>Hg</b>					
<0,5	125	91,9	11	8,1	0,044*
$\geq 0,5$	13	76,5	4	23,5	

\* $p < 0,05$



Tabla 47-D. Relación entre los Metales y Elementos Traza con las respuestas del Cuestionario.

¿Ha bebido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses?					
	NO		Sí		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Hg</b>					
<0,5	87	64,0	49	36,0	0,023*
≥0,5	7	36,8	12	63,2	
Lugar de residencia					
	Medio rural, pueblo o ciudad tamaño medio		Gran ciudad		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Pb</b>					
<0,2	5	20,8	19	79,2	0,049*
≥0,2-<0,4	11	24,4	34	75,6	
≥0,4	34	42,0	47	58,0	

\* $p < 0,05$ 

Al estudiar los hábitos dietéticos de los sujetos, también encontramos asociaciones estadísticamente significativas con algunos metales. El Al se asociaba con la ingesta de naranja ( $p=0,004$ ) y de tomate ( $p=0,034$ ) al menos 3 veces por semana, siendo la mediana de este metal superior en el caso de que los sujetos cumplieran las recomendaciones dietéticas. El Mn se asociaba con la ingesta diaria de aceite de oliva ( $p=0,027$ ), pero en este caso la mediana era mayor para los sujetos que no lo consumían con esta frecuencia. Finalmente el Zn se asociaba con la ingesta de brócoli, espinacas y/o hortalizas de hoja verde ( $p=0,021$ ), siendo la mediana del metal más elevada en los sujetos que sí consumían este tipo de hortalizas al menos 2 veces a la semana. Los resultados se exponen en la tabla 48.

Tabla 48. Relación entre los Metales y Elementos Traza con los hábitos dietéticos de los sujetos

<b>Al (µg/L)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>	
<b>¿Ingiera naranja 2-3 veces por semana?</b>				
No	90	14,36	0,004*	
Sí	64	17,96		
<b>¿Ingiera tomate 3 o más veces por semana?</b>				
No	32	14,07	0,034*	
Sí	124	16,55		
<b>Mn (µg/L)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-valor</b>	
<b>¿Ingiera aceite de oliva diariamente?</b>				
No	13	4,05	0,027*	
Sí	143	2,53		
<b>Zn (µg/mL)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>¿Ingiera brócoli, espinacas y/o hortalizas de hoja verde al menos 2 veces por semana?</b>				
No	32	117,48	69,31	0,021*
Sí	111	162,26	102,03	

\* $p < 0,05$ 

### 5.3.1.1.3 Asociación con los niveles de vitaminas y enzimas

En este apartado estudiamos la posible asociación existente entre las variables clínicas y socio-demográficas de los sujetos, con las defensas antioxidantes. Se encontraron las asociaciones que se reflejan en las tablas 49-A y 49-B.

La vitamina C se asociaba con el consumo de tabaco, tanto en la frecuencia de consumo ( $p=0,013$ ) como en la exposición a ambientes cargados de humo de tabaco ( $p=0,005$ ). En ambos casos se encontraron concentraciones de la vitamina C superiores en los supuestos donde no había exposición al tabaco. A su vez, se encontró una asociación con la presencia de industrias que trabajaran con productos tóxicos cerca del hogar, en este caso las concentraciones más altas de las vitaminas correspondían a aquellos sujetos que negaron tal presencia ( $p=0,002$ ).

Al abordar las asociaciones con la vitamina B<sub>12</sub> se encontraron cuatro formas de relación. La primera, que los varones hubieran tenido fiebre en los últimos tres meses ( $p < 0,001$ ), siendo la media de la vitamina superior en aquellos que no la habían padecido. En segundo lugar con la práctica de ejercicio físico, tanto si lo realizaban como con la frecuencia con la que lo llevaban a cabo, encontrando que las concentraciones de las vitaminas eran superiores en los sujetos que sí practicaban ejercicio ( $p = 0,011$ ), y en concreto en aquellos que lo hacían diariamente ( $p = 0,006$ ). Por último, se asoció también al país de nacimiento del sujeto, los de nacionalidad española presentaban concentraciones de la vitamina en plasma seminal menores que los no nacionales ( $p = 0,031$ ).

En lo que respecta al folato sólo se encontró una asociación con la práctica de ejercicio físico, los varones que realizaban ejercicio presentaban concentraciones superiores de la vitamina en el plasma seminal ( $p = 0,026$ ).

Respecto a las enzimas, sólo se encontraron asociaciones con la SOD. Ésta se asociaba con la frecuencia de consumo de alcohol ( $p = 0,045$ ), siendo la concentración mayor en aquellos sujetos que no lo consumían. También se encontró una asociación con el país de nacimiento ( $p = 0,025$ ), los varones que no eran de nacionalidad española presentaban las mayores concentraciones de SOD. Por último, se encontraron asociaciones con el contacto con tóxicos ( $p = 0,012$ ), su frecuencia ( $p = 0,035$ ) y si dicho contacto procedía de una industria cerca del hogar ( $p = 0,026$ ). En estos casos se observó que aquellos sujetos que estaban en contacto con tóxicos sobre todo de forma diaria, presentaban concentraciones de SOD más elevadas, al igual que aquellos que declararon tener una industria cerca de casa (Tabla 49-A).

Tablas 49-A. Relación entre las variables vitaminas y enzimas con las respuestas del Cuestionario

VIT C ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )				
	n	Media	DE	P-valor
<b>Frecuencia de consumo de tabaco</b>				
No fumador	63	68,28	44,02	0,013*
Ex fumador	37	64,05	45,14	
≤ 10 cig/día	21	39,48	38,57	
> 10 cig/día	32	45,42	45,42	
<b>¿Acostumbra a estar en ambientes cargados de humo de tabaco?</b>				
No	82	65,07	46,67	0,005*
Sí	33	39,32	36,48	
<b>¿Cerca de su hogar hay industrias que trabajen con productos tóxicos?</b>				
No	143	60,31	44,13	0,002*
Sí	9	28,00	22,18	

\* $p < 0,05$ 

VIT B <sub>12</sub> (pg/mL)				
	n	Media	DE	P-valor
<b>¿Ha tenido fiebre en los últimos 3 meses?</b>				
No	133	1107,62	584,76	<0,001*
Sí	6	586,00	191,44	
<b>¿Realiza ejercicio físico?</b>				
No	43	900,49	470,20	0,011*
Sí	96	1171,94	614,14	
<b>Frecuencia de ejercicio físico</b>				
Nada o esporádicamente	44	922,75	487,60	0,006*
2-3 días a la semana	66	1077,59	628,29	
Diariamente	29	1362,24	535,65	
<b>País de nacimiento</b>				
España	106	1043,05	526,55	0,031*
Otros	28	1313,68	769,00	

\* $p < 0,05$

FOLATO (ng/mL)			
	n	Mediana	P-valor
<b>¿Realiza ejercicio físico?</b>			
No	44	7,50	0,026*
Sí	100	9,75	

\* $p < 0,05$ 

SOD (U/mL)			
	n	Mediana	P-valor
<b>¿Ha bebido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses?</b>			
No	97	252,80	0,045*
Sí	61	214,80	
<b>País de nacimiento</b>			
España	124	231,60	0,025*
Otros	29	267,20	
<b>¿Está en contacto con alguna sustancia tóxica?</b>			
No	146	227,80	0,012*
Sí	11	299,20	
<b>Frecuencia contacto tóxico</b>			
Sin exposición	139	228,00	0,035*
Exposición semanal/mensual	7	291,60	
Exposición diaria	4	359,80	
<b>¿Cerca de su hogar hay industrias que trabajen con productos tóxicos?</b>			
No	148	228,60	0,026*
Sí	9	276,80	

\* $p < 0,05$ 

Para terminar esta sección, nos centramos en las asociaciones de las defensas antioxidantes con los hábitos dietéticos de los sujetos.

La vitamina B<sub>12</sub> y la SOD se asociaron con la ingesta de hortalizas de hoja verde al menos una vez a la semana ( $p=0,024$  y  $p=0,019$  respectivamente). En ambos casos aquellos sujetos que sí lo cumplían presentaban concentraciones superiores en el plasma seminal. El folato se asoció con la ingesta de kiwi ( $p=0,008$ ) y de frutos secos ( $p=0,031$ ), siendo las concentraciones mayores en aquellos varones que cumplían las recomendaciones nutricionales en ambos casos. La GPx se asoció con la ingesta de huevo. Los sujetos que consumían menos de 4 huevos a la semana presentaban una

concentración seminal más elevada de esta enzima ( $p=0,036$ ). Finalmente, la Catalasa se asoció con la ingesta de calabaza o calabacín ( $p=0,019$ ), los sujetos que cumplían las recomendaciones nutricionales en cuanto al consumo de calabaza eran los que presentaban mayores concentraciones (Tabla 49-B).

Tabla 49-B. Relación entre las vitaminas y enzimas con las respuestas del Cuestionario

<b>VIT B<sub>12</sub> (pg/mL)</b>				
	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ingiere brócoli, espinacas y/o hortalizas al menos 2 veces por semana</b>				
No	28	879,11	541,68	0,024*
Sí	98	1166,07	598,19	
<b>FOLATO (ng/mL)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>		<b>P-valor</b>
<b>Ingiere kiwi 1 vez a la semana</b>				
No	120	9,05		0,008*
Sí	23	13,60		
<b>Ingiere avellanas, nueces almendras al menos 1 vez por semana</b>				
No	57	8,70		0,031*
Sí	85	10,20		
<b>SOD (U/mL)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>		<b>P-valor</b>
<b>Ingiere brócoli, espinacas y/o hortalizas al menos 2 veces por semana</b>				
No	33	185,60		0,019*
Sí	113	237,20		
<b>GPx (U/L)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>		<b>P-valor</b>
<b>Ingiere huevo 4 veces por semana</b>				
No	101	9922,00		0,036*
Sí	58	9553,00		
<b>CAT (nmol/min/mL)</b>				
	<b>n</b>	<b>Mediana</b>		<b>P-valor</b>
<b>Ingiere calabaza, calabacín al menos 1 vez por semana</b>				
No	71	13,16		0,019*
Sí	47	15,57		

\* $p<0,05$

#### **5.3.1.1.4 Asociación con los resultados del MDA**

Analizamos la existencia de asociación entre las respuestas del Cuestionario de nuestro estudio y los niveles de MDA, con el fin de encontrar algún tipo de relación entre los hábitos de vida y la peroxidación lipídica en plasma seminal. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 50.

En lo que respecta al consumo de tabaco, se hallaron asociaciones entre la frecuencia de consumo ( $p=0,007$ ) y la exposición a los ambientes cargados de humo de tabaco ( $p=0,022$ ). El grupo de los exfumadores fue el que presentó concentraciones más elevadas de MDA. En segundo lugar los no fumadores, y finalmente, los que declararon no estar expuestos a ambientes cargados de humo con cierta frecuencia.

También se encontró asociación con el tipo de profesión ( $p=0,049$ ). Los varones con un trabajo que conllevaba esfuerzo físico presentaban concentraciones de MDA superiores.

Además se observó una asociación del MDA con el lugar de residencia ( $p=0,022$ ). Los sujetos que residían en una gran ciudad eran aquellos con las concentraciones más elevadas de MDA.

Por último, el MDA se asociaba con la ingesta de naranja. Encontramos concentraciones superiores de MDA en los sujetos que consumían naranja al menos 2-3 veces a la semana ( $p=0,035$ ).

Tabla 50. Relación entre el MDA y las respuestas del Cuestionario

	MDA ( $\mu\text{g/L}$ )			
	n	Media	DE	P-valor
<b>Frecuencia de consumo de tabaco</b>				
No fumador	65	42,30	15,53	0,007*
Ex fumador	36	45,63	19,21	
≤ 10 cig/día	18	33,60	15,82	
> 10 cig/día	32	34,13	14,22	
<b>¿Acostumbra a estar en ambientes cargados de humo de tabaco?</b>				
No	84	42,88	18,28	0,022*
Sí	29	34,23	13,58	
<b>Tipo de profesión</b>				
Sedentaria	76	37,40	14,50	0,049*
Con esfuerzo físico	65	42,99	18,86	
<b>Lugar de residencia</b>				
Medio rural	11	39,92	10,64	0,022*
Pueblo o ciudad tamaño medio	38	33,57	14,30	
Gran ciudad	97	42,38	17,63	
<b>Ingiere naranja 2-3 veces por semana</b>				
No	84	37,77	15,14	0,035*
Sí	66	43,70	18,29	

\* $p < 0,05$ 

### 5.3.1.2 Asociaciones de los niveles de Metales y Elementos Traza

Exponemos a continuación las asociaciones encontradas entre los Metales y Elementos Traza presentes en el plasma seminal con los parámetros del seminograma y las defensas antioxidantes.

#### 5.3.1.2.1 Asociación con los parámetros del seminograma y de la capacitación espermática

En las tablas 51-A y 51-B se recogen las correlaciones halladas entre los parámetros del seminograma estudiados y la concentración de Metales y Elementos Traza. Estos datos ofrecen una medida de la posible asociación entre el metal circulante en el plasma seminal y la calidad del semen.



Tabla 51-A. Relación entre los parámetros del seminograma y los Metales y Elementos Traza

	Al	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Se	V	Zn
<b>Concentración espermática</b>									
r	-0,191	0,147	0,114	0,241	0,155	-0,138	0,145	-0,151	0,094
p-valor	<b>0,014*</b>	0,058	0,141	<b>0,002*</b>	<b>0,046*</b>	0,075	0,062	0,053	0,229
n	167	167	167	167	167	167	167	164	167
<b>Motilidad total</b>									
r	-0,130	0,141	-0,086	0,140	0,119	-0,150	0,092	-0,116	0,255
p-valor	0,100	0,074	0,280	0,077	0,132	0,057	0,248	0,146	<b>0,001*</b>
n	161	161	161	161	161	161	161	159	161
<b>Formas anormales</b>									
r	0,162	-0,037	0,079	0,106	-0,076	0,188	-0,165	0,105	-0,112
p-valor	<b>0,042*</b>	0,644	0,322	0,183	0,341	<b>0,018*</b>	<b>0,039*</b>	0,193	0,162
n	158	158	158	158	158	158	158	155	158
<b>ITZ</b>									
r	0,130	-0,082	0,011	0,070	-0,087	0,266	-0,106	0,172	-0,082
p-valor	0,103	0,303	0,891	0,383	0,278	<b>0,001*</b>	0,184	<b>0,032*</b>	0,303
n	158	158	158	158	158	158	158	155	158

\* $p < 0,05$ 

Como puede observarse en la tabla todas las correlaciones eran débiles. La concentración espermática correlacionaba positivamente con el Fe ( $p=0,002$ ) y el Mn ( $p=0,046$ ), pero negativamente con el Al ( $p=0,014$ ). La motilidad total correlacionaba positivamente con el Zn ( $p=0,001$ ). Las formas anormales correlacionaron positivamente con el Al ( $p=0,042$ ) y el Ni ( $p=0,018$ ), pero de forma negativa con el Se ( $p=0,039$ ). Finalmente, el ITZ correlacionaba positivamente con el Ni ( $p=0,001$ ) y el V ( $p=0,032$ ).

Por otra parte se encontró una asociación entre el REM y el Co ( $p=0,030$ ). Los sujetos con una concentración de Co en plasma seminal entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ , presentaban mayor REM, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 51-B. Relación entre los parámetros del seminograma y los Metales y Elementos Traza

REM (x10 <sup>6</sup> )			
	n	Mediana	P-valor
<b>Co (µg/L)</b>			
<0,2	45	3,45	
≥0,2<0,4	30	20,10	0,030*
≥0,4	14	8,70	

\*p&lt;0,05

### 5.3.1.2.2 Asociación con los niveles de enzimas antioxidantes

Puesto que algunos de los Metales y Elementos Traza actúan como elementos catalíticos esenciales para diversas enzimas, se ha realizado un test de correlación entre los niveles de los distintos Metales y Elementos Traza estudiados, y los niveles de las enzimas antioxidantes medidas.

Se halló una fuerte correlación ( $p < 0,05$ ) entre los niveles de la SOD y las concentraciones de Cu, Cr, Fe, Mn, Se y Zn. Igualmente encontramos correlación estadísticamente significativa entre los niveles de GPx y las concentraciones de Fe y Ni. Por último, también se observó relación entre los niveles de Catalasa y la concentración de Al, Cr y V. En todos los casos las correlaciones fueron positivas, es decir, que al aumentar los niveles de estas enzimas también lo hacían las concentraciones de los metales (Tabla 52-A).

Tabla 52-A. Relación entre Metales y Elementos Traza con enzimas

	Al	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Se	V	Zn
<b>SOD</b>									
r	0,116	0,544	0,163	0,446	0,582	0,070	0,307	-0,040	0,614
p-valor	0,144	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,039*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	0,382	<b>&lt;0,001*</b>	0,616	<b>&lt;0,001*</b>
n	160	160	160	160	160	160	160	157	160
<b>GPx</b>									
r	0,094	0,103	-0,112	0,202	0,136	0,306	-0,089	0,080	-0,002
p-valor	0,234	0,196	0,159	<b>0,010*</b>	0,085	<b>&lt;0,001*</b>	0,260	0,318	0,983
n	161	161	161	161	161	161	161	158	161
<b>CAT</b>									
r	0,315	-0,004	0,277	0,107	0,060	0,048	-0,040	0,360	-0,148
p-valor	<b>&lt;0,001*</b>	0,961	<b>0,002*</b>	0,233	0,503	0,593	0,656	<b>&lt;0,001*</b>	0,097
n	127	127	127	127	127	127	127	124	127

\* $p < 0,05$ 

Por otra parte, se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) para la GPx con el Co, y para la SOD con el Cd y el Pb (Tabla 52-B). Encontramos la mayor mediana de GPx cuando la concentración de Co se encontraba entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ , y en el caso de la SOD, la mayor concentración aparecía cuando el Cd y el Pb eran superiores a 0,4  $\mu\text{g/L}$ .

Tabla 52-B. Relación entre Metales y Elementos Traza con enzimas

	Co ( $\mu\text{g/L}$ ) <0,2		Co ( $\mu\text{g/L}$ ) $\geq 0,2$ -<0,4		Co ( $\mu\text{g/L}$ ) >0,4		
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana	P-valor
<b>GPx (U/L)</b>	86	9,38	48	11,15	27	9,92	<b>&lt;0,001*</b>
	Cd ( $\mu\text{g/L}$ ) <0,2		Cd ( $\mu\text{g/L}$ ) $\geq 0,2$ -<0,4		Cd ( $\mu\text{g/L}$ ) >0,4		
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana	P-valor
<b>SOD (U/mL)</b>	91	196,80	53	264,00	16	301,40	<b>&lt;0,001*</b>
	Pb ( $\mu\text{g/L}$ ) <0,2		Pb ( $\mu\text{g/L}$ ) $\geq 0,2$ -<0,4		Pb ( $\mu\text{g/L}$ ) >0,4		
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana	P-valor
<b>SOD (U/mL)</b>	31	143,20	43	228,00	86	262,80	<b>&lt;0,001*</b>

\* $p < 0,05$

### 5.3.1.2.3 Asociación con los niveles de vitaminas antioxidantes

Se analizó la relación entre los niveles de los distintos Metales y Elementos Traza, con las concentraciones de vitaminas antioxidantes determinadas. Los resultados se muestran en las tablas 53-A y 53-B.

Tabla 53-A. Relación de los Metales y Elementos Traza con las vitaminas

	Al	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Se	V	Zn
<b>VIT C</b>									
r	-0,003	0,089	0,211	0,010	0,090	-0,003	0,213	-0,181	0,130
p-valor	0,970	0,276	<b>0,009*</b>	0,900	0,269	0,973	<b>0,008*</b>	<b>0,026*</b>	0,109
n	153	153	153	153	153	153	153	151	153
<b>VIT B<sub>12</sub></b>									
r	-0,045	0,465	0,129	0,400	0,349	0,080	0,446	-0,192	0,451
p-valor	0,586	<b>&lt;0,001*</b>	0,119	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	0,333	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,021*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
n	147	147	147	147	147	147	147	144	147
<b>FOLATO</b>									
r	0,001	0,201	0,069	0,242	0,171	0,068	0,114	-0,042	0,239
p-valor	0,988	<b>0,013*</b>	0,396	<b>0,003*</b>	<b>0,036*</b>	0,406	0,161	0,615	<b>0,003*</b>
n	152	152	152	152	152	152	152	149	152

\* $p < 0,05$

Se encontraron correlaciones significativas de la vitamina C con el Cr, Se y V; de la vitamina B<sub>12</sub> con el Cu, Fe, Mn, Se, V y Zn; y del folato con el Cu, Fe, Mn y Zn. Todas ellas correlaciones positivas, es decir, cuando aumentaba la concentración del metal también lo hacía la de las vitaminas C, B<sub>12</sub> y folato, excepto en el caso del V que fue negativa, y por tanto, conforme éste aumentaba, disminuía la concentración de dichas vitaminas.

Tabla 53-B. Relación de los Metales y Elementos Traza con las vitaminas

	VIT B <sub>12</sub> (pg/mL)			
	n	Media	DE	P-valor
<b>Cd (µg/L)</b>				
<0,2	85	969,71	502,50	
≥0,2-<0,4	47	1202,98	546,58	0,005*
≥0,4	15	1426,53	889,39	

\* $p < 0,05$

También se observó correlación significativa entre la vitamina B<sub>12</sub> y el Cd ( $p=0,005$ ), encontrando niveles de vitamina superiores cuando el sujeto presentaba concentraciones de Cd  $\geq 0,4$   $\mu\text{g/L}$ .

### 5.3.1.3 Asociación de los niveles de vitaminas y enzimas antioxidantes

En este apartado tratamos de encontrar en primer lugar la posible relación existente entre la presencia de los agentes antioxidantes en el semen y la calidad seminal. Y, en segundo lugar, dilucidar si las defensas antioxidantes están relacionadas entre sí.

#### 5.3.1.3.1 Asociación con los parámetros del seminograma y la capacitación espermática

En la tabla 54 se exponen las asociaciones entre las vitaminas y los parámetros del seminograma. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ( $p<0,05$ ) de la vitamina B<sub>12</sub> con la concentración espermática y con la motilidad total. Y por otra parte se analizó la correlación entre el folato y las formas anormales de los espermatozoides. Se evidenciaron correlaciones positivas en todos estos casos, como puede observarse en la siguiente tabla.

Tabla 54. Correlación entre vitaminas antioxidantes y los parámetros del seminograma.

	Concentración espermática			Motilidad total			Formas anormales		
	n	r	p-valor	n	r	p-valor	n	r	p-valor
VIT B <sub>12</sub>	149	0,307	<0,001*	143	0,231	0,006*	140	-0,064	0,451
FOLATO	155	0,073	0,364	150	0,043	0,599	147	0,191	0,020*

\* $p<0,05$

No encontramos ningún tipo de asociación entre la vitamina C y las enzimas con los parámetros del seminograma estudiados.

#### 5.3.1.3.2 Asociación de los niveles de enzimas con los niveles de vitaminas

A continuación analizamos la relación entre los niveles de enzimas y las concentraciones de vitaminas antioxidantes determinadas en este estudio. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 55. Correlación entre las vitaminas antioxidantes y las enzimas

	SOD			CAT		
	n	r	p-valor	n	r	p-valor
VIT C	159	0,028	0,725	124	-0,177	<b>0,049*</b>
VIT B <sub>12</sub>	144	0,324	<b>&lt;0,001*</b>	114	0,082	0,388
FOLATO	151	0,288	<b>&lt;0,001*</b>	120	-0,034	0,716

\* $p < 0,05$ 

En el caso de la SOD encontramos una débil correlación positiva con los niveles de vitamina B<sub>12</sub> y folato ( $p < 0,001$ ). La Catalasa correlacionó negativamente con la vitamina C ( $p = 0,049$ ), es decir, cuando aumentaba la concentración de una, disminuía la de la otra. En cambio no encontramos ningún tipo de asociación entre la GPx y las vitaminas estudiadas.

#### 5.3.1.4 Asociaciones de los resultados del MDA

Basándonos en el comportamiento del MDA, como un marcador de estrés oxidativo y posible diferenciador entre varones fértiles e infértiles, se estudiaron sus relaciones con los agentes oxidantes y antioxidantes más relevantes, buscando asociaciones que reforzaran su utilidad como marcador bioquímico de infertilidad.

##### 5.3.1.4.1 Asociación con los parámetros del seminograma y la capacitación espermática

Tras analizar la relación de los distintos parámetros del seminograma y la capacitación espermática con el MDA no se halló ninguna correlación estadísticamente significativa. Aunque se observa correlación positiva con el porcentaje de formas anormales y el ITZ, y correlación negativa con la concentración espermática y la motilidad total.

##### 5.3.1.4.2 Asociación con los niveles de Metales y Elementos Traza

Analizamos las relaciones entre los Metales y Elementos Traza determinados en nuestro estudio, y los niveles de MDA. Encontramos los resultados que se reflejan en las tablas 56-A y 56-B.

Tabla 56-A. Correlaciones Metales y Elementos Traza y MDA

	V
<b>MDA</b>	
r	-0,200
p-valor	0,013*
n	155

\* $p < 0,05$ 

Se encontró una débil correlación, entre los niveles de MDA y la concentración de V. El carácter de esta asociación resultó negativo, es decir, que al disminuir la concentración de V, aumentaba la del MDA. En el caso del Co, se encontró una correlación positiva con los niveles de MDA, por tanto, al aumentar la concentración de Co también lo hacía la del MDA (tabla 56-B).

Tabla 56-B. Correlaciones de los Metales y Elementos Traza con el MDA

	MDA ( $\mu\text{g/L}$ )			
	n	Media	DE	P-valor
<b>Co (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>				
<0,2	85	35,38	15,44	
$\geq 0,2$ -<0,4	46	41,85	13,76	0,002*
$\geq 0,4$	27	46,49	16,69	

\* $p < 0,05$ 

#### 5.3.1.4.3 Asociación con los niveles de defensas antioxidantes

Estudiamos la existencia de correlación entre los agentes antioxidantes determinados en nuestro estudio y la concentración del principal producto de peroxidación lipídica. Encontramos los resultados que se reflejan en la siguiente tabla.

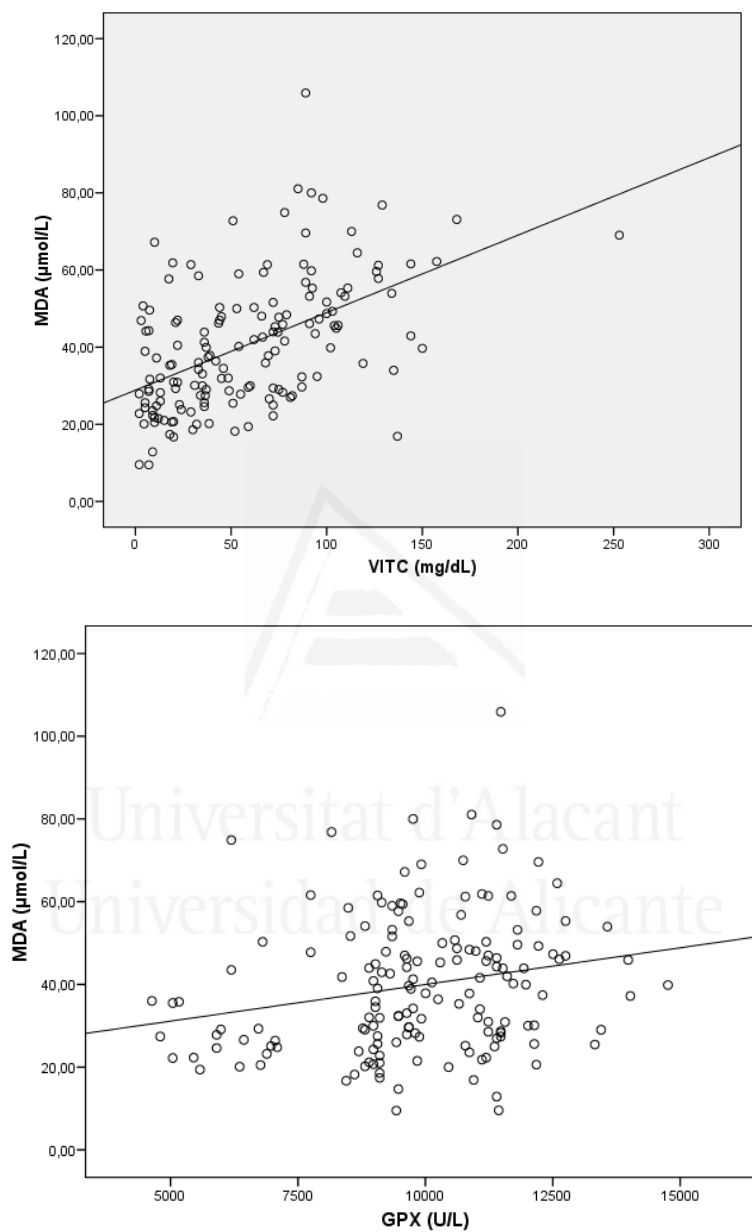
Tabla 57. Correlaciones entre las enzimas antioxidantes y el MDA

	VIT C	GPx
<b>MDA</b>		
r	0,518	0,244
p-valor	<0,001*	0,002*
n	153	161

\* $p < 0,05$

En el estudio de la relación entre el MDA y las defensas antioxidantes, se detectaron correlaciones estadísticamente significativas entre el MDA y la vitamina C, y entre el MDA y la GPx, tal y como se representa en las siguientes figuras:

Figura 35. Correlación de la concentración de MDA con la de Vit C y GPx en plasma seminal



Al tratarse de correlaciones positivas, se puede pronosticar que cuando una de las variables aumente, también lo hará la otra.



### 5.3.2 Estudios comparativos entre grupos de sujetos

Como ya se ha comentado previamente, se compararon los resultados de las variables estudiadas en función de 3 aspectos distintos: según los criterios de normalidad de la OMS de 1999 para los parámetros del seminograma, según el resultado del REM y, en tercer lugar, según la concentración de MDA. Para cada uno de los aspectos estudiados se dividieron a los varones incluidos en el estudio en dos grupos, según los resultados que se describen a continuación.

#### 5.3.2.1 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del seminograma

En este apartado se pretende comparar el estrés oxidativo en plasma seminal en función de la calidad del seminograma, de acuerdo con los criterios de la OMS de 1999. Los dos grupos de sujetos quedaron constituidos de la siguiente manera:

- Grupo de referencia: sujetos cuyas características seminales cumplen simultáneamente los siguientes criterios de normalidad de la OMS:
  - pH  $\geq$  7,2.
  - Concentración de espermatozoides  $\geq$  20x10<sup>6</sup>/mL.
  - Motilidad progresiva (rápidos + lentos)  $\geq$  50%.
  - Índice de teratozoospermia (ITZ) < 1,6.
- Grupo de estudio: sujetos que no cumplen todos los criterios de normalidad de la OMS anteriormente expuestos.

De los 181 sujetos, 180 tenían resultado de todos los parámetros anteriores. Así, 50 sujetos formaron parte del grupo de referencia, y 130 del grupo de estudio.

Tabla 58. Agrupación de los sujetos según los criterios de la OMS 1999

Grupo correspondiente	Frecuencia	Porcentaje
Grupo de referencia	50	27,6
Grupo de estudio	130	71,8

A continuación se incluye un estudio comparativo de los resultados obtenidos en función del grupo al que pertenecían los sujetos.

### 5.3.2.1.1 Estudios de los agentes de estrés oxidativo.

Comenzamos comparando el estatus oxidativo entre ambos grupos. Los resultados se presentan en los siguientes subapartados.

#### 5.3.2.1.1.1 Estudios de los Metales y Elementos Traza.

De todos los Metales y Elementos Traza estudiados, se observaron diferencias estadísticamente significativas para el Ni ( $p=0,005$ ) entre ambos grupos, detectándose una concentración seminal significativamente más elevada en el grupo de estudio. También se encontraron diferencias significativas en el caso del Mn ( $p=0,022$ ), pero al contrario que el anterior, su concentración seminal era inferior en el grupo de estudio.

Tabla 59. Comparación de los Metales y Elementos Traza en función de los criterios de la OMS 1999

	Grupo de referencia			Grupo de estudio			P-valor
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	
Mn ( $\mu\text{g/L}$ )	44	3,13	2,22-5,42	122	2,47	1,75-3,69	0,022*
Ni ( $\mu\text{g/L}$ )	44	1,94	1,43-2,62	122	2,39	1,76-3,61	0,005*

\* $p < 0,05$

Los valores de Fe, Cu, Se y Zn fueron inferiores en el grupo de estudio con respecto al grupo de referencia, en cambio, los resultados de V y Al fueron superiores, aunque todos ellos sin presentar diferencias significativas.

En lo que respecta al Co, Cd, Pb y Hg tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, pero sí podemos apreciar pequeñas diferencias en cada caso. En el caso del Co, la mayoría de los sujetos del grupo de estudio presentaban concentraciones superiores a  $0,4 \mu\text{g/L}$ , en cambio los del grupo de referencia se situaban en el rango de  $0,2 - 0,4 \mu\text{g/L}$ . Para el Cd y Pb, la mayoría de los varones del grupo de estudio presentaba unas concentraciones menores de  $0,2 \mu\text{g/L}$ , y los del grupo de referencia mayores de  $0,4 \mu\text{g/L}$  para ambos metales. Por último, las concentraciones de Hg iguales o superiores a  $0,5 \mu\text{g/L}$  predominaban en el grupo de estudio, y las menores de  $0,5 \mu\text{g/L}$  en el de referencia.

Realizamos una regresión logística binaria para conocer la relación de los Metales y Elementos Traza con la probabilidad de pertenecer al grupo de estudio (Tabla 60).

Tabla 60. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre los Metales y Elementos Traza en plasma seminal y el grupo de estudio. El grupo de referencia es el grupo que cumple los criterios de la OMS 1999

Grupo de estudio	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>V</b>	166	6,341	0,885-45,45	0,066	163	5,944	0,494-71,509	0,160
<b>Ni</b>	166	1,078	0,934-1,243	0,305	163	1,047	0,905-1,210	0,539
<b>Cd</b>								
<0,2	92	1			92	1		
≥0,2 - <0,4	57	0,988	0,466-2,094	0,975	56	1,374	0,579-3,261	0,472
≥0,4	17	0,847	0,270-2,655	0,776	15	1,110	0,177-6,962	0,911
<b>Al</b>	166	1,009	0,99-1,027	0,354	163	1,012	0,983-1,041	0,418
<b>Hg</b>								
<0,5	147	1			147	1		
≥0,5	19	1,402	0,439-4,477	0,569	16	1,505	0,347-6,533	0,585
<b>Zn</b>	166	0,998	0,995-1,001	0,214	163	1,001	0,996-1,007	0,628
<b>Mn</b>	166	0,845	0,745-0,958	0,009*	163	0,763	0,629-0,926	0,006*
<b>Cu</b>	166	0,994	0,987-1,002	0,139	163	0,997	0,982-1,012	0,674

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 18,212 (p-valor =0,033).

\* $p < 0,05$

De los Metales y Elementos Traza estudiados, tanto en el crudo como en el ajustado por V, Ni, Cd, Al, Hg, Zn y Cu, el único metal que reducía las posibilidades de pertenecer al grupo de estudio fue el Mn, siendo estadísticamente significativo con un ORP de 0,763 (IC<sub>95%</sub> 0,629-0,926).

#### 5.3.2.1.1.2 Estudios de las defensas antioxidantes

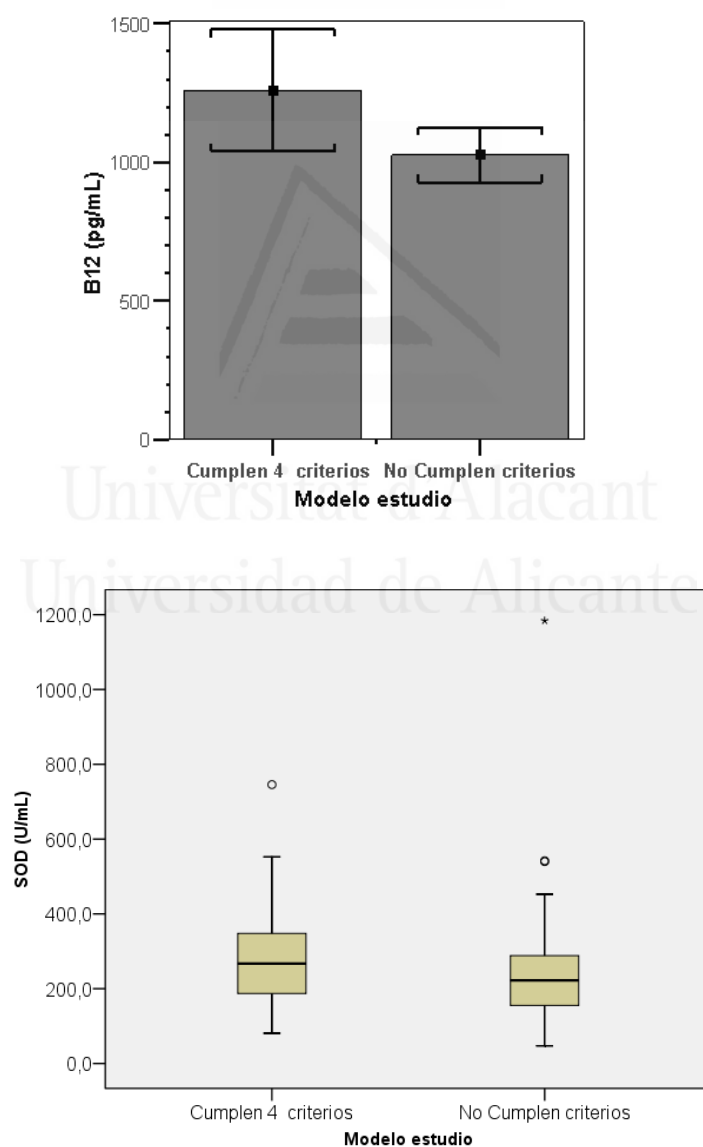
De las defensas antioxidantes estudiadas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para la vitamina B<sub>12</sub> (p=0,029) y para la SOD (p=0,014). En ambos casos la concentración seminal resultó significativamente menor en el grupo de estudio.

Tabla 61. Comparación de vitaminas y enzimas en plasma seminal entre los grupos establecidos según los criterios de la OMS 1999

	Grupo de referencia			Grupo de estudio			P-valor
	n	Media	DE	n	Media	DE	
VIT B <sub>12</sub> (pg/ml)	40	1259,85	690,41	108	1026,42	524,40	0,029*
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	P-valor
SOD (U/ml)	47	267,20	182,00-351,60	123	222,00	152,80-291,20	0,014*

\* $p < 0,05$

Figura 36. Valores medios de la vitamina B<sub>12</sub> y la SOD en función del grupo al que pertenecen



Tras realizar la regresión logística binaria (Tabla 62) y ajustar por SOD, GPx, Catalasa, vitamina C, B<sub>12</sub> y folato, observamos que la SOD reducía la probabilidad de pertenecer al grupo de estudio, siendo su ORP de 0,991 (IC<sub>95%</sub> 0,986-0,997). Por otra parte, al ajustar el folato con el resto de variables, éste aumentaba la probabilidad de pertenecer al grupo de estudio con un ORP de 1,195 (IC<sub>95%</sub> 1,046-1,364).

Tabla 62. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre las vitaminas y enzimas en plasma seminal y grupo de estudio. El grupo de referencia es el grupo que cumple los criterios de la OMS 1999

Grupo de estudio	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>SOD</b>	170	0,998	0,995-1,00	0,061	107	0,991	0,986-0,997	0,001*
<b>GPx</b>	171	0,905	0,76-1,078	0,262	107	0,925	0,717-1,193	0,547
<b>CAT</b>	131	1,009	0,966-1,053	0,700	107	0,989	0,934-1,047	0,709
<b>VIT C</b>	163	1,002	0,994-1,010	0,666	107	1,004	0,993-1,016	0,443
<b>VIT B<sub>12</sub></b>	148	0,999	0,998-0,9996	0,037*	107	0,999	0,998-1,001	0,357
<b>FOLATO</b>	162	0,998	0,978-1,020	0,884	107	1,195	1,046-1,364	0,009*

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 20,576 (P-valor =0,002).

\* $p < 0,05$

#### 5.3.2.1.1.3 Estudios de los productos de oxidación: MDA

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la peroxidación lipídica en el semen.

#### 5.3.2.1.2 Estudios del Cuestionario Socio-Demográfico y Clínico

La media de edad en función del grupo al que pertenecían los varones fue de 36,18 (DE=4,27) años para el grupo de referencia, y de 34,94 (DE=4,25) para el grupo de estudio. La mediana del Índice de Masa Corporal fue de 26,32 kg/m<sup>2</sup> (RI=24,8-27,77) en el grupo de referencia y de 25,93 kg/m<sup>2</sup> (RI=24,22-28,35) para el grupo de estudio. Ambos valores se encuentran dentro del nivel de sobrepeso para individuos jóvenes según la OMS (25-29,99 kg/m<sup>2</sup>) (WHO, 2000b).

La gran mayoría de los sujetos de ambos grupos era de raza blanca, por ello obtuvimos un resultado no concluyente para esta variable.

De todas las variables socio-demográficas y clínicas sólo se encontraron dos diferencias significativas entre ambos grupos. La primera de ellas fue que la mayoría

de los varones que no había tenido hijos con otra pareja anteriormente, pertenecía al grupo de estudio ( $p=0,049$ ). La segunda fue el país de nacimiento ( $p=0,004$ ). La mayoría de los sujetos que refieren haber nacido en España pertenecían también al grupo que no cumple las características de la OMS (77,1%).

Tabla 63. Comparación de las respuestas del Cuestionario en función de los grupos establecidos según los criterios de la OMS 1999

	Grupo de referencia		Grupo de estudio		P-valor
	n	%	n	%	
<b>¿Ha tenido hijos con otra pareja?</b>					
No	35	23,5	114	76,5	0,049*
Sí	7	46,7	8	53,3	
<b>País de nacimiento</b>					
España	30	22,9	101	77,1	0,004*
Otros	15	48,4	16	51,6	

\* $p < 0,05$

Figura 37. Porcentaje de varones que han tenido hijos previamente para cada grupo del modelo

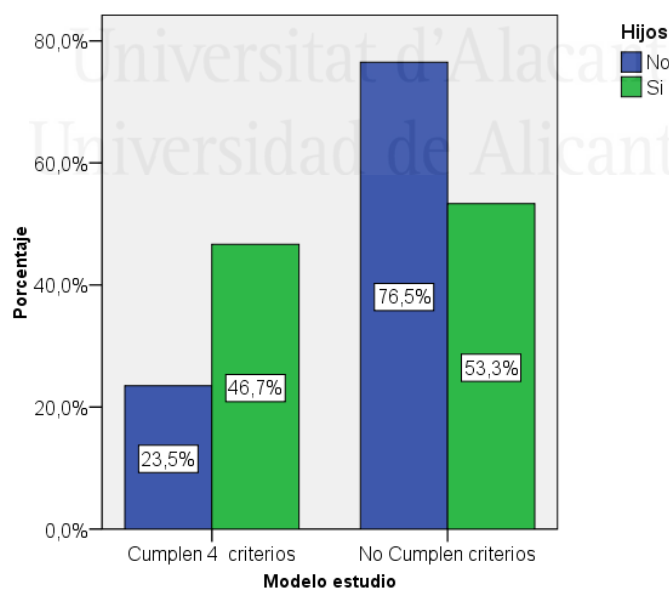
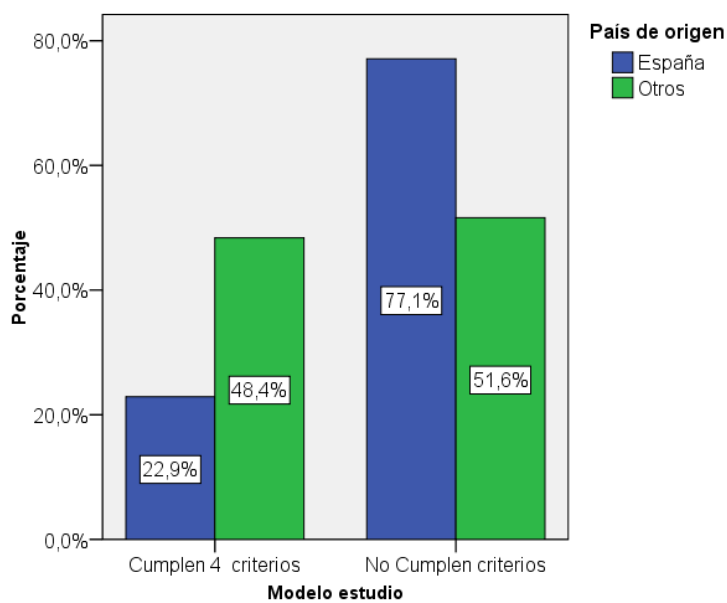


Figura 38. Porentaje de varones que han nacido en España o en otro país para cada grupo del modelo



A continuación, presentamos la regresión logística binaria realizada para conocer el comportamiento de las variables socio-demográficas y clínicas en este modelo (Tabla 64).

Tabla 64. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre las variables sociodemográficas y clínicas, y estilo de vida con el grupo de estudio. El grupo de referencia es el grupo que cumple los criterios de la OMS 1999

Grupo de estudio	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>¿Ha tenido hijos con otra pareja?</b>								
No	149	1			139	1		
Sí	15	0,351	0,119-1,036	0,058	15	0,400	0,116-1,376	0,146
<b>Uso de fármacos últimos 3 meses</b>								
No	82	1			76	1		
Sí	86	0,840	0,426-1,658	0,615	78	0,822	0,364-1,858	0,638
<b>¿Es fumador?</b>								
No fumador	69	1			63	1		
Ex fumador	39	0,706	0,3-1,661	0,425	35	1,109	0,394-3,124	0,844
Fumador activo	59	1,134	0,507-2,538	0,759	56	0,819	0,316-2,125	0,681
<b>Consumo drogas últimos 3 meses</b>								
No	127	1			117	1		
Sí	40	1,003	0,453-2,223	0,994	37	1,731	0,630-4,757	0,288
<b>¿Realiza ejercicio físico?</b>								
No	51	1			48	1		
Sí	116	1,142	0,551-2,369	0,720	106	1,150	0,489-2,707	0,749
<b>País de nacimiento</b>								
España	131	1			128	1		
Otros	31	0,317	0,140-0,715	0,006*	26	0,249	0,090-0,690	0,007*
<b>Nivel estrés</b>								
Sin estrés	33	1			32	1		
Leve	30	2,5	0,751-8,32	0,135	29	3,252	0,791-13,376	0,102
Moderado	68	1,625	0,651-4,059	0,299	64	1,462	0,508-4,205	0,481
Intenso	29	0,615	0,22-1,722	0,355	29	0,384	0,119-1,236	0,109
<b>Contacto con tóxico en el trabajo</b>								
No	115	1			109	1		
Sí	48	1,038	0,487-2,21	0,923	45	0,980	0,405-2,375	0,965
<b>Alcohol en los últimos 3 meses</b>								
No	103	1			96	1		
Sí	64	1,233	0,608-2,502	0,562	58	0,949	0,407-2,213	0,904

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 20,68 (p-valor =0,037).

\*p<0,05



De los parámetros considerados en el Cuestionario, observamos que no haber nacido en España es un factor de protección significativo ( $p=0,007$ ), es decir, aumenta la probabilidad de pertenecer al grupo de referencia, con un ORP de 0,249 (IC<sub>95%</sub> 0,090-0,690).

### 5.3.2.2 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del test de capacitación

El REM es el parámetro utilizado en el Hospital General de Elche para determinar la técnica de fertilización a la que se van a someter las parejas a estudio. No hemos encontrado en la literatura estudios que relacionen el estrés oxidativo con los valores del REM, aun siendo un parámetro tan decisivo para la toma de decisiones. Por ello, consideramos de nuevo 2 grupos de sujetos, pero esta vez en función únicamente de si el REM se inscribía dentro de los rangos de valores de trabajo de nuestro hospital ( $REM \geq 10 \times 10^6$ ) o no, y realizamos de nuevo el estudio con el resto de parámetros.

De los 181 sujetos, sólo se les realizó el REM a 100 siguiendo el protocolo de trabajo de nuestro laboratorio. De ellos, 49 sujetos formaron parte del grupo con  $REM \geq 10 \times 10^6$ , y 51 del grupo de varones con  $REM < 10 \times 10^6$ .

Tabla 65. Agrupación de los sujetos según el valor del REM

Grupo correspondiente	Frecuencia	Porcentaje
<b>REM <math>\geq 10</math> (<math>\times 10^6</math>)</b>	49	49,0
<b>REM <math>&lt; 10</math> (<math>\times 10^6</math>)</b>	51	51,0

Con esta distribución de los varones, al estudiar las variables de estrés oxidativo y del Cuestionario sociodemográfico y clínico, sólo encontramos dos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

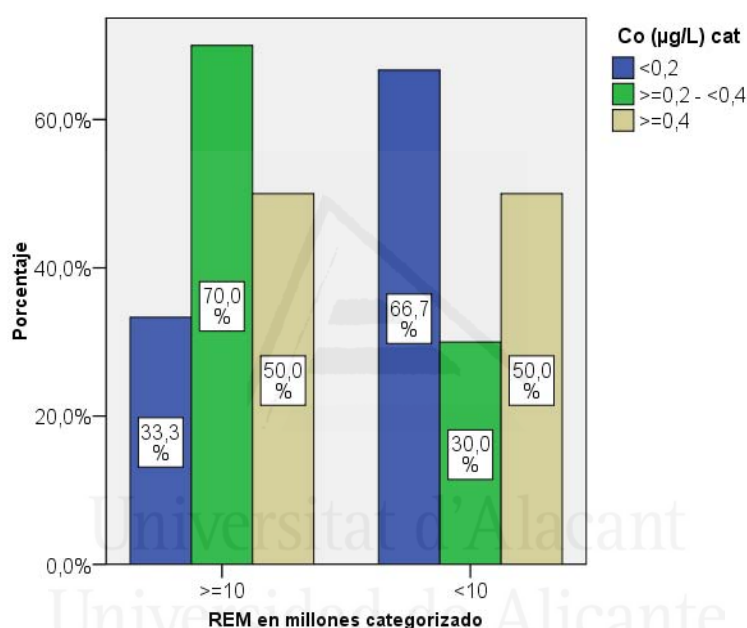
La primera fue el Co ( $p=0,008$ ). En la siguiente tabla y figura se resume la distribución de los sujetos en función de las concentraciones seminales de este metal:

Tabla 66. Comparación de los Metales y Elementos Traza en pasma seminal en función del REM

	REM $\geq 10$ ( $\times 10^6$ )		REM $< 10$ ( $\times 10^6$ )		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Co (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>					
<0,2	15	33,3	30	66,7	0,008*
0,2-0,4	21	70,0	9	30,0	
$\geq 0,4$	7	50,0	7	50,0	

\* $p < 0,05$ 

Figura 39. Distribución de las concentraciones de Co para cada grupo del modelo



En cuanto al resto de metales, los valores de Cr, Mn y Ni, fueron ligeramente superiores en el grupo que capacitaba peor. Las concentraciones del Al, Cu, Fe, Se y Zn fueron inferiores, y el V mostró una distribución similar en ambos grupos, pero sin presentar diferencias significativas en ningún caso.

Los metales Cd, Pb y Hg siguieron el mismo patrón de distribución que en la clasificación de grupos según los criterios de la OMS, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Es decir, la mayoría de los sujetos del grupo de  $\text{REM} < 10 \times 10^6$  presentaban concentraciones de Co superiores a  $0,4 \mu\text{g/L}$ , y los del grupo de  $\text{REM} \geq 10 \times 10^6$  se situaban en el rango de  $0,2-0,4 \mu\text{g/L}$ . En cambio, el mayor porcentaje de varones del grupo que capacitaba peor presentaba unas concentraciones de Cd y Pb menores de  $0,2 \mu\text{g/L}$ , y los que capacitaban mejor

mayores de 0,4 µg/L. Finalmente, en el grupo de  $REM < 10 \times 10^6$  predominaban concentraciones de Hg iguales o superiores a 0,5 µg/L, y en el de  $REM \geq 10 \times 10^6$ , menores de 0,5 µg/L.

En la regresión logística binaria realizada posteriormente, observamos que el Co era un factor protector, es decir, aumentaba la probabilidad de que el varón perteneciera al grupo que capacitaba mejor cuando el sujeto presentaba una concentración de Co de 0,2-0,4 µg/L (ORP=0,110) o de  $\geq 0,4$  µg/L (ORP=0,130) con respecto al grupo de referencia que era  $< 0,2$  µg/L (Tabla 67).

Tabla 67. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre los Metales y Elementos Traza en plasma seminal con la variable dependiente REM, siendo grupo de referencia  $REM \geq 10 \times 10^6$

REM < 10 ( $\times 10^6$ )	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>Co</b>								
<0,2	45	1			45	1		
$\geq 0,2 - < 0,4$	30	0,214	0,079-0,581	0,002*	29	0,110	0,03-0,404	0,001*
$\geq 0,4$	14	0,5	0,148-1,689	0,264	13	0,130	0,021-0,788	0,027*
<b>Cr</b>	89	1,097	0,611-1,969	0,756	87	0,644	0,269-1,54	0,322
<b>Ni</b>	89	1,112	0,922-1,341	0,268	87	1,257	0,967-1,632	0,087
<b>Al</b>	89	1,009	0,984-1,034	0,492	87	1,024	0,989-1,06	0,180
<b>Se</b>	89	0,995	0,979-1,010	0,484	87	1,005	0,95-1,026	0,607
<b>Mn</b>	89	0,953	0,795-1,144	0,607	87	1,028	0,816-1,294	0,816
<b>Fe</b>	89	1,004	0,994-1,014	0,419	87	1,007	0,992-1,023	0,373

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 17,574 (p-valor =0,025).

\* $p < 0,05$

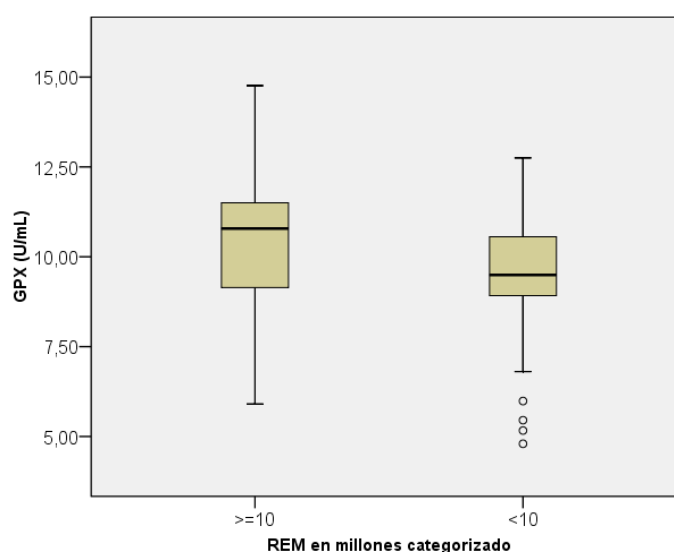
La segunda variable que presentó diferencia significativa entre ambos grupos fue la GPx ( $p=0,007$ ), siendo superior la mediana en los varones del grupo que capacitaba mejor (Tabla 68).

Tabla 68. Comparación de las defensas antioxidantes estudiadas en función del REM

	REM $\geq 10$ ( $\times 10^6$ )			REM < 10 ( $\times 10^6$ )			P-valor
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	
<b>GPx (U/L)</b>	47	10783,00	9061,00-11521,00	48	9491,50	8907,25-10772,75	0,007*

\* $p < 0,05$

Figura 40. Diagrama de caja de la GPx en función del REM



La regresión logística binaria realizada para los agentes antioxidantes en este modelo, muestra que la vitamina B<sub>12</sub> era el único de ellos que se podía considerar como factor protector, puesto que en los datos ajustados presentaba un ORP de 0,998 (IC<sub>95%</sub> 0,997-0,999), con p=0.013. Es decir, por cada unidad de aumento en la vitamina B<sub>12</sub> se reducía en 0,998 la probabilidad de pertenecer al grupo que capacitaba peor.

Tabla 69. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre las vitaminas y enzimas plasma seminal con la variable dependiente REM, siendo grupo referencia REM  $\geq 10 \times 10^6$

REM<10 (x10 <sup>6</sup> )	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>SOD</b>	94	1,002	0,948-1,006	0,342	55	1,005	0,998-1,012	0,16
<b>GPx</b>	95	0,735	0,582-0,928	0,01*	55	0,743	0,541-1,021	0,067
<b>CAT</b>	70	1,033	0,987-1,082	0,161	55	1,059	0,990-0,133	0,097
<b>VIT C</b>	91	1,001	0,990-1,011	0,919	55	1,010	0,992-1,029	0,266
<b>VIT B<sub>12</sub></b>	75	0,999	0,998-1,001	0,182	55	0,998	0,997-0,999	0,013*
<b>FOLATO</b>	80	1,051	0,966-1,145	0,249	55	1,104	0,979-1,244	0,107
<b>MDA</b>	90	0,99	0,965-1,015	0,435	55	1,014	0,964-1,067	0,587

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 15,014 (p-valor =0,02).

\*p<0,05

### 5.3.2.3 Estudios comparativos entre grupos de sujetos en función de los resultados del MDA

El MDA es el principal producto de peroxidación lipídica, por ello tratamos de relacionar la presencia de estrés oxidativo en plasma seminal, evaluado a través de la determinación del MDA, con la presencia de daño en los componentes esenciales del semen (calidad seminal y capacitación espermática), así como su relación con los Metales y Elementos Traza y las defensas antioxidantes evaluados. No encontramos en la literatura valores de referencia para este parámetro en plasma seminal, por lo que elegimos el punto de corte basándonos en nuestros propios resultados.

Tanto en el estudio descriptivo del MDA (Tabla 25) como en el comparativo de la calidad seminal, según los criterios de la OMS o del REM (Tablas 70 y 71), la media obtenida del MDA se situó en torno a 40 µg/L en ambos grupos.

Tabla 70. Comparación del MDA en función de los criterios de la OMS

	Grupo de referencia			Grupo de estudio			P-valor
	n	Media	DE	n	Media	DE	
MDA (µg/L)	42	40,23	15,58	120	39,79	17,17	0,885

Tabla 71. Comparación del MDA en función del REM

	REM ≥ 10 (x10 <sup>6</sup> )			REM < 10 (x10 <sup>6</sup> )			P-valor
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	
MDA (µg/L)	45	40,73	17,19	45	37,98	16,34	0,439

Por este motivo, decidimos adoptar una concentración de MDA de 40 µg/L como punto de corte para establecer los dos grupos del modelo. Una vez establecido el punto de corte, realizamos de nuevo el estudio con el resto de parámetros para tratar de relacionarlos con el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos se presentan en los siguientes apartados.

De los 181 varones, 163 tenían resultado de MDA. Estos sujetos se clasificaron entre el grupo de MDA<40 µg/L, del que formaron parte 75 sujetos, y el de MDA≥40 µg/L con 88 varones.

Tabla 72. Agrupación de los sujetos según el valor del MDA

Grupo correspondiente	Frecuencia	Porcentaje
MDA < 40 µg/L	75	46,0
MDA ≥ 40 µg/L	88	54,0

### 5.3.2.3.1 Estudios del seminograma y de la capacitación espermática

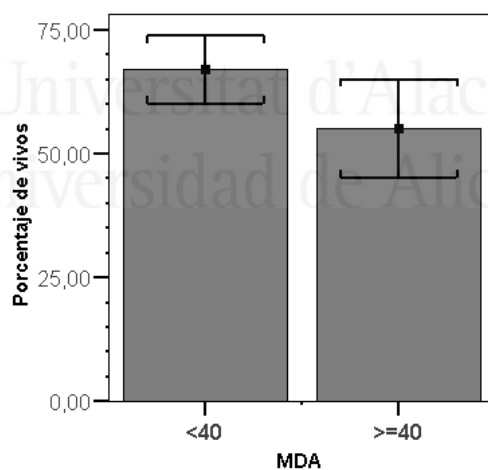
De los parámetros del seminograma estudiados y la capacitación espermática sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos para la vitalidad espermática ( $p=0,041$ ):

Tabla 73. Comparación de los parámetros del seminograma, en función del resultado del MDA.

	MDA < 40 µg/L			MDA ≥ 40 µg/L			P-valor
	n	Media	DE	n	Media	DE	
Vivos (%)	31	67,0	18,8	19	55,1	20,6	0,041*

\* $p < 0,05$

Figura 41. Medias del porcentaje de espermatozoides vivos en función del grupo al que pertenecen



El resto de parámetros del seminograma se distribuyeron de igual forma en ambos grupos de MDA, no presentando diferencias significativas.

Al realizar el análisis de regresión logística binaria entre los parámetros del seminograma y el MDA, observamos que no hay modelo. Es decir, no podemos utilizar ningún parámetro del seminograma como factor protector para este modelo.

### 5.3.2.3.2 Estudios de los agentes de estrés oxidativo

#### 5.3.2.3.2.1 Estudio de los Metales y Elementos Traza

En el caso del Co, existieron diferencias entre los grupos de MDA, en donde el grupo con menor lipoperoxidación era el que presentaba mayor porcentaje de individuos con  $Co < 0,2 \mu\text{g/L}$  y el grupo de mayor lipoperoxidación el que presentaba un mayor porcentaje de varones con  $Co \geq 0,4 \mu\text{g/L}$  ( $p=0,001$ ). Por el contrario, los sujetos con una concentración de  $Pb \geq 0,2 \mu\text{g/L}$  se encontraban en su mayoría en el grupo con menor lipoperoxidación ( $p=0,029$ ).

Tabla 74. Comparación de los metales Co y Pb, en función del resultado del MDA

	MDA < 40 $\mu\text{g/L}$		MDA $\geq$ 40 $\mu\text{g/L}$		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Co (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>					
<0,2	58	68,2	27	31,8	0,001*
0,2-0,4	19	41,3	27	58,7	
$\geq$ 0,4	10	37,0	17	63,0	
<b>Pb (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>					
<0,2	10	33,3	20	66,7	0,029*
0,2-0,4	25	59,5	17	40,5	
$\geq$ 0,4	52	60,5	34	39,5	

\* $p < 0,05$

Figura 42. Distribución de las concentraciones de Co para cada grupo del modelo

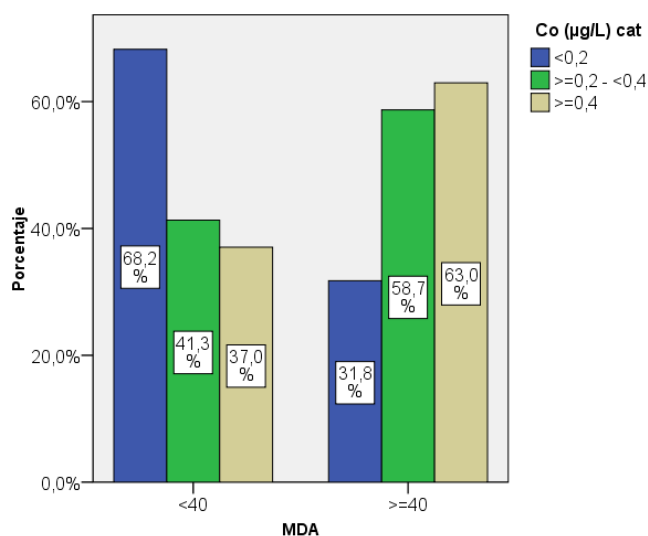
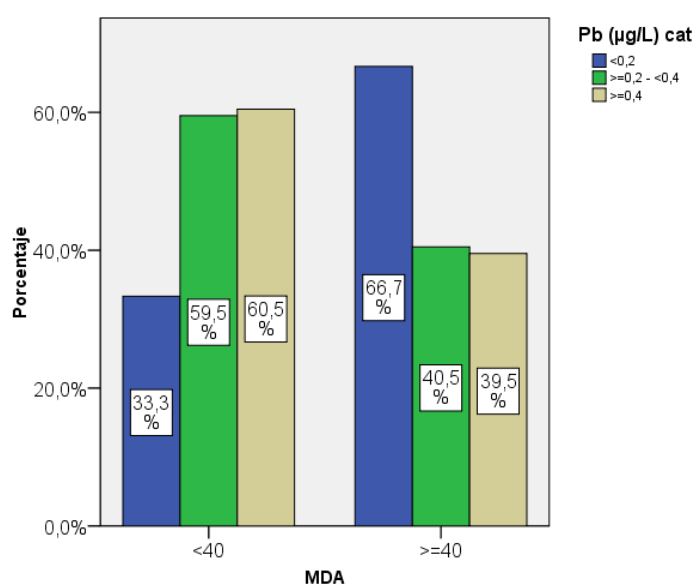


Figura 43. Distribución de las concentraciones de Pb para cada grupo del modelo



Por otra parte, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medianas del V entre ambos grupos, en donde el grupo de menor lipoperoxidación era el que presentaba una mayor mediana. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Tabla 75. Comparación del Vanadio, en función del resultado del MDA

	MDA < 40 µg/L			MDA ≥ 40 µg/L			P-valor
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	
V (µg/L)	87	0,39	0,29-0,50	68	0,31	0,26-0,39	0,001*

\* $p < 0,05$

Para el resto de metales no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de MDA, aunque los valores de Fe, Cr, Mn y Al, fueron superiores en el grupo con menor lipoperoxidación, y los resultados del Ni, Cu, Zn y Se fueron inferiores.

En el análisis de regresión logística, al ajustar por Co, V, y Pb, se observa que los ORP son similares a los del crudo, siendo ahora significativos el Co para concentraciones situadas entre 0,2 y 0,4 µg/L y superiores a 0,4 µg/L y, el Pb, pero esta vez sólo para concentraciones >0,4 µg/L. Por cada unidad de aumento en el Co aumenta la probabilidad de pertenecer al grupo de mayor lipoperoxidación, siendo sus ORP de 3,408 (IC<sub>95%</sub> 1,525-7,617) y 4,776 (IC<sub>95%</sub> 1,606-14,201) respectivamente, pero disminuye la probabilidad en el caso del Pb con un ORP de 0,28 (IC<sub>95%</sub> 0,109-0,719), en ambos casos respecto al grupo de referencia que es inferior a 0,2 µg/L (Tabla 76).



Tabla 76. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre los parámetros de Metales y Elementos Traza y MDA, siendo grupo referencia MDA&lt;40 µg/L

MDA ≥ 40 µg/L	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>Co</b>								
<0,2	85	1			85	1		
≥0,2-≤0,4	46	3,053	1,451-6,421	0,003*	45	3,408	1,525-7,617	0,003*
>0,4	27	3,652	1,478-9,025	0,005*	25	4,776	1,606-14,201	0,005*
<b>V</b>	155	0,695	0,27-1,787	0,45	155	0,509	0,170-1,523	0,227
<b>Pb</b>								
<0,2	30	1			30	1		
≥0,2-≤0,4	42	0,34	0,128-0,904	0,031*	41	0,417	0,148-1,176	0,098
>0,4	86	0,327	0,136-0,783	0,012*	84	0,28	0,109-0,719	0,008*

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 21,777 (p-valor =0,001).  
\*p<0,05

#### 5.3.2.3.2.2 Estudios de las defensas antioxidantes

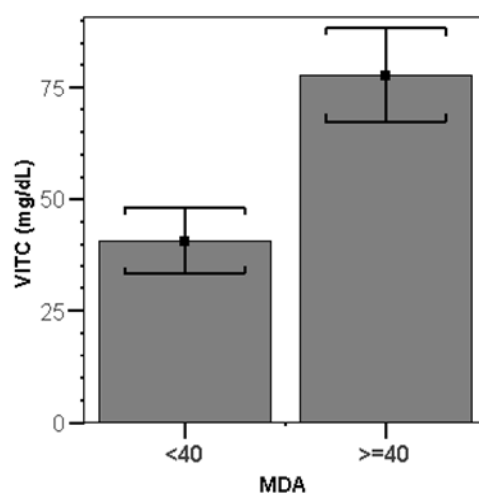
Al estudiar las vitaminas sólo se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (p<0,001) en el caso de la vitamina C, con una media claramente superior en el grupo de sujetos con mayor lipoperoxidación.

Tabla 77. Comparación de las defensas antioxidantes en plasma seminal, en función del resultado del MDA

	MDA < 40 µg/L			MDA ≥ 40 µg/L			P-valor
	n	Media	DE	n	Media	DE	
<b>VIT C (µg/dL)</b>	81	40,65	33,74	72	77,83	44,75	<0,001*
	n	Mediana	RI (P25-P75)	n	Mediana	RI (P25-P75)	P-valor
<b>GPx (U/L)</b>	87	9471,00	8774,00-11111,00	74	10455,00	9337,75-11490,25	0,007*

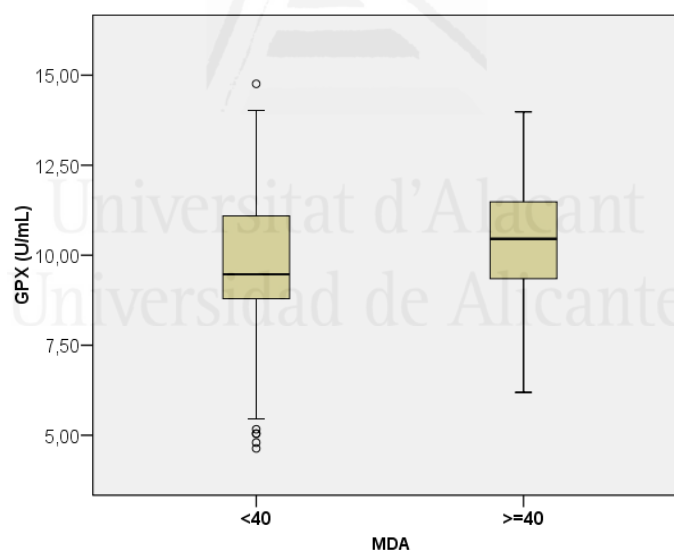
\*p<0,05

Figura 44. Medias de la vitamina C en función del grupo al que pertenecen



De las enzimas antioxidantes estudiadas sólo presentaba diferencia entre ambos grupos la GPx ( $p=0,007$ ), siendo la mediana mayor en el grupo de sujetos con mayor lipoperoxidación.

Figura 45. Diagrama de caja de la GPx en función del MDA



Finalmente, tras realizar la regresión logística binaria y al ajustar por SOD, GPx, Catalasa, vitamina C y folato, la vitamina C fue el único agente antioxidante con un ORP significativo ( $p<0,001$ ), con un valor de 1,022 ( $IC_{95\%}$  1,010-1,034), lo que indica que por cada unidad de aumento en la vitamina C aumenta ligeramente la probabilidad de pertenecer al grupo de mayor lipoperoxidación.

Tabla 78. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre las vitaminas y las enzimas con el MDA, siendo grupo referencia MDA&lt;40 µg/L

MDA ≥ 40 µg/L	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
SOD	160	0,999	0,996-1,001	0,416	113	0,999	0,995-1,005	0,926
GPx	161	1,274	1,073-1,512	0,006*	113	1,205	0,967-1,502	0,096
CAT	126	0,986	0,949-1,025	0,472	113	1,004	0,958-1,052	0,870
VIT C	153	1,025	1,015-1,035	<0,001*	113	1,022	1,010-1,034	<0,001*
FOLATO	148	0,959	0,898-1,024	0,207	113	0,93	0,849-1,018	0,114

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 23,559 (p-valor <0,001).

\*p<0,05

### 5.3.2.3.3 Estudios del Cuestionario socio-demográfico y clínico

El hábito tabáquico fue el único parámetro del Cuestionario en el que había diferencias significativas entre ambos grupos, tanto los exfumadores y los no fumadores (p=0,033) como las personas no expuestas a ambientes cargados de humo de tabaco (p=0,036) pertenecían al grupo de sujetos con mayor lipoperoxidación. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 79. Comparación en el consumo de tabaco en función del resultado del MDA

	MDA < 40 µg/L		MDA ≥ 40 µg/L		P-valor
	n	%	n	%	
<b>Frecuencia de consumo de tabaco</b>					
No fumador	29	44,6	36	55,4	0,033*
Ex fumador	16	44,4	20	55,6	
≤10 cig/día	13	72,2	5	27,8	
>10 cig/día	22	68,7	10	31,3	
<b>¿Acostumbra a estar en ambientes cargados de humo de tabaco?</b>					
No	39	46,4	45	53,6	0,036*
Sí	20	69,0	9	31,0	

\*p<0,05

Figura 46. Distribución del hábito tabáquico para cada grupo del modelo

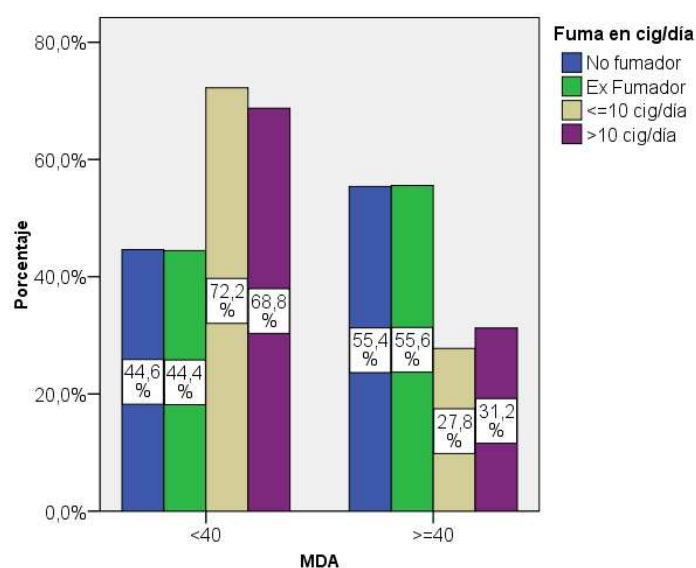
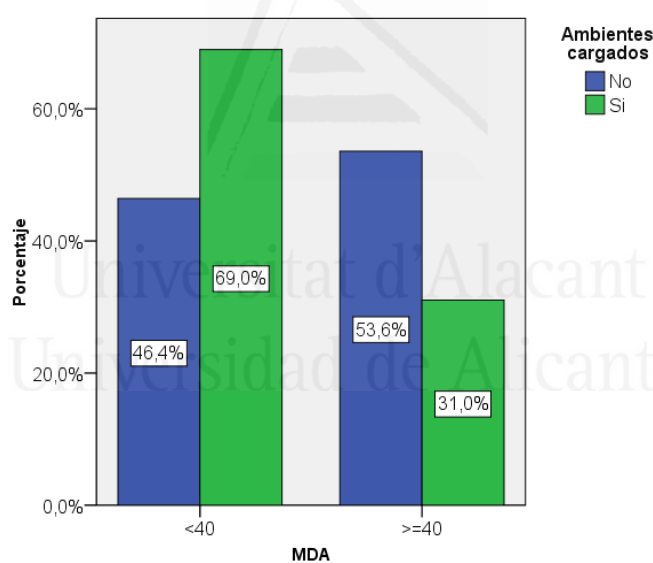


Figura 47. Distribución de la exposición a ambientes cargados de humo de tabaco para cada grupo del modelo



Realizada la regresión logística binaria, comprobamos que el ser fumador activo disminuía la probabilidad de pertenecer al grupo de sujetos con una concentración de  $MDA \geq 40 \mu\text{g/L}$ , es decir, de presentar elevada peroxidación lipídica en su plasma seminal. Esto ocurría tanto en el crudo como en el ajustado considerando también el consumo de drogas en los últimos 3 meses, en donde el ser fumador activo presentaba un ORP de 0,344 (IC<sub>95%</sub> 0,152-0,781) respecto al grupo no fumador, que era la variable de referencia. Obsérvese en la siguiente tabla:

Tabla 80. Regresión logística binaria. Odds ratio de prevalencia crudos y ajustados entre los parámetros del Cuestionario con MDA, siendo grupo referencia MDA&lt;40 µg/L

MDA ≥ 40 µg/L	Crudos				Ajustados			
	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor	n	ORP	IC <sub>95%</sub>	P-valor
<b>Fuma</b>								
No fumador	65	1			64	1		
Exfumador	36	1,007	0,444-2,285	0,987	36	0,927	0,395-2,175	0,862
Fumador activo	50	0,345	0,159-0,751	0,007*	50	0,344	0,152-0,781	0,011*
<b>Consumo de drogas últimos 3 meses</b>								
No	118	1			118	1		
Sí	33	0,591	0,267-1,310	0,195	32	0,780	0,333-1,825	0,548

Ajuste global del modelo, Chi-cuadrado de la razón de verosimilitud 9,00 (p-valor=0,029).

\*p<0,05

## 5.4 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas encontradas para la infertilidad masculina

Para analizar la precisión diagnóstica de las variables cuantitativas que mostraron diferencias estadísticamente significativas para cada modelo de agrupación de sujetos, se realizó la curva ROC y se midió su área bajo la curva (ABC) y su intervalo de confianza (IC) al 95%. Sólo presentaremos aquellas curvas cuya ABC sea superior a 0,5, valor mínimo para considerar un test válido como prueba diagnóstica, y que además muestren significación estadística (p<0,05). Acompañando a estos datos se detallan los valores de Sensibilidad y Especificidad directamente del punto de corte considerado óptimo, así como los Valores Predictivos Positivos (VPP) y Valores Predictivos Negativos (VPN) correspondientes.

Asimismo, para determinar con mayor exactitud el papel de estos marcadores diagnósticos en la infertilidad masculina, se realizó un análisis de regresión logística múltiple. Se controlaron las variables diagnósticas prefijadas por las curvas ROC en cada caso. Para ello se agruparon las variables según el valor óptimo obtenido de las curvas ROC y se calculó la odds ratio (OR) y los intervalos de confianza del 95%.

### 5.4.1 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del seminograma

De todas las variables estudiadas en este modelo de agrupación de sujetos, sólo el Ni y el Mn fueron válidos como pruebas diagnósticas para el grupo de varones infértiles, por presentar un  $ABC > 0,5$ .

En los siguientes gráficos se muestran las curvas ROC para estas variables tanto por separado como en conjunto, y el punto de corte óptimo para poder diferenciar a los pacientes pertenecientes al grupo de estudio.

Figura 48. Curva ROC para la variable Ni

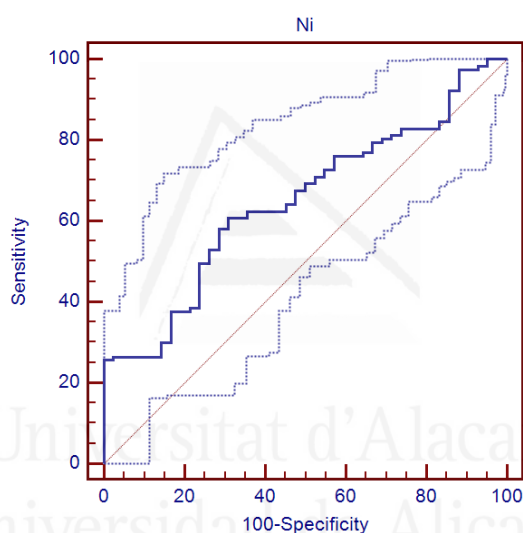


Figura 49. Curva ROC para la variable Mn.

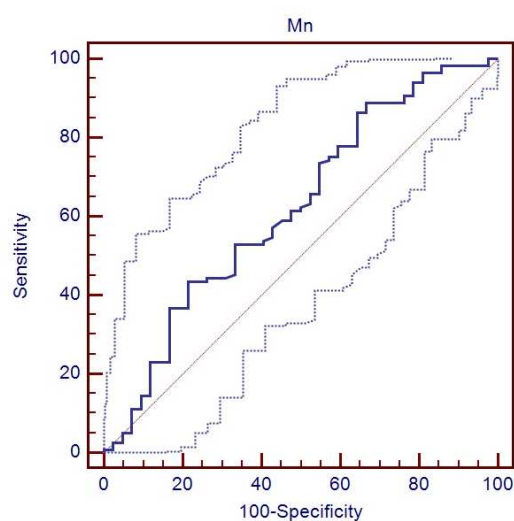


Figura 50. Curva ROC para el modelo logístico (Ni + Mn)

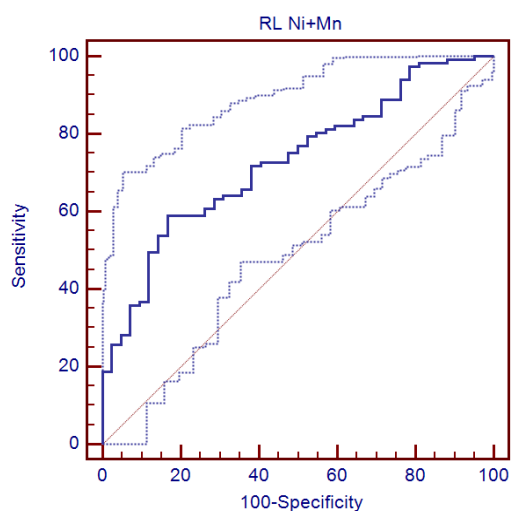


Tabla 81. Predictores del modelo y sus ABC

Predictor	Punto de Corte	ABC	Error Tip.	P-valor	IC <sub>95%</sub>
Ni	>2,17	0,649	0,0462	0,0013*	0,569-0,723
Mn	≤4,8	0,622	0,0527	0,0209*	0,541-0,697
(Ni + Mn)	>0,75	0,730	0,0425	<0,001*	0,653-0,797

\* $p < 0,05$ 

De los 3 predictores, el que mayor ABC presentó, y por tanto, mayor poder discriminador, fue el modelo logístico (Ni + Mn) en el que consideramos ambos parámetros de forma conjunta (ABC=0,730). Los puntos de corte para cada parámetro que permiten clasificar a los varones en el grupo de estudio fueron: para el Ni >2,17 µg/L, para el Mn ≤4,8 µg/L, y para el modelo logístico (Ni + Mn) >0,75. A continuación se presentan los puntos de corte óptimos para cada caso junto a su Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN y los ORP.

Tabla 82. Tabla de contingencia y valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y ORP con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para los puntos de corte seleccionados para Ni, Mn, y modelo logístico (Ni + Mn)

	Grupos en función de los criterios de la OMS		S (%) (IC <sub>95%</sub> )	E (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPP (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPN (%) (IC <sub>95%</sub> )	ORP (IC <sub>95%</sub> ) (P-valor)	
	Grupo de estudio	Grupo de referencia						
<b>Ni</b> (µg/L)								
>2,17	71	13	60,68	69,05	84,3	38,2		1,739
≤2,17	46	29	(51,2-69,6)	(52,9-82,4)	(74,7-91,4)	(27,2-50,0)		(1,190-2,542) 0,004
<b>Total</b>	117	42						
<b>Mn</b> (µg/L)								
≤4,8	104	28	88,89	33,33	78,8	51,9		0,845
>4,8	13	14	(81,7-93,9)	(19,6-49,5)	(70,8-85,4)	(31,9-71,3)		(0,741-0,964) 0,012
<b>Total</b>	117	42						
<b>(Ni+Mn)</b>								
>0,75	69	8	58,97	83,33	90,8	42,2	<b>Ni</b>	2,038
≤0,75	48	34	(49,5-68,0)	(68,6-93,0)	(81,9-96,2)	(31,4-53,5)		(1,318-3,150) 0,001
<b>Total</b>	117	42					<b>Mn</b>	0,787 (0,677-0,915) 0,002

\* $p < 0,05$

En el modelo de agrupación de los varones en función de los criterios de la OMS, las variables significativas fueron el Ni y el Mn. Considerando cada variable de forma independiente, podemos observar que el Ni es un factor de riesgo (ORP=1,739) y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de pertenecer al grupo de estudio. En cambio el Mn es un factor protector (ORP=0,845). Pero al estudiar ambas variables en conjunto (Ni + Mn) se obtiene una mayor Especificidad diagnóstica (E=83.33%) y un mayor Valor Predictivo Positivo (VPP= 90,8%), además de una mayor ABC como ya hemos comentado (ABC=0,730).

Para obtener el punto de corte del modelo logístico que nos permitirá clasificar a los sujetos en uno de los 2 grupos del modelo, se utilizó la siguiente ecuación:



Ecuación 1. Cálculo del punto de corte del modelo logístico (Mn+Ni)

$$P(\text{grupo a estudio/Ni,Mn}) = \frac{1}{1 + e^{-0,198 - 0,712\text{Ni} + 0,239\text{Mn}}}$$

A continuación presentamos la comparación de los predictores de este modelo.

Figura 51. Comparación de los predictores en función del seminograma

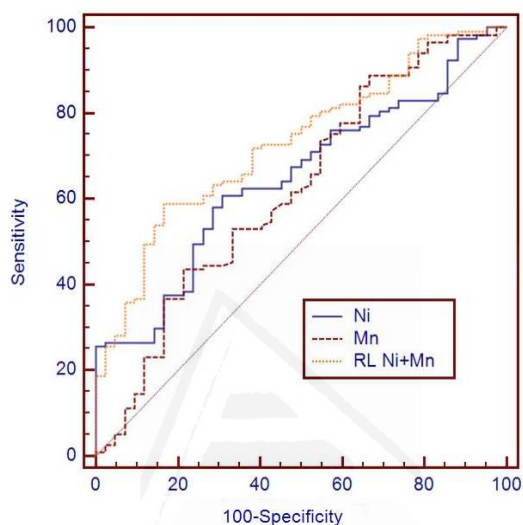


Tabla 83. Comparación curvas ROC

Predictor	Diferencia entre áreas	Error estándar	IC <sub>95%</sub>	P-valor
Ni ~ Mn	0,0273	0,0777	-0,125-0,180	0,726
Ni ~ (Ni+Mn)	0,0806	0,0387	0,00469-0,156	0,037*
Mn ~ (Ni+Mn)	0,108	0,0495	0,0108-0,205	0,029*

\* $p < 0,05$

En esta tabla comparamos las ABC de los tres predictores del modelo. En ella podemos observar que no hay diferencias significativas entre las comparaciones de las ABC del Ni y Mn por separado ( $p=0,726$ ), pero al comparar cualquiera de los dos frente al modelo logístico (Ni + Mn) sí se puede apreciar diferencias entre ellos ( $p=0,037$  y  $p=0,029$ , respectivamente), siendo mejor el ABC del modelo logístico.

Por tanto, el mejor predictor para esta clasificación de varones es el modelo logístico (Ni + Mn) en el que se considera el Ni y el Mn en conjunto (ABC=0,730; S= 58,97%;

E=83.33%; VPP= 90,8%; VPN=42,2%), y cuyo punto de corte  $>0,75$  indicará que el sujeto pertenecerá al grupo de varones que no cumplen los criterios de la OMS.

#### 5.4.2 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del test de capacitación

Para este modelo las variables significativas fueron la motilidad progresiva, el porcentaje de formas normales y la GPx.

A continuación se presentan las curvas ROC para estas variables tanto por separado como en conjunto, y el punto de corte óptimo para discriminar el grupo al que pertenecerán los varones.

Figura 52. Curva ROC para la variable Motilidad progresiva

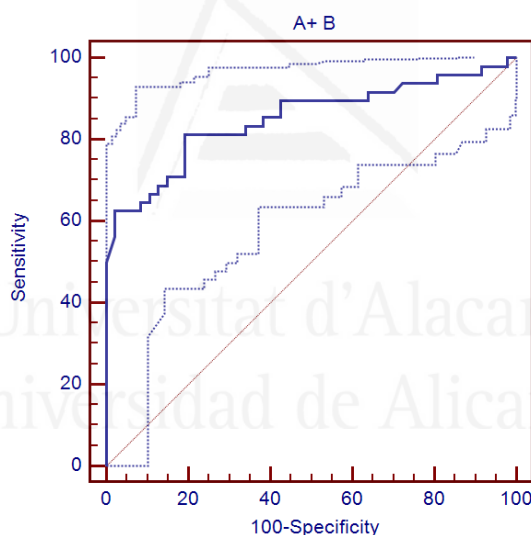


Figura 53. Curva ROC para la variable porcentaje de Formas normales

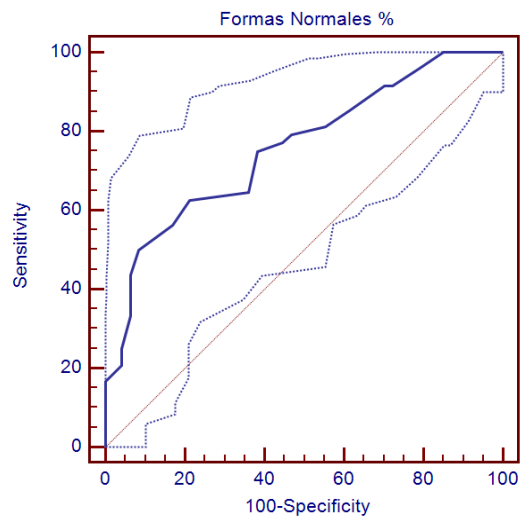


Figura 54. Curva ROC para la variable GPx

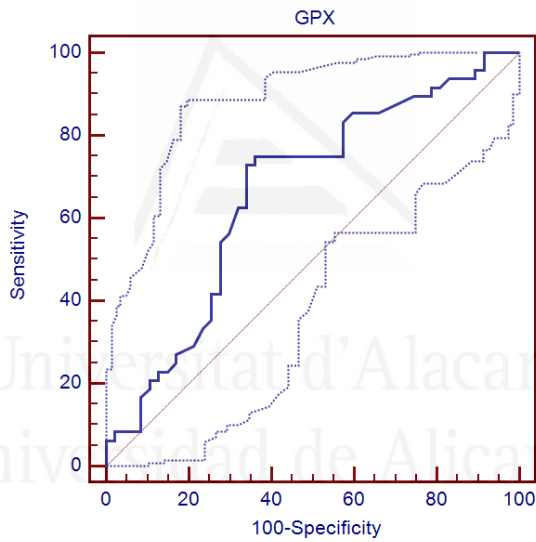


Figura 55. Curva ROC para las variables Motilidad progresiva, Formas normales y GPx

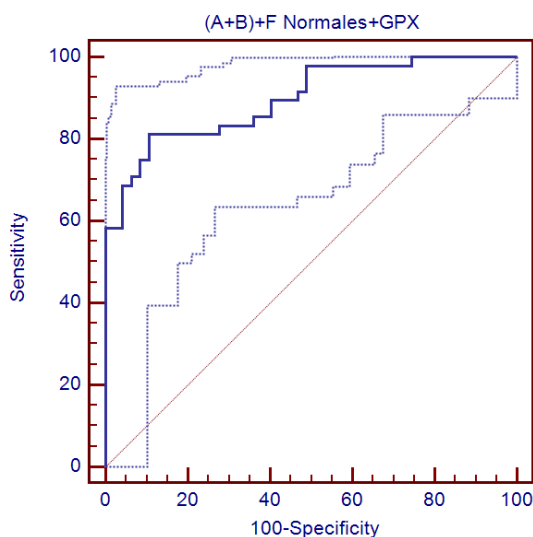


Tabla 84. Predictores del modelo y sus ABC

Predictor	Punto de Corte	ABC	Error Tip.	P-valor	IC <sub>95%</sub>
(A+B) (%)	≤ 50	0,851	0,041	<0,001*	0,763-0,916
F. normales (%)	≤ 11	0,757	0,0491	<0,001*	0,658-0,839
GPx (U/L)	≤9,88	0,662	0,0571	0,0045*	0,558-0,756
<b>((A+B)+F.n<sup>(Δ)</sup>+GPx)</b>	<b>&gt;0,533</b>	<b>0,898</b>	<b>0,0312</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,819-0,951</b>

F.n<sup>(Δ)</sup>: Formas normales

\*p&lt;0,05

Los cuatro predictores fueron significativos, pero el que mayor área bajo la curva presentaba, y por tanto mayor poder discriminador, fue el modelo logístico que incluye motilidad progresiva, formas normales y GPx en conjunto, con un ABC de 0,898.

Para el cálculo del punto de corte del modelo logístico se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Cálculo del punto de corte del modelo logístico ((A+B)+F.n+GPx)

$$P(\text{REM} < 10 / \text{GPx}, \text{F.n}, \text{(A+B)}) = \frac{1}{1 + e^{-10,43 + 0,348\text{GPx} + 0,191\text{Fn} + 0,079(\text{A+B})}}$$

Los puntos de corte óptimos que mejor discriminaban entre los varones, ya que indicaban la pertenencia al grupo que capacitaba peor, fueron: para la motilidad progresiva ≤50%, para las formas normales ≤11%, para la GPx ≤9.88 U/mL, y para el

modelo logístico  $>0,533$ . A continuación se presentan la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y los ORP para cada caso.

Tabla 85. Tabla de contingencia y valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y ORP con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para los puntos de corte seleccionados para (A+B), F. normales, GPx y modelo logístico ((A+B)+F. normales+GPx)

	REM		S (%) (IC <sub>95%</sub> )	E (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPP (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPN (%) (IC <sub>95%</sub> )	ORP (IC <sub>95%</sub> ) (P-valor)	
	<10	≥10						
<b>A+B (%)</b>								
≤ 50	39	9	81,25	80,85	81,2	80,9		0,922
> 50	9	38	(67,4-91,1)	(66,7-90,9)	(67,4-91,1)	(66,7-90,9)		(0,892-0,954)
<b>Total</b>	48	47						<0,001*
<b>F.n<sup>(Δ)</sup> (%)</b>								
≤ 11	37	27	50	91,49	85,7	64,2		0,841
> 11	11	20	(35,2-64,8)	(79,6-97,6)	(67,3-96,0)	(51,5-75,5)		(0,772-0,917)
<b>Total</b>	48	47						<0,001*
<b>GPx (U/L)</b>								
≤9,88	35	16	72,92	65,96	68,6	70,5		0,735
> 9,88	13	31	(58,2-84,7)	(50,7-79,1)	(54,1-80,9)	(54,8-83,2)		(0,582-0,954)
<b>Total</b>	48	47						0,010*
<b>((A+B) + F.n<sup>(Δ)</sup> +GPx)</b>								
>0,533	39	5	81,25	89,36	88,6	82,4	A+B	0,924 (0,889-0,961) <0,001*
≤ 0,533	9	42	(67,4-91,1)	(76,9-96,5)	(75,4-96,2)	(69,1-91,6)		
<b>Total</b>	48	47						
							GPx	0,706 (0,518-0,962) 0,028*
							F.n <sup>(Δ)</sup>	0,826 (0,734-0,930) 0,002*

F.n<sup>(Δ)</sup>: Formas normales

\* $p < 0,05$

Los resultados de la regresión logística indican que el modelo logístico que incluye motilidad progresiva, formas normales y GPx, era el que presentaba en conjunto una mayor Sensibilidad y Especificidad diagnósticas (S=81,25%, E=89,36%), mejor Valor

Predictivo Positivo y mejor Valor Predictivo Negativo (VPP=88,6%, VPN=82,4%) para este modelo.

A continuación se expone la comparación de los predictores de este modelo.

Figura 56. Comparación de los predictores en función del REM

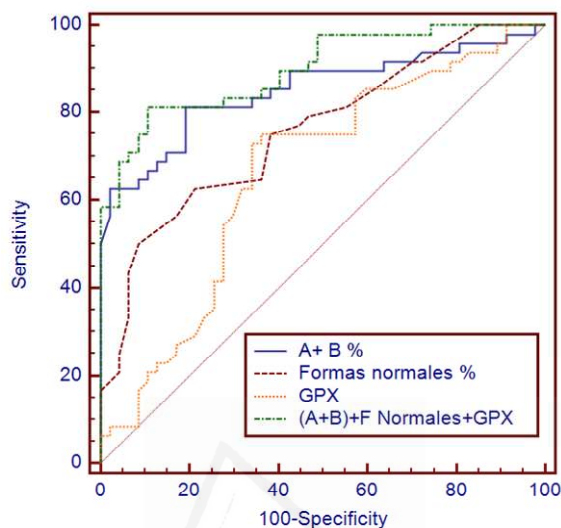


Tabla 86. Comparación curvas ROC

Predictor	Diferencia entre áreas	Error estándar	IC <sub>95%</sub>	P-valor
(A+B) ~F. nor.	0,0942	0,0634	-0,0302-0,219	0,138
(A+B) ~GPx	0,189	0,0734	0,0452-0,333	0,010*
(A+B) ~(F. nor.+ GPx +(A+B))	0,047	0,0301	-0,0121-0,106	0,119
F. nor. ~ GPx	0,0949	0,0813	-0,0645-0,254	0,243
F. nor. ~ (F. nor.+ GPx +(A+B))	0,141	0,0453	0,0523-0,230	0,002*
GPx ~ (F. nor.+ GPx +(A+B))	0,236	0,0604	0,118-0,355	<0,001*

\* $p < 0,05$

Todos los predictores fueron eficaces para discriminar entre los grupos en función del REM, puesto que todos ellos contaron con un  $ABC > 0,5$ . Sin embargo, el test de comparación de predictores mostró algunas diferencias estadísticamente significativas entre ellos, como puede observarse en la comparación de las ABC entre la motilidad progresiva con la GPx ( $p=0,010$ ), donde el ABC fue mejor en la primera. Otro tanto ocurre entre el modelo logístico con las formas normales ( $p=0,002$ ), y con la GPx ( $p < 0,001$ ), donde en ambos casos el ABC fue mayor en el modelo logístico. Entre la motilidad progresiva y el modelo logístico no existieron diferencias significativas pero,

al ser el ABC del segundo ligeramente superior, podemos afirmar que el mejor predictor en esta agrupación de sujetos es el modelo logístico.

Por lo tanto, cabe destacar que el mejor predictor de todos los estudiados, para discernir si el semen de un varón va a capacitar bien o no, es el modelo logístico (ABC=0,898; S=81,25%; E=89,36%; VPP=88,6%; VPN=82,4%), su punto de corte  $>0,533$  indicará que el sujeto pertenecerá al grupo de varones cuyo semen no capacita bien.

#### 5.4.3 Estudio de la precisión diagnóstica de las variables significativas en función de los resultados del MDA.

En el análisis estadístico de las curvas ROC (Tabla 87) se observó que los diferentes marcadores medidos tenían unas ABC significativamente superiores a 0,5. Por ello, los tres predictores fueron significativos, pero el que mayor área bajo la curva presentaba fue el valor pronosticado de la regresión logística, que consideraba en conjunto Vitamina C y el Co, seguido muy de cerca por la Vitamina C individualmente.

Figura 57. Curva ROC para la variable Co

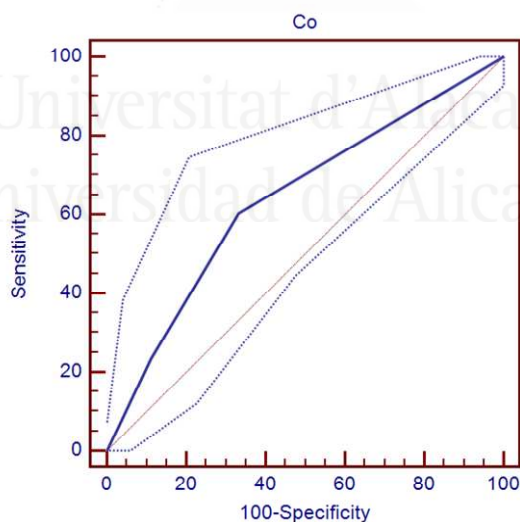


Figura 58. Curva ROC para la variable Vitamina C

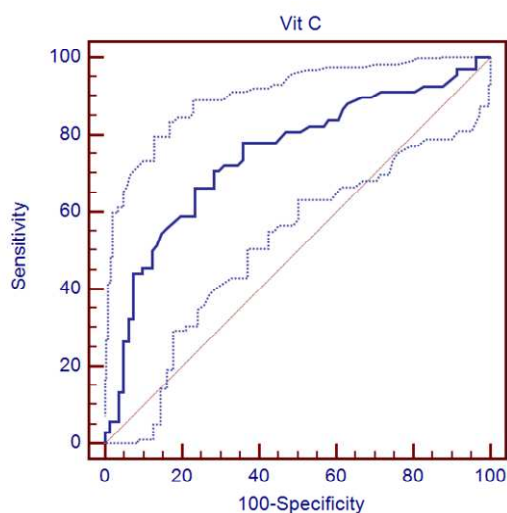


Figura 59. Curva ROC para las variables Vitamina C y Co

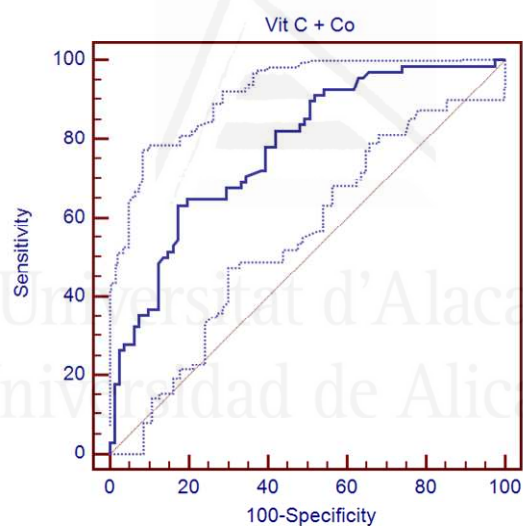


Tabla 87. Predictores del modelo y sus ABC.

Predictor	Punto de Corte	ABC	Error Tip.	P-valor	IC <sub>95%</sub>
Co (µg/L)	≤ 60	0,641	0,0415	<0,001*	0,558-0,717
VIT C (µg/dL)	< 0,2	0,746	0,0417	<0,001*	0,668-0,813
(VIT C + Co)	>0,489	0,776	0,0377	<0,001*	0,701-0,840

\* $p < 0,05$ 

Para el cálculo del punto de corte del modelo logístico se utilizó la siguiente ecuación:



Ecuación 3. Cálculo del punto de corte del modelo logístico (VIT C+Co)

$$P(\text{MDA} \geq 40 / \text{Vit C, Co}) = \frac{1}{1 + e^{-2,046 + 0,024\text{Vit C} + 1,099z1 + 1,092z2}}$$

Valores de Z1:

$z1 = 1$  Si Co tiene una concentración de 0,2-0,4  $\mu\text{g/L}$

$z1 = 0$  En el resto de casos

Valores de Z2:

$Z2 = 1$  Si Co tiene una concentración  $\geq 0,4 \mu\text{g/L}$

$Z2 = 0$  En el resto de casos

Los puntos de corte óptimos que mejor discriminaban entre los grupos de MDA fueron:  $\leq 0,6 \mu\text{g/L}$  para la Vitamina C,  $\leq 0,2 \mu\text{g/L}$  para el Co, y  $\leq 0,513$  para el valor pronosticado de la regresión logística de la Vitamina C y el Co. En la siguiente tabla se presentan los puntos de corte óptimos para cada caso junto a su sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y los ORP.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Tabla 88. Tabla de contingencia y valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y ORP con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para los puntos de corte seleccionados para Co, VIT C, modelo logístico (VIT C + Co)

	MDA		S (%) (IC <sub>95%</sub> )	E (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPP (%) (IC <sub>95%</sub> )	VPN (%) (IC <sub>95%</sub> )	ORP (IC <sub>95%</sub> ) (P-valor)	
	≥ 40	< 40						
<b>VIT C (µg/L)</b>								
≤ 60	23	62	66,18	76,54	70,3	72,9		1,024
> 60	45	19	(53,7-77,2)	(65,8-85,2)	(57,6-81,1)	(62,1-82,1)		(1,014-1,034)
<b>Total</b>	68	81						<0,001*
<b>Co (µg/L)</b>								
< 0,2	27	54	60,29	66,67	60,3	66,7		2,041
≥ 0,2	41	27	(47,7-72,0)	(55,3-76,8)	(47,7-72,0)	(55,3-76,8)		(1,299-3,208)
<b>Total</b>	68	81						0,002*
<b>(VIT C + Co)</b>								
≤0,513	25	67	63,24	82,72	75,4	72,8	<b>VIT C</b>	1,024 (1,014-1,035) <0,001*
>0,513	43	14	(50,7-74,6)	(72,7-90,2)	(62,1-86,0)	(62,6-81,6)	<b>Co</b>	
<b>Total</b>	68	81					<0,2	1
							≥0,2- <0,4	3 1,310-6,868 0,009*
							≥0,4	2,981 1,021-8,704 0,046*

\* $p < 0,05$

A continuación presentamos la comparación de los predictores de este modelo.

Figura 60. Comparación de los predictores en función del MDA

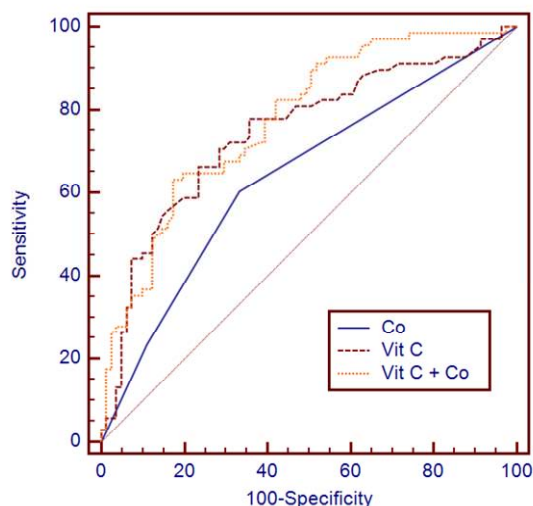


Tabla 89. Comparación curvas ROC

Predictor	Diferencia entre áreas	Error estándar	IC <sub>95%</sub>	P-valor
Co ~ VIT C	0,105	0,0599	-0,0124-0,223	0,080
Co ~ (VIT C+Co)	0,136	0,0417	0,0541-0,217	0,001*
VIT C ~ (VIT C+Co)	0,0306	0,0245	-0,0175-0,0787	0,213

\* $p < 0,05$ 

En el test de comparación de predictores se observó que los mejores predictores para discriminar entre los grupos de MDA fueron la Vitamina C y el modelo logístico Vitamina C junto a Co. Esto se debe a que no se encontraron diferencias significativas entre las diferencias de ambas ABC ( $p=0,213$ ). De igual manera ocurre cuando comparamos Co y Vitamina C ( $p=0,08$ ). En cambio al comparar Co con el modelo logístico Vitamina C junto a Co sí hubo diferencias entre ambos predictores ( $p=0,001$ ), siendo mejor predictor el modelo logístico, puesto que presentaba mayor área bajo la curva.

En suma el mejor predictor es el modelo logístico que considera la vitamina C y el Co en conjunto (ABC=0,776; S=63,24%; E=82,72%; VPP=75,4%; VPN=72,8%), y cuyo punto de corte  $\leq 0,513$  indicará que el sujeto pertenecerá al grupo de varones con elevada lipoperoxidación.







## **DISCUSIÓN**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



---

Entre las parejas infértiles que se someten a estudios básicos de infertilidad, del 10 al 20% obtienen resultados normales en todas las pruebas diagnósticas y son diagnosticadas etiológicamente como infertilidad idiopática (Esteves et al., 2011).

Actualmente, se está tratando de encontrar posibles explicaciones para el aumento progresivo de casos de infertilidad en los últimos años. Existe una disminución mundial en la calidad del semen que se ha vinculado a exposiciones ambientales y tóxicas constantes. El trabajo, la industria, el medio ambiente y las exposiciones terapéuticas y dietéticas a un amplio rango de productos químicos y de metales, tienen efectos perjudiciales en la fertilidad masculina. Incluso algunos autores consideran que la contaminación ambiental es la principal razón del declive de la calidad del semen humano a lo largo de los años (Giudice, 2006; Saradha et al., 2006; Matorral et al., 2007; Hammoud et al., 2008a; Agarwal et al., 2012a; Mínguez-Alarcón et al., 2012).

Todos estos factores se han señalado como posibles causantes directos o indirectos del desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad de los sistemas biológicos de desintoxicar fácilmente los intermedios reactivos o de reparar el daño producido, dando lugar al estrés oxidativo en el plasma seminal (Elejalde, 2001; Saradha et al., 2006; Matorral et al., 2007; Liu et al., 2010; Wong et al., 2011; Agarwal et al., 2012a; Mínguez-Alarcon et al., 2012).

Las EROs pueden causar infertilidad fundamentalmente a través de dos mecanismos: dañando el ADN del núcleo del espermatozoide y/o induciendo la peroxidación lipídica en la membrana celular espermática. Como consecuencia de estos cambios, el espermatozoide pierde su capacidad para la fertilización y su habilidad de mantener un desarrollo embrionario normal (Baker et al., 2004; Tortolero et al., 2005; Kruger et al., 2007, Agarwal et al., 2012b).

Mientras los estudios de investigación sugieren que hasta el 80% de hombres estériles tienen evidencias de estrés oxidativo (Agarwal et al., 2006; Tremellen, 2008; Agarwal et al., 2012a), la mayoría de especialistas en fertilidad no somete a sus pacientes a pruebas para su evaluación ni ofrece un tratamiento antioxidante empírico. Esto se debe, principalmente, a una falta de disponibilidad de pruebas de estrés oxidativo en la mayoría de los laboratorios clínicos de Andrología y a un desconocimiento general entre los médicos de la importancia del estrés oxidativo como una causa de infertilidad masculina (Agarwal et al., 2012a).



Tampoco existe un protocolo establecido del estudio de estrés oxidativo en el hombre en las Unidades de Reproducción Asistida, ni se disponen de rangos de referencia de marcadores de EO en semen. De manera que las parejas participan en técnicas como la fertilización *in vitro* o la inseminación intrauterina, con elevados costes económicos, no exentas de riesgo y que muchas veces pueden no tener el resultado deseado. De hecho, el daño oxidativo del ADN espermático no mejora con la fertilización *in vitro* o la inseminación y, sin embargo, el tratamiento directo del estrés oxidativo podría permitir tener una concepción natural o mejorar el rendimiento de una IA (Tremellen, 2008). Además, hasta el momento, ningún estudio ha detallado evidencias de efectos secundarios perjudiciales de una terapia antioxidante (Jungwirth et al., 2012).

Por todo ello, es importante desarrollar métodos de diagnóstico precisos, económicos y asequibles a los laboratorios clínicos de los hospitales, para identificar la presencia del EO en el semen. Además, las mediciones bioquímicas de los marcadores de estrés oxidativo son más fácilmente estandarizables que las cito-morfológicas del seminograma. Finalmente, es necesario avanzar en métodos basados en la intervención con antioxidantes o manipulación del sistema redox que permitan proteger al semen del EO (Mallok et al., 2011). Esto es lo que nos propusimos investigar en este estudio.

En nuestro laboratorio pusimos a punto las diferentes técnicas tratando de minimizar el volumen de muestra necesario. Tras una serie de pruebas preliminares, concluimos que era necesario un mínimo de 2 mL de semen para la determinación de todos los parámetros propuestos. A pesar de esto, dado el elevado número de determinaciones que tratamos de realizar en las muestras de plasma seminal y lo reducido del volumen del eyaculado, no pudimos realizar siempre todas las determinaciones, o incluso tuvimos que excluir del estudio a algunos sujetos. Asimismo, no todos los varones cumplimentaron correctamente el Cuestionario *ad hoc* o ni siquiera lo realizaron alegando distintos motivos, en cualquier caso fueron una minoría, tan solo 11.

Se han utilizado numerosos métodos para medir el daño oxidativo en los sistemas biológicos. Básicamente, el estudio del EO se realiza midiendo el equilibrio/desequilibrio de los agentes implicados en su aparición (oxidantes) y los protectores (antioxidantes endógenos o exógenos) o bien, valorando los resultados de la actividad oxidativa. En este trabajo nos centramos en la valoración del EO mediante la determinación de agentes antioxidantes, como son las enzimas (SOD, GPx y catalasa) y las vitaminas antioxidantes (B<sub>12</sub>, C y folato), y de productos del EO como el

MDA (producto de peroxidación lipídica). Adicionalmente, se investigó el papel que juegan varios Metales y Elementos Traza, algunos con implicación no del todo establecida en el EO y, finalmente, los factores ambientales mediante un Cuestionario socio-demográfico y clínico *ad hoc*. Seleccionamos estas determinaciones con el fin de abarcar todas las posibles variables representativas que puedan intervenir en el estrés oxidativo de un modo u otro.

Las técnicas de laboratorio utilizadas para medir los parámetros del seminograma y de la capacitación seminal incluidos en el estudio, se ajustan a las normas de la rutina analítica básica recomendada por la OMS (WHO, 1999). Sin embargo, los ensayos utilizados con fines de investigación para determinar el EO son técnicas especiales que no realizamos habitualmente en el laboratorio de nuestro hospital. Además de las determinaciones incluidas en nuestro estudio, existen otras que participan en el sistema antioxidante (vitamina A y E), oxidante (óxido nítrico) y productos de oxidación (8-hidroxi-2-deoxiguanosina), que no hemos analizado, bien por no disponer de la tecnología adecuada para determinarlas, o bien por presentar interferencias debido a la matriz de la muestra.

Se estimó la precisión de las técnicas del presente trabajo mediante la medición de la repetibilidad y la reproducibilidad. Los valores del coeficiente de variación (CV) para la repetibilidad fueron todos inferiores al 7,8%, excepto para el MDA, pero al encontrarse por debajo del límite de aceptación (<2,5 DE), dimos por demostrada la buena precisión de los métodos utilizados. En lo que respecta a la reproducibilidad, los CV fueron todos inferiores al 10,0%, que se encuentra por debajo del límite de aceptación, de 2 a 3 veces la repetibilidad.

Además, los métodos utilizados fueron exactos, puesto que los límites de tolerancia diferentes del margen de error se encontraban por debajo de los límites de aceptación ( $\pm 15,0\%$ ) en todos los niveles de concentración analizados. Sólo obtuvimos una excepción, el de la SOD, cuyo límite de tolerancia fue del 16,5%, por lo que lo consideramos el método menos exacto. Este hecho puede deberse a que el procesamiento de la muestra control utilizada para la determinación de la exactitud requirió varias diluciones, entre ellas una al 1:200, que probablemente aumentara el error en su preparación.

Los resultados de la linealidad y límite de detección de las distintas técnicas fueron aceptables, ya que abarcan las concentraciones necesarias en cada una de ellas.

La determinación de los Metales y Elementos Traza se realizó utilizando la tecnología de ICP-MS. La técnica se encontraba optimizada para el análisis de metales en matrices distintas del plasma seminal, por ello tuvimos que ponerla a punto. La repetibilidad del método fue inferior al 10,8% para todos los metales, lo que mostró la excelente precisión de la tecnología propuesta. La reproducibilidad también se encontró en todos los casos por debajo del límite de aceptación.

De partida, un aspecto a tener en cuenta respecto a la selección de los varones que participaron en nuestro estudio fue el establecimiento de un grupo de sujetos control, ya que si bien es cierto que el reclutamiento de pacientes se realizó desde la Consulta de Reproducción del Servicio de Ginecología, esto no implicaba que los pacientes que participaron en nuestra investigación fueran infértiles. El problema de la infertilidad, muchas veces, es un problema individual de uno de los miembros de la pareja y para esa pareja en concreto. De hecho, muchos de los varones que han tenido descendencia con parejas anteriores acuden a la Consulta de Reproducción por problemas de infertilidad con sus actuales parejas y logran, en algunos casos, gracias a las técnicas de capacitación espermática embarazos con sus parejas.

Es cierto que en el Apartado 3 (Sujetos a Estudio) no se describe la inclusión de un grupo de sujetos que tengan fertilidad demostrada, pero los objetivos de la investigación han sido determinar la presencia de estrés oxidativo en muestras de semen de varones comparando dos grupos: los que presentaban resultados del seminograma dentro de los valores de referencia de la OMS, con los que presentaban resultados anormales o problemas de capacitación espermática. Para nuestros fines, el primer grupo constituye el grupo control o de referencia, ya que no tratamos de valorar la fertilidad sino la calidad seminal.

Los sujetos incluidos en este estudio presentaron, en general, unas características seminales dentro de los valores de referencia de la OMS de 1999 y, por tanto, también de los del año 2010, al ser unos valores menos estrictos que los anteriores, tal y como expusimos en la Tabla 3. Sólo encontramos tres excepciones, por un lado el porcentaje de motilidad progresiva y el de vitalidad, con unas medias menores del 50% y del 75% respectivamente que establece la OMS 1999. Por otro lado, para el citrato se obtuvo una media que superaba el intervalo de referencia de la OMS. Finalmente, la mediana del REM fue mayor de  $5 \times 10^6$ , por lo que los sujetos presentaban sémenes que capacitaban bien o muy bien.

La edad media de los varones fue de 35 años, con un IMC medio ligeramente superior a 26 kg/m<sup>2</sup>, es decir, presentaban sobrepeso según la clasificación del estado nutricional de la OMS. De los hábitos de vida cabe resaltar que más del 50% de los varones no alcanzaba las recomendaciones nutricionales mínimas de la SENC para el consumo de naranja, kiwi, zanahoria, calabaza o calabacín, huevo y aceites vegetales. Lo que indica que nuestros sujetos podrían presentar un aporte insuficiente de vitaminas A, B<sub>12</sub>, C y E.

En cuanto al consumo de tóxicos destaca que el 35,1% de los varones era fumador, porcentaje muy similar al aportado por el Instituto Nacional de Estadística para el año 2009. Según el INE el 35,28% de los varones españoles con una edad comprendida entre 16 y 44 años era fumador diario y el 5,31% ocasional (INE, 2009). Por lo tanto, nuestra muestra era representativa de la población. Por otro lado, un 38,1% de los sujetos reconocía haber consumido con frecuencia alcohol en los 3 últimos meses. Este dato resulta elevado comparado con los aportados por el Ministerio de Sanidad y Consumo para el año 2009. Según los datos del Ministerio el porcentaje de varones que consumían alcohol diariamente oscilaba, en función de la edad (de 15 a 44 años), entre el 2,1% y 15,4% (OED, 2009). Pero, sobre todo, destaca el consumo de drogas de los sujetos de nuestra serie. El 25,7% confesó consumir o haber consumido drogas en algún momento, de ellos el 23,8% lo había hecho en los últimos 3 meses, aunque el 18,5% declaró hacerlo de forma esporádica. La droga más consumida fue el cannabis seguida de la cocaína, y un pequeño grupo de sujetos confesó consumir ambas. Estos datos contrastan también con los aportados por el Ministerio de Sanidad y Consumo para el año 2009, puesto que en ellos se refleja que la prevalencia de consumo de cannabis y cocaína en los varones para ese año era de 14,8% y 4,2% respectivamente, y en los últimos 30 días de 11% y 2% respectivamente (OED, 2009). Por lo tanto, nuestros varones seguían la tendencia de la población general para el consumo de tabaco, pero se encontraban por encima de la media para el consumo de alcohol y drogas.

Finalmente, el 69,6% de los sujetos afirmaron realizar ejercicio físico, pero sólo lo practicaban diariamente el 21,4% de ellos, es decir, la mayoría de los varones de nuestro estudio llevaba una vida sedentaria.

El plasma seminal humano contiene muchos antioxidantes que constituyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos que juegan un papel importante en la función normal del espermatozoide. Muchos autores sugieren que bajos niveles de antioxidantes en el

plasma seminal puede ser una causa potencial de infertilidad, pero hay resultados muy contradictorios entre los distintos estudios (Shamsi et al., 2010; Atig et al., 2012a). Según Shamsi et al. (2010) estas contradicciones pueden deberse a las diferencias en la selección de la población caso/control, los criterios de inclusión/exclusión, los marcadores de estrés oxidativo considerados, o la exactitud de la técnica utilizada. Además, todo esto dificulta predecir el umbral de los antioxidantes en los varones fértiles e infértiles.

En lo que respecta a los niveles de las vitaminas antioxidantes presentes en el semen de los varones de nuestro estudio, en primer lugar debemos resaltar que apenas existen trabajos que hayan valorado los niveles de la vitamina C en plasma seminal, ya que los resultados presentados en la mayoría de los casos han sido determinados en sangre o en semen de animales, por lo que no disponemos de datos con los que comparar nuestra media (56,87 µg/dL). En cambio, Agarwal et al. afirman que la concentración de vitamina C en plasma seminal es 10 veces superior a la de la sangre (Agarwal, 2005; Agarwal et al., 2005a; Agarwal et al., 2010). Los valores de referencia propuestos por la Clínica Mayo para la vitamina C en plasma sanguíneo son de 600 a 2000 µg/dL (Mayo Medical Laboratories), por lo que nuestro resultado no cumple el criterio anterior. Podemos afirmar que nuestros varones presentaban en general bajas concentraciones de vitamina C en el plasma seminal.

Los estudios que relacionan la vitamina B<sub>12</sub> y el folato con la infertilidad masculina, en su mayoría también los determinan en suero y no en plasma seminal. Además, aquellos que sí que miden ambos antioxidantes en plasma seminal, lo realizan tras administración de suplementos vitamínicos a distintas concentraciones, para poder ver las diferentes respuestas a posibles tratamientos. Para la vitamina B<sub>12</sub> la media obtenida en nuestro estudio (1088,23 pg/mL) fue superior a la que presentan otros autores, 436,5 pg/mL y 784,77 pg/mL (Crha et al., 2010) o 689,89 pg/mL (Boxmeer et al., 2007). En cambio, el valor medio del folato en nuestros varones (9,60 ng/mL) fue similar a los niveles que encontramos de esta vitamina en la literatura, por ejemplo Crha et al. (2010) presentaron 9,71 ng/mL y Boxmeer et al. (2007) 11,34 ng/mL.

Para las enzimas antioxidantes también encontramos diversidad de resultados. La mediana de la SOD de nuestros sujetos fue de 234,80 U/mL, similar a la de Zelen et al. (2010), pero que contrasta con la de Tavalani et al. (2008) y Khosrowbeygi et al. (2007) que obtuvieron 6,88 U/mL o 5,89 U/mL para normozoospermicos y 7,79 U/mL o 5,32 U/mL para astenozoospermicos respectivamente. Estos resultados tan dispares

se obtuvieron utilizando el mismo método de medida, el kit Ransod de los Laboratorios Randox. Tal vez la diferencia pueda deberse al origen de los varones, en el primer estudio eran europeos (serbios) y en los dos últimos iraníes, nacionalidades con hábitos de vida y condiciones ambientales muy distintos. Por otra parte, nuestra mediana obtenida para la GPx fue de 9737,50 U/L, lo que difiere con los resultados de Tavilani et al. (2008) y Hsieh et al. (2006) que expusieron medias de 352 U/L o 480 U/L para normozoospermicos y 366 U/L o 470 U/L para astenozoospermicos respectivamente. Aunque sólo en el caso de Tavilani et al. (2008) utilizaron el mismo método de medida que nosotros, el kit Ransel de los Laboratorios Randox. Finalmente, la catalasa es la enzima menos estudiada en plasma seminal. La mediana obtenida en nuestro estudio fue de 14,42 nmol/min/mL (ó U/L), muy inferior a la obtenida por Zelen et al. (2010) que fue de 8,478 KU/L, 9,879 KU/L, 15,947 KU/L y 9,464 KU/L, según la clasificación de sus sujetos en normo-, oligo-, asteno- o teratozoospermicos respectivamente, y a los de Khosrowbeygi et al. (2007) que obtuvieron para los controles 22,58 U/mL y para los oligoastenoteratozoospermicos 12,61 U/mL. Es decir, ambos autores presentaron valores de catalasa en plasma seminal del orden de  $10^3$  veces superiores a los nuestros, a pesar de que en los tres casos se utilizaron metodologías diferentes: Zelen et al. el método de Aebi (1984), Khosrowbeygi et al. el método de Goth (1991) y en nuestro estudio el kit de Cayman® (ref.: 707002). Ninguno de los tres métodos era específico para la determinación de esta enzima en el plasma seminal, pero se trató en todos los casos de adaptar la técnica para tal fin.

Otro indicador del estatus oxidativo presente en los sémenes estudiados lo constituye la determinación del MDA que indica el nivel de peroxidación lipídica que presentan nuestros sujetos. Obtuvimos una media de MDA de 39,88 µg/L, resultado que contrasta con los elevados valores encontrados en la literatura. Tavilani et al. (2008) presentaron unas concentraciones más elevadas pero relativamente cercanas a nuestro valor, 86,4 µg/L para normozoospermicos y 97,2 µg/L para astenozoospermicos, en cambio otros autores como Atig et al. (2012a) y Zelen et al. (2010) obtuvieron concentraciones 50 veces superiores a la nuestra. En ningún caso se utilizó la misma metodología que en el presente estudio sino, procedimientos menos específicos como son la medición de Antioxidantes Totales o TBARs (moléculas que reaccionan con el Tiobarbitúrico) tanto por las interferencias como por la determinación de grupos de moléculas y no el MDA aisladamente, tal y como se realiza a través del método de HPLC.

Los Metales y Elementos Traza tienen una gran capacidad para inducir el estrés oxidativo en las células a través de la desintegración de la membrana lipídica, lo que provocaría que los espermatozoides se vieran directamente afectados. Mínguez-Alarcón et al. (2012) sugieren que no hay ninguna correlación entre las concentraciones de cualquiera de los metales en las siguientes muestras biológicas: sangre total, plasma sanguíneo, y plasma seminal. De las tres, señala al plasma seminal como el posible mejor fluido corporal para evaluar el daño de parámetros seminales humanos. Así, en principio, sería más exacto medir concentraciones de Metales y Elementos Traza en plasma seminal que en otros fluidos para determinar el daño espermático (Mínguez-Alarcón et al., 2012). En cambio, en la bibliografía revisada hemos encontrado un mayor número de estudios que han determinado los niveles de metales en sangre que en plasma seminal para indagar en la relación de la infertilidad masculina con la concentración de metales. A su vez, la mayoría de ellos exponen los resultados de dicha relación, pero no especifican las concentraciones de metales que han obtenido. Y por otra parte, ninguno de ellos ha estudiado simultáneamente la totalidad de los metales que hemos incluido en nuestro estudio. A pesar de esto, cabe destacar el trabajo de Figà-Talamanca et al. (2001), que estudiaron simultáneamente seis de los metales analizados por nosotros, y el de Mínguez-Alarcón et al. (2012) que realizaron una buena revisión bibliográfica de las tres posibles matrices para varios metales. En la siguiente tabla presentamos las medias y medianas de las concentraciones de los metales obtenidas en nuestro estudio y las presentadas en algunos de los artículos de la literatura revisada.

Universidad de Alicante

Tabla 90. Comparativa de nuestros valores de Metales y Elementos Traza en plasma seminal con los publicados en la literatura

<b>Metal</b>	<b>Resultado en nuestro estudio (µg/L)</b>	<b>Valor medio en otros estudios (µg/L)</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>
<b>Co</b>	>0,4 µg/L en el 18% de los sujetos	310	Figà-Talamanca et al., 2001
<b>Cd</b>	>0,4 µg/L en el 10,2% de los sujetos	0,294 0,67 0,8 5 ó 13 hasta 1100	Benoff et al., 2003a Telisman et al., 2000 Mendiola et al., 2011 y Mínguez-Alarcón et al., 2012 Figà-Talamanca et al., 2001 Akinloye et al., 2006
<b>Pb</b>	>0,4 µg/L en el 53,9% de los sujetos	1,7 µg/L ó 3,6 2,66 8,6 29 29,3 243 ó 255 395 423	Saaranen et al., 1987 Farias et al., 2005 Telisman et al., 2000 Mendiola et al., 2011 Mínguez-Alarcón et al., 2012 Figà-Talamanca et al., 2001 Benoff et al., 2003a Benoff et al., 2003b
<b>Hg</b>	>0,5 µg/L en el 11,4% de los varones	11,3 11,8	Bonde, 2010 Minguez-Alarcon et al., 2012
<b>Al</b>	15,84	fértiles: 68 infértiles: 228	Figà-Talamanca et al., 2001
<b>Cu</b>	59,24	34 167,3 337	Figà-Talamanca et al., 2001 Kumar et al., 2005 Aydemir, 2006
<b>Cr</b>	2,27	fértiles: 14,55 infértiles: 34,94	Figà-Talamanca et al., 2001
<b>Fe</b>	86,44	221,8	Aydemir, 2006
<b>Mn</b>	2,62	70	Figà-Talamanca et al., 2001
<b>Ni</b>	2,21	1060	Figà-Talamanca et al., 2001
<b>Se</b>	66,43	71,5 64	Figà-Talamanca et al., 2001 Atig et al., 2012b
<b>Zn</b>	152926,50	960 50800 97600 144000 155910 fértiles: 124000 infértiles: 129000	Telisman et al., 2000 Benoff et al., 2003a Atig et al., 2012a Atig et al., 2012b Kumar et al., 2005 Figà-Talamanca et al., 2001
<b>V</b>	0,37		no hemos encontrado bibliografía

En el caso del Cr sólo hemos encontrado el estudio de Figà-Talamanca et al. (2001) que expusiera los valores obtenidos. En este caso los controles eran sujetos que trabajaban en la industria metalúrgica, éste puede ser el motivo de que haya tanta diferencia entre nuestro resultado y el de ellos. También, cabe destacar que el metal presente en mayor concentración en el plasma seminal entre todos los analizados fue



el Zn, como era de esperar, pues la mayor concentración de Zn en el organismo se alcanza en la próstata.

En general en la literatura hemos observado concentraciones de metales superiores a las nuestras. Esto puede deberse a que en muchos de estos estudios, los metales se han determinado en población expuesta laboralmente a dichos metales (Hovatta et al., 1998; Oldereid et al., 1998; Telisman et al., 2000; Figà-Talamanca et al., 2001; Kumar et al., 2005; Mínguez-Alarcón et al., 2012), lo que justificaría que presenten valores más elevados y que, por tanto, los resultados obtenidos sean difíciles de extrapolar a la población general. También nos da una idea de la variabilidad de unos estudios a otros en las concentraciones obtenidas de los metales, a pesar de utilizar el mismo método en todos ellos, espectrometría de absorción atómica (Hovatta et al., 1998; Oldereid et al., 1998; Telisman et al., 2000; Benoff et al., 2003a; Kumar et al., 2005; Akinloye et al., 2006; Aydemir, 2006; Colagar et al., 2009; Mendiola et al., 2011; Atig et al., 2012b; Mínguez-Alarcón et al., 2012), lo que nos lleva a plantearnos si las diferencias pueden deberse también al tipo de pretratamiento analítico. Nuestras muestras se sometieron a un pre-tratamiento ácido con HNO<sub>3</sub> 0,5%, al igual que la mayoría de los estudios revisados (Benoff et al., 2003a; Mendiola et al., 2011; Mínguez-Alarcón et al., 2012). Sin embargo, encontramos otras variantes en el pretratamiento que podrían afectar al resultado final de las concentraciones. Es el caso del uso de ácido perclórico y evaporación hasta residuo seco realizado por Mínguez-Alarcón et al. (2012) y Mendiola et al. (2011), o las diluciones seriadas con agua destilada llevadas a cabo por Colagar et al. (2009). En otros no se especifica el tipo de pre-tratamiento (Oldereid et al., 1998; Telisman et al., 2000; Kumar et al., 2005; Aydemir, 2006; Atig et al., 2012b). Por todo esto, para poder establecer unos valores de referencia en el plasma seminal de la población general, consideramos importante estandarizar el protocolo de análisis de los Metales y Elementos Traza en plasma seminal, y realizar estudios con un tamaño muestral mayor al que presentan los estudios revisados, incluido el nuestro, considerando varones sanos no expuestos a dichos metales.

Para tratar de dilucidar la relación de cada variable con la infertilidad masculina, una vez analizadas la distribución y las medidas de tendencia central de éstas, decidimos estudiar las relaciones existentes entre los diferentes agentes implicados en el estrés oxidativo y las variables del semen así como las respuestas del Cuestionario, considerando por un lado todos los sujetos del estudio en general, y por otro dividiéndolos en grupos. Para el segundo caso, se realizaron tres modelos de

---

agrupación de sujetos en base a los tres puntos clave de nuestro estudio y se compararon los resultados de las variables estudiadas.

Para el primer modelo nos basamos en los resultados de los parámetros más significativos del seminograma: la concentración, la morfología y la movilidad espermática. De esta manera, el grupo de referencia quedaba constituido por el 27,6% de los sujetos, cuyas características seminales presentaban simultáneamente pH, concentración de espermatozoides, motilidad progresiva e ITZ dentro de los valores de referencia de la OMS 1999; y por otra parte el grupo de estudio constituido por el 71,8% de los sujetos, los cuales no cumplían simultáneamente los requisitos anteriores.

Para el segundo modelo, consideramos de nuevo 2 grupos de sujetos en función únicamente de si el REM se inscribía dentro de los rangos de valores de trabajo de nuestro hospital ( $REM \geq 10 \times 10^6$ ) o no, es decir, en función de la capacitación espermática. El 49% de los sujetos formaron parte del grupo de varones que presentaban sémenes que capacitaban bien, y el 51% del grupo que no capacitaban bien. En este caso no pudimos comparar nuestros resultados con otros investigadores al no existir publicaciones que relacionen el REM con el resto de parámetros de este estudio.

Para el tercer modelo, los 2 grupos de varones se establecieron en función de los resultados del MDA, principal indicador de la presencia de estrés oxidativo, considerando el punto de corte según nuestros propios resultados (40  $\mu\text{g/L}$ ), puesto que no existe en la literatura ningún estudio en esta línea. Así, los sujetos se clasificaron entre el grupo con menor lipoperoxidación en el plasma seminal ( $MDA < 40 \mu\text{g/L}$ ), del que formaron parte el 54% de los sujetos, y el de mayor lipoperoxidación ( $MDA \geq 40 \mu\text{g/L}$ ) con el 46% de los varones.

Los Metales y Elementos Traza pueden comprometer la reproducción masculina, como se ha demostrado en estudios epidemiológicos y en animales (Mínguez-Alarcón et al., 2012). Se ha descrito un impacto negativo sobre la motilidad, la morfología y la concentración espermática para algunos, una influencia positiva para otros, o incluso una influencia ambigua sobre los espermatozoides en otros casos. A continuación exponemos nuestras aportaciones en función de los resultados obtenidos en el presente estudio.

Hovatta et al. (1998) y Marzec-Wróblewska et al. (2012) relacionaron una elevada concentración de Al en plasma seminal con un descenso de la motilidad y de la morfología normal espermática. En nuestro estudio, no hemos obtenido una asociación de este metal con la motilidad, pero sí una correlación positiva con las formas anormales ( $p=0,042$ ), y una negativa con la concentración espermática ( $p=0,014$ ). Esto confirmaría el impacto negativo de este metal sobre la calidad seminal según apuntaban algunos autores como Marzec-Wróblewska et al. (2012). Por otra parte el único antioxidante con el que encontramos una fuerte correlación positiva es la catalasa ( $p<0,001$ ), resultado que no podemos comparar por no haber hallado bibliografía que lo relacione. También se ha encontrado una correlación positiva con el consumo de naranja y de tomate. Como ya se ha comentado, el Al está presente en pequeñas cantidades en todos los alimentos debido a su propio contenido natural, por el uso de aditivos o por la utilización de materiales de Al en recipientes y líneas de envasado (Cocho et al., 1998), por lo que presentan un incremento adicional de dicho metal. A su vez, el agua de consumo es una de las mayores fuentes de exposición a este metal, por lo que podría relacionarse con el consumo del tomate con la piel una vez lavado.

Los datos toxicológicos conocidos sobre el Cd son mínimos en diversos aspectos importantes, incluyendo su efecto sobre la reproducción. Además, los escasos estudios disponibles obtienen conclusiones contradictorias (Akinloye et al., 2006; Marzec-Wróblewska et al. 2012; Mínguez-Alarcón et al., 2012). Algunos autores describen un aumento de la concentración de Cd en varones infértiles con respecto a los fértiles (Akinloye et al., 2006), en cambio otros han defendido la falta de diferencias significativas entre ellos (Keck et al., 1995). A su vez, en la bibliografía revisada encontramos, por un lado, estudios que exponen que elevadas concentraciones de Cd en el plasma seminal puede afectar a la calidad seminal, disminuyendo la motilidad y la concentración de espermatozoides (Alabi et al., 1985; Xu et al., 2003; Akinloye et al., 2006; Queiroz et al., 2006; Mínguez-Alarcón et al., 2012); y por otro, autores que no encuentran una relación con ningún parámetro de la calidad seminal (Mínguez-Alarcón et al., 2012), lo que iría en la línea de nuestros resultados. Por otra parte, parece ser que la fuerte interacción del Cd con las uniones de los metales de la SOD (Cu, Zn y Mn), o bien, el cambio de conformación de la proteína al interaccionar este metal con la enzima (Acharya et al., 2008), son unos de los posibles motivos de la disminución en la actividad de la SOD. Sin embargo, en nuestra serie hemos obtenido una fuerte correlación positiva ( $p<0,001$ ) entre los niveles de Cd y los de SOD en plasma seminal. Por último también encontramos una asociación positiva de este

metal con la vitamina B<sub>12</sub> ( $p=0,005$ ). Al no observar ninguna asociación con los parámetros seminales pero sí con los antioxidantes SOD y vitamina B<sub>12</sub>, consideramos que este metal podría contribuir a modular la actividad de enzimas y vitaminas antioxidantes en semen.

Se conoce que el Co puede interferir en los procesos de reparación del ADN causándole un daño directo, pero es un metal escasamente estudiado en el contexto de la infertilidad masculina. Los resultados de nuestro estudio revelan asociaciones significativas de este metal con el REM, la GPx y el MDA. Ante la presencia de una concentración de Co entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ , se encontraban los valores más elevados de REM ( $p=0,030$ ) y de GPx ( $p<0,001$ ), en cambio cuando el Co era superior a 0,4  $\mu\text{g/L}$  se observaba la media más elevada de MDA ( $p=0,002$ ). Estos datos se confirmaron al realizar los modelos de agrupación en función de la capacitación espermática y la lipoperoxidación seminal.

En el modelo de agrupación de sujetos en función del REM, cuando la concentración de Co era menor de 0,2  $\mu\text{g/L}$  la mayoría de los varones se encontraban en el grupo cuyos sémenes no capacitaban bien, en cambio a concentraciones de 0,2-0,4  $\mu\text{g/L}$  la mayoría de los sujetos pertenecían al grupo con sémenes que presentaban buena capacitación ( $p=0,008$ ) y no existían diferencias entre ambos grupos cuando la concentración de Co era superior a 0,4  $\mu\text{g/L}$ . En la regresión logística binaria realizada posteriormente, observamos que el Co aumentaba la probabilidad de que el varón perteneciera al grupo que capacitaba mejor cuando el sujeto presentaba una concentración de Co de 0,2 a 0,4  $\mu\text{g/L}$  (ORP=0,110) o mayor de 0,4  $\mu\text{g/L}$  (ORP=0,130) con respecto al grupo de referencia, que era el que presentaba unos niveles de Co menor de 0,2  $\mu\text{g/L}$  (Tabla 67).

En el modelo de agrupación de sujetos en base al resultado de MDA, el grupo con menor lipoperoxidación estaba constituido mayoritariamente por individuos con una concentración de Co menor de 0,2  $\mu\text{g/L}$ , mientras que el grupo de mayor lipoperoxidación presentaba un mayor porcentaje de varones con 0,2  $\mu\text{g/L}$  o más de Co y, sobre todo, la concentración de MDA era más elevada cuando los niveles de Co eran mayores de 0,4  $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,001$ ). Esto se confirma en el análisis de regresión logística, donde comprobamos que el Co aumentaba la probabilidad de pertenecer al grupo de mayor lipoperoxidación cuando su concentración era igual o superior a 0,2  $\mu\text{g/L}$  (ORP= 3,408 y 4,776).

Basándonos en estos datos podemos afirmar que en nuestro estudio el Co se comporta de distinta manera en función de la concentración en la que se encuentre en el plasma seminal. Cuando está presente a una concentración menor de 0,2 µg/L encontramos menor lipoperoxidación, pero los sémenes no capacitarán bien. A una concentración entre 0,2 y 0,4 µg/L se comporta como un antioxidante, hallamos mayor concentración de GPx, mayor REM, por tanto capacitará bien, y una mayor concentración de MDA que en el grupo anterior. Por último, con concentraciones superiores a 0,4 µg/L, este metal se comporta claramente como oxidante, se relaciona con una concentración de MDA superior a las anteriores y, como consecuencia, con la mayor lipoperoxidación y, a su vez, con una mala capacitación. No hemos encontrado bibliografía con la que poder contrastar nuestros resultados, pero nuestros datos nos invitan a inclinarnos por un comportamiento ambiguo del Co en base a la concentración a la que esté presente, considerando la concentración entre 0,2 y 0,4 µg/L la deseable en plasma seminal.

Según la literatura el Cu también se caracteriza por un comportamiento ambiguo, algunos autores relacionan elevados niveles de Cu en sangre con una disminución de la calidad seminal (Meeker et al., 2008, Marzec-Wróblewska et al., 2012), pero otros lo asocian con un aumento de la concentración y motilidad espermáticas. En nuestra serie, como explicaremos más adelante, la concentración seminal de Cu correlacionaba positivamente con la SOD ( $r=0,544$ ;  $p<0,001$ ), la vitamina B<sub>12</sub> ( $r=0,465$ ;  $p<0,001$ ) y el fólico ( $r=0,201$ ;  $p=0,013$ ), y se encontraba más elevada en los varones no fumadores que en los fumadores ( $p=0,029$ ). Estos resultados nos invitan a afirmar que, a pesar de no haber encontrado asociaciones con los parámetros seminales, el Cu presenta un comportamiento antioxidante.

A pesar de que en la literatura se relaciona un aumento del Cr con un descenso de los parámetros espermáticos (Kumar et al., 2005; Pereira et al., 2005), nosotros no lo hemos observado. Además, algunos autores apuntan que las personas expuestas a Cr disminuyen la actividad específica testicular de la SOD, de la catalasa, y las concentraciones de las vitaminas A, C y E (Aruldas et al., 2005), lo que contrasta con las correlaciones positivas obtenidas en nuestro estudio para la SOD, vitamina C y catalasa, con este metal ( $p=0,039$ ,  $p=0,009$  y  $p=0,002$  respectivamente). Sin embargo, también encontramos una correlación positiva entre la concentración de Cr en plasma seminal y la presencia de industrias cerca del hogar de nuestros sujetos ( $p=0,029$ ). Se sabe que la principal vía de exposición es la inhalatoria, y que las industrias que trabajan con Cr liberan este metal al medio ambiente (Aruldas et al., 2005; Kumar et

al., 2005). Aunque también estas industrias pueden liberar el metal en el agua y, por tanto, los humanos ingerirlo a través del consumo de agua o de los productos que han sido regados con ella (Aruldhas et al., 2005). Asimismo, los compuestos de Cr forman parte de multitud de productos manufacturados tales como barnices, pinturas, metalurgia... (Cocho et al., 1998). Por otra parte es conocido que uno de los múltiples factores que desencadenan un aumento de la eliminación de Cr por la orina es una situación de estrés (Cocho et al., 1988), esto podría explicar también la asociación positiva encontrada en nuestro estudio entre el Cr y la confesión de encontrarse en una situación de estrés por parte de nuestros sujetos ( $p=0,010$ ), ya que también podría ser eliminado por el eyaculado, pero deberían realizarse estudios para confirmarlo. En conclusión, nuestros resultados nos llevan a decantarnos por un comportamiento ambiguo para este metal y a defender la necesidad de más investigaciones sobre su presencia en plasma seminal.

Respecto al Fe, elevadas concentraciones de este metal correlacionan con la morfología espermática, según algunas publicaciones positivamente (Aydemir, 2006), pero según otras negativamente (Marzec-Wróblewska et al., 2012). A pesar de que el Fe interviene en la reacción de Haber-Weiss produciendo radicales libres (Cocho et al., 1998) podemos afirmar, según nuestros resultados, que el Fe es un metal protector de la oxidación, ya que correlaciona positivamente con la concentración espermática ( $p=0,002$ ), con la vitamina B<sub>12</sub> ( $r=0,400$ ;  $p<0,001$ ), con el folato ( $p=0,003$ ), y con las enzimas SOD ( $r=0,446$ ;  $p<0,001$ ) y GPx ( $p=0,010$ ). Esto último puede deberse a que el Fe también está presente en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular: las catalasas, peroxidadasas y oxigenasas.

Tampoco existe un consenso en la relación entre la concentración de Mn en el plasma seminal y la concentración espermática (Marzec-Wróblewska et al., 2012), sin embargo nosotros hemos obtenido una correlación positiva entre ambos ( $p=0,046$ ), a diferencia de Meeker et al. (2008) que encontraron una asociación negativa midiendo este metal en sangre. Por otra parte, el Mn se encuentra presente en distintas enzimas, entre las que destacan la superóxido dismutasa de Mn (Mn-SOD) (Huang et al., 2001; Celino et al., 2011) y la Mn-catalasa. En nuestro estudio hemos encontrado una intensa correlación positiva con la SOD ( $r=0,582$ ;  $p<0,001$ ), pero no con la catalasa. A su vez existía otra fuerte correlación positiva con la vitamina B<sub>12</sub> y el fólculo ( $p<0,001$  y  $p=0,036$  respectivamente). En el modelo de agrupación de sujetos en función de los valores de la OMS 1999 para el seminograma, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el Mn entre ambos grupos ( $p=0,022$ ),

donde su concentración era significativamente superior en el grupo de referencia. Además tras realizar la regresión logística binaria, observamos que éste era el único metal que reducía las posibilidades de pertenecer al grupo de estudio, siendo significativa con un ORP de 0,763 (IC<sub>95%</sub>=0,629-0,926) (Tabla 60). Basándonos en todo lo expuesto, consideramos al Mn como un metal antioxidante, y podemos afirmar que este metal es un buen indicador de que el sujeto cumplirá los criterios de la OMS 1999, y por tanto podrá ser clasificado como un varón fértil. Estos datos contradicen lo expuesto por Marzec-Wróblewska et al. (2012) en su revisión bibliográfica en la que continúan defendiendo un carácter ambiguo del Mn respecto a la calidad seminal tras su revisión bibliográfica.

Aunque se han descrito alteraciones en la calidad espermática con elevadas concentraciones de Hg en sangre, no ha sido así para bajas concentraciones de este metal en plasma seminal (Alabi et al., 1985; Minguez-Alarcon et al., 2012), lo que explicaría la falta de asociaciones significativas en nuestro estudio, puesto que el 88,6% de los sujetos presentaron menos de 0,5 µg/L de Hg en plasma seminal. Tampoco hemos encontrado asociaciones con el resto de parámetros del estudio. Sin embargo, a pesar de que las vías de entrada más comunes para el Hg son la pulmonar y la transdérmica para los compuestos inorgánicos, y la vía oral para los compuestos orgánicos (López et al., 2008), nosotros solamente hemos encontrado una correlación positiva con la ingesta de bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses (p=0,023). Esto podría explicarse por los restos de metales pesados que se encuentran en las bebidas alcohólicas, entre ellos el Hg (Frías et al., 2003). Por las bajas concentraciones presentadas en el plasma seminal de nuestros sujetos no hemos obtenido resultados significativos con los que poder asegurar el tipo de influencia que genera el Hg en el estrés oxidativo, pero por su conocida toxicidad en la salud en general, nos decantamos por un efecto oxidante.

En la bibliografía revisada no hemos encontrado estudios en los que se haya incluido la determinación de Ni en plasma seminal de humanos y a su vez que se haya relacionado con la infertilidad masculina. Sólo existen investigaciones en animales y experimentos *in vitro* (Massányi et al., 2004; Zemanová et al., 2007). Según nuestro estudio, el Ni se asocia positivamente con la GPx (p<0,001) y la práctica de ejercicio físico (p=0,041), pero también con el ITZ (p=0,001) y con las formas anormales de los espermatozoides (p=0,018), y por otra parte con el consumo de drogas sobre todo si las consumían diariamente (p=0,001). Por ello podemos afirmar que en este metal destaca un comportamiento oxidante. En el modelo de agrupación de sujetos en

función de la OMS, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para el Ni ( $p=0,005$ ), siendo su concentración significativamente más elevada en el grupo de estudio. Todos estos resultados refuerzan la conjetura de que el Ni estará presente en mayor concentración en pacientes teratozoospermicos. Estos datos contradicen lo expuesto por Marzec-Wróblewska et al. (2012) en su revisión bibliográfica en la que continúa defendiendo un carácter ambiguo del Ni sobre la calidad seminal.

En lo que respecta al Pb, los datos aportados en la literatura son contradictorios (Marzec-Wróblewska et al., 2012; Mínguez-Alarcón et al., 2012). Algunos autores relacionan un descenso de la calidad seminal con las concentraciones de Pb, unos cuando son moderadas y otros cuando son elevadas (Benoff et al., 2003a), pero en otras ocasiones no encuentran ningún tipo de relación (Mínguez-Alarcón et al., 2012). Este último caso coincide con nuestros resultados, lo que podría deberse a que casi la mitad de nuestros sujetos presentaba menos de  $0,4 \mu\text{g/L}$  de Pb en el plasma seminal. A pesar de esto, encontramos una relación entre la concentración de Pb en plasma seminal y el lugar de residencia ( $p=0,049$ ). Observamos que los niveles de este metal resultaban superiores en el caso de residir en una gran ciudad. Esto puede deberse a que la vía respiratoria es una de las principales vías de penetración de Pb en el organismo (vapores, humos y partículas de polvo) (Telisman et al., 2000), por lo que los residentes en las ciudades pueden estar más expuestos a este metal.

Parece establecido que una alta exposición al Pb perjudica a los espermatozoides por el aumento de la peroxidación lipídica (Marzec-Wróblewska et al., 2012). En cambio, hay todavía controversia con pequeñas exposiciones al Pb y el efecto sobre la calidad seminal (Mínguez-Alarcón et al., 2012), situación en la que se encontraban los varones del presente estudio. En el modelo de agrupación de sujetos en función del MDA, los sujetos con una concentración de Pb igual o superior a  $0,2 \mu\text{g/L}$ , se encontraban en su mayoría en el grupo con menor lipoperoxidación, sobre todo cuando era mayor de  $0,4 \mu\text{g/L}$  ( $p=0,029$ ). Además en el análisis de regresión logística, comprobamos que el Pb disminuía la probabilidad de pertenecer al grupo con elevada lipoperoxidación cuando su concentración era superior a  $0,4 \mu\text{g/L}$  (ORP= 0,280). Estos resultados no aportan ningún dato novedoso, sino que nos invitan a inclinarnos por un comportamiento ambiguo del Pb a bajas concentraciones en plasma seminal.

Según la bibliografía revisada el Se es uno de los antioxidantes del organismo por formar parte de la GPx y por aumentar la absorción intestinal de otros antioxidantes



como las vitaminas A, C y E (Cocho et al., 1998; Agarwal et al., 2011; Atig et al., 2012b; Marzec-Wróblewska et al., 2012). Nuestros datos confirman que el Se correlaciona con la vitamina C ( $p=0,008$ ), pero también con la SOD ( $p<0,001$ ) y la vitamina B<sub>12</sub> ( $r=0,446$ ;  $p<0,001$ ), en cambio, no encontramos correlación con la GPx ( $p=0,260$ ). También encontramos autores como Oldereid et al. (1998), Agarwal et al. (2011) y Marzec-Wróblewska et al. (2012) que exponen que los resultados de la relación entre la calidad seminal y la concentración de Se en plasma seminal son inconsistentes. Sin embargo, nosotros coincidimos con Atig et al. (2012b) en que un déficit de Se influye en la calidad seminal puesto que se produce un aumento en la incidencia de anormalidades morfológicas ( $p=0,039$ ). El Se es importante para las funciones reproductivas al intervenir en el metabolismo de la testosterona y ser un constituyente de la cápsula de las selenoproteínas del espermatozoide, que participan en el mantenimiento de la integridad de la estructura de éste (Moslemi et al., 2011). Todo esto nos lleva a afirmar que el Se tiene una acción antioxidante en el plasma seminal.

La principal vía de entrada del V al organismo es la inhalatoria. La concentración de V en el aire ambiental varía considerablemente según la zona donde nos encontremos, sobre todo cerca de industrias metalúrgicas (Cocho et al., 1998). Este debe ser el motivo por el que en nuestro estudio encontramos mayores concentraciones de este metal en el plasma seminal de aquellos sujetos que declararon tener industrias cerca de su hogar ( $p=0,012$ ). El V no ha sido estudiado en profundidad en el plasma seminal, ni tampoco está clara su acción como oxidante o antioxidante. Se sabe que interviene como coenzima en numerosas enzimas del metabolismo y que regula las reacciones de fosforilación y desfosforilación, pero también se han sugerido efectos tóxicos gonadales y teratogénicos de este metal (Cocho et al., 1998). En esta línea, nuestros resultados también son un poco ambiguos. Por un lado encontramos correlaciones positivas con el ITZ ( $p=0,032$ ), con la presencia de industrias cerca del hogar que trabajan con productos tóxicos y con el consumo de drogas a diario ( $p=0,043$ ) y, en cambio, una correlación negativa con las vitaminas B<sub>12</sub> ( $p=0,021$ ) y C ( $p=0,026$ ), lo que nos indica una acción oxidativa. Pero por otro lado también presentó una fuerte correlación positiva con la catalasa ( $p<0,001$ ) y una negativa con el MDA ( $p=0,013$ ), lo que indicaría una acción antioxidante. En el modelo de agrupación de sujetos en función del MDA se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el V ( $p=0,001$ ), aunque las medianas eran muy similares entre sí, el grupo de menor lipoperoxidación era el que presentaba una mayor concentración de este metal. Esto refuerza el carácter antioxidante, por lo que esta nueva aportación invita a

decantarnos, al igual que la mayoría de los autores, por un carácter ambiguo en cuanto a su implicación en el estatus oxidativo.

Hasta ahora los estudios realizados sobre el Zn han dado resultados dispares. Mientras en numerosas investigaciones no se ha encontrado asociación significativa entre el Zn en el plasma seminal y la calidad espermática, en un número reducido de estudios sí se han hallado evidencias que relacionan una elevada concentración de Zn con una mejora en los parámetros seminales, incluyendo la concentración de espermatozoides, la motilidad (Atig et al., 2012a; Marzec-Wróblewska et al., 2012) y la morfología normal (Colagar et al., 2009). Tampoco faltan, finalmente, investigaciones que relacionan la alta concentración de Zn con una baja motilidad espermática (Danscher et al., 1978). En nuestro estudio hemos encontrado una asociación positiva entre la concentración de Zn en plasma seminal y la motilidad total espermática ( $p=0,001$ ). Pensamos que este hallazgo puede justificarse porque el Zn se localiza en las proteínas de las fibras externas densas del flagelo y parece ser que las estabiliza, siendo un paso esencial para la generación de la motilidad espermática, especialmente para la motilidad progresiva (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

También encontramos una fuerte correlación positiva entre el Zn y la actividad de la SOD ( $r=0,614$ ,  $p<0,001$ ), al igual que en el caso del Cu. Esto puede deberse a que, como explicaremos más adelante, el Zn junto con el Cu, previenen los efectos deletéreos de las EROs sobre los espermatozoides como cofactores de la Cu-Zn SOD (Atig et al., 2012b; Marzec-Wróblewska et al., 2012). Por otra parte, hemos obtenido una correlación positiva entre el Zn y el consumo de brócoli, espinacas y/o hortalizas de hoja verde al menos una vez por semana ( $p=0,021$ ), lo que era de esperar puesto que estos alimentos son ricos en Zn. Por último, encontramos una fuerte asociación positiva del Zn con la vitamina B<sub>12</sub> ( $r=0,451$ ,  $p<0,001$ ), que podría ser debido a que ambos están presentes en los mismos alimentos (carne, pescado y ostras), y con el folato ( $p=0,003$ ). Pensamos que esto último puede deberse a que la enzima gamma glutamil hidrolasa (GGH) dependiente de Zn, convierte de manera muy eficiente el folato de la dieta presente como poliglutamatos en monoglutamatos, que es la única forma absorbible del folato. Con todo lo anteriormente expuesto, queda ampliamente justificado que el Zn debe considerarse como un metal antioxidante en el plasma seminal.

Con el objetivo de centrarnos en la influencia directa de los Metales y Elementos Traza sobre los parámetros del seminograma, recopilamos todos los datos anteriores, y

observamos que la concentración de espermatozoides en las muestras seminales se relaciona positivamente con los niveles de Fe y Mn, pero negativamente con los del Al. La motilidad sólo se asocia positivamente con las concentraciones de Zn en plasma seminal. La morfología espermática correlaciona a través del porcentaje de anormales con el Al y el Ni (positivamente), y con el Se (negativamente), y a través del ITZ con el Ni y V (positivamente). Finalmente, la capacitación seminal (REM) se asocia con el Co positivamente cuando la concentración de éste se encuentra entre 0,2 y 0,4 µg/L.

En resumen, de los Metales y Elementos Traza estudiados, en función de los datos obtenidos, consideramos que se comportan como agentes oxidantes el Al, el Hg, el Ni y el Co (este último en concentraciones iguales o superiores a 0,4 µg/L); como antioxidantes el Co (en concentraciones entre 0,2 y 0,4 µg/L), el Cu, el Fe, el Mn, el Se y el Zn; como modulador de la actividad antioxidante el Cd; y con carácter ambiguo, el Cr, el Pb y el V. Todos estos datos confirman que los Metales y Elementos Traza son unas variables muy importantes a tener en cuenta en el estudio de la infertilidad masculina, por su elevado impacto sobre los parámetros seminales, por la frecuente exposición a la que estamos sometidos y por la relativa facilidad para evitar dicha exposición. De esta manera debería considerarse su estudio en los varones diagnosticados de infertilidad de causa desconocida.

La actividad de los antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) también está relacionada con los parámetros del semen humano de forma directa o indirecta, a través de su relación con los Metales y Elementos Traza. Por esto, su control puede ser un instrumento útil para ayudar a determinar el potencial de fertilización del semen y para mejorar el diagnóstico de la infertilidad masculina. El tipo de relación encontrada para cada antioxidante estudiado con los parámetros del seminograma se expone a continuación.

En la literatura existen estudios de estrés oxidativo en los que se incluyen la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> y el folato, y su repercusión en los parámetros seminales. Nuestros resultados sugieren que la vitamina B<sub>12</sub> protege al espermatozoide del daño oxidativo, puesto que obtuvimos una correlación positiva con la concentración espermática ( $p < 0,001$ ) en la línea de Boxmeer et al. (2007), Vujkovic et al. (2009) y Crha et al. (2010), y con la motilidad ( $p = 0,006$ ), resultado este último no encontrado en ninguno de los estudios citados. Por otra parte, en el modelo de agrupación de sujetos en función de los valores de la OMS, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la vitamina B<sub>12</sub> entre ambos grupos ( $p = 0,029$ ). La

concentración seminal resultó significativamente mayor en el grupo de referencia. Por esto, probablemente la vitamina B<sub>12</sub> se encontrará en mayor concentración en varones con normozoospermia. Además, encontramos una fuerte correlación positiva con la SOD como era de esperar ( $p < 0,001$ ).

Como ya hemos enunciado previamente esta vitamina también correlacionaba positivamente con el Fe, el Se, el Cd, y con los cofactores de la SOD (Cu, Mn y Zn), y presentaba una correlación negativa con el V. No encontramos en la literatura ningún artículo en el que se relacione las concentraciones de Metales y Elementos Traza con los niveles de la vitamina B<sub>12</sub> en plasma seminal.

Con todo esto podemos afirmar que una reducción de la vitamina B<sub>12</sub> podría conllevar a una reducción de la calidad seminal y, por tanto, de la capacidad fecundante. Por ello, nuestras asociaciones refuerzan los efectos beneficiosos de la vitamina B<sub>12</sub> en la defensa del estrés oxidativo y en la salvaguarda de la calidad espermática. Coincidimos con Boxmeer et al. (2007) en que, como la infertilidad de factor masculino debida al déficit de cobalamina es susceptible de una suplementación preventiva y/o curativa, los estudios deberían centrarse en la determinación de los puntos de corte de la concentración de cobalamina en plasma seminal, en la eficacia y seguridad de la suplementación sobre los parámetros seminales y la fertilidad como medidas de buenos resultados.

A pesar de que Wallock et al. (2001) apuntaban una correlación positiva del folato con la concentración espermática, nosotros no la hemos observado. En cambio, sí que hemos obtenido asociaciones positivas de esta vitamina con el porcentaje de formas anormales ( $p = 0,020$ ), con metales considerados como antioxidantes (Fe, y los cofactores de la SOD: Cu, Mn y Zn), y con la SOD ( $p < 0,001$ ). Estos resultados contradictorios reafirman la postura de Ebisch et al. (2007) que defendían que no estaba claro el impacto del folato dietético y el ácido fólico sintético sobre la fertilidad.

En cuanto al hábito alimenticio, según nuestros datos existe una correlación positiva entre el folato y el consumo al menos una vez por semana de kiwi por un lado ( $p = 0,008$ ), y de nueces y avellanas por otro ( $p = 0,031$ ). Resultados que eran de esperar considerando que estos tres alimentos son ricos en ácido fólico. Por último, en la literatura revisada no hemos encontrado estudios que relacionen la vitamina B<sub>12</sub> y el folato con los hábitos de vida, independientemente de la alimentación, por lo que no

nos ha resultado posible comparar nuestros resultados que comentaremos más adelante.

La tercera vitamina estudiada, la vitamina C, es el principal antioxidante presente en los testículos, de ella también se conoce que bloquea la cadena de oxidación y que está presente en el fluido extracelular. Esta vitamina neutraliza los radicales hidroxilos, superóxidos y los peróxidos de hidrógeno, y previene la aglutinación espermática (Agarwal et al., 2004; Agarwal et al., 2005b; Angulo et al., 2011). Se han relacionado los niveles de vitamina C en el plasma seminal con un aumento de la morfología normal (Agarwal et al., 2010) y con la motilidad espermática, incrementándola a determinadas concentraciones, pero disminuyéndola si las concentraciones eran muy elevadas (Agarwal, 2005). En cambio, Agarwal (2010) indica en su revisión que otros autores observaron un efecto negativo sobre la calidad seminal, pero en nuestro caso no hemos encontrado ninguna relación, en la línea de otros autores como Shiva et al. (2011).

Como ya se ha comentado, bajo ciertas circunstancias el ácido ascórbico puede mostrar un efecto pro-oxidante e incluso mutagénico. Los productos generados por las reacciones que tienen lugar, incluyen radicales de lípidos que propagan la peroxidación de grasas y los radicales hidroxilos. Quizás ésta sea una posible explicación a la fuerte asociación positiva que hemos encontrado entre la vitamina C y el MDA ( $p < 0,001$ ). Además, en el modelo de agrupación de sujetos en función del MDA se observan diferencias para la vitamina C entre ambos grupos ( $p < 0,001$ ), con una media superior en el grupo de sujetos con mayor lipoperoxidación. Asimismo, tras realizar la regresión logística binaria, la vitamina C fue el único agente antioxidante que aumentaba la probabilidad de pertenecer al grupo de mayor lipoperoxidación (ORP=1,022). Por otro lado, también encontramos una fuerte correlación con la presencia de industrias cerca del lugar de residencia ( $p = 0,002$ ), en donde la concentración de vitamina C era más elevada en el caso de que se localizasen próximas. Otra posible explicación a estas asociaciones podría ser que ante la presencia de una elevada peroxidación el sujeto presente mayor concentración de esta vitamina en su plasma seminal como protector por su capacidad detoxificante. En concreto, cuando el sujeto se encuentre cerca de una industria que posiblemente desprenda metales, presentaría mayor concentración de esta vitamina en su plasma seminal gracias a su capacidad detoxificante de metales pesados que favorece su eliminación (Deulofeu et al., 2005; Makker et al., 2009).

La catalasa es la enzima antioxidante del plasma seminal que menos bibliografía presenta. No existen estudios que correlacionen esta enzima con otros antioxidantes no enzimáticos o con Metales y Elementos Traza. Sin embargo hemos encontrado estudios que relacionan bajas concentraciones de catalasa con un bajo porcentaje de motilidad progresiva (Shamsi et al., 2010), otros con un descenso en la concentración de espermatozoides (Zelen et al., 2010), o incluso con elevados niveles de MDA en normozoospermicos pero no en astenozoospermicos (Tavilani et al., 2008). En cambio, en la línea de Shiva et al. (2011), nosotros no hemos encontrado correlaciones significativas entre la concentración seminal de catalasa y los parámetros espermáticos. Tampoco con el Fe, considerado como elemento catalítico esencial de la enzima. Sin embargo, hemos observado una asociación negativa con la vitamina C ( $p=0,049$ ) y una positiva con algunos metales (Al, Cr y V). Por todo ello son necesarios más estudios para establecer definitivamente el comportamiento de esta enzima.

Atig et al. (2012a) presentaron asociaciones positivas de la GPx con la motilidad y la concentración espermáticas pero en nuestro estudio, al igual que otros autores como Hsieh et al. (2006), no encontramos ninguna asociación entre la GPx y la calidad seminal. La concentración de GPx es superior en los espermatozoides que en el plasma seminal. En concreto, Gallardo (2007) cuantifica esta diferencia en un aumento de casi 13 veces. En el presente estudio sólo hemos determinado la concentración de GPx en plasma seminal, quizás por este motivo no hayamos encontrado importantes correlaciones significativas de la calidad seminal con esta enzima.

Sin embargo, en el modelo de agrupación de sujetos en función del REM, se observó una diferencia significativa en cuanto a la presencia de GPx entre ambos grupos ( $p=0,007$ ), siendo la mediana superior en los varones del grupo que capacitaba mejor. Por otro lado, encontramos una fuerte asociación positiva de la GPx con el MDA ( $p=0,002$ ), resultado totalmente contrario al de Atig et al. (2012a), puesto que encontraron una fuerte asociación entre el MDA y la SOD, pero no con la GPx. Además, en el modelo de agrupación de sujetos en función del MDA, encontramos diferencias entre ambos grupos para la GPx ( $p=0,007$ ), con valores medios superiores en el grupo de sujetos con mayor lipoperoxidación.

Cabe recordar también las fuertes asociaciones positivas obtenidas de la GPx con el Ni, el Fe, y el Co (donde se encontraban las mayores concentraciones de GPx cuando las de Co oscilaban entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ ). Sin embargo no fue el caso del Se, elemento

catalítico esencial de uno de los tipos de GPx. No existen estudios en la literatura que correlacionen esta enzima con metales que nos permita comparar nuestros resultados.

Por todo esto la GPx, en nuestra serie de sujetos, no evidencia un papel claramente antioxidante, y por tanto no parece que pueda considerarse un instrumento útil en la determinación del potencial fertilizante seminal. A pesar de esto, la concentración de GPx muestra estar muy relacionada con la calidad de la capacitación espermática.

La SOD es considerada como la primera línea de defensa contra la toxicidad oxidativa y la reguladora central de los niveles de EROs, catalizando la dismutación de los radicales superóxido a  $H_2O_2$  y a  $O_2$ . Existen estudios como los de Murawski et al. (2007), Shamsi et al. (2010), Shiva et al. (2011), Atig et al. (2012a), y Marzec-Wróblewska et al. (2012), que relacionan la actividad de la SOD con la calidad seminal, aunque en cada uno de ellos se encuentran asociaciones con distintos parámetros seminales de distinto signo (motilidad, morfología...). Nosotros, sin embargo, no encontramos una asociación significativa, al igual que Hsieh et al. (2002) y Zini et al. (2011). Tampoco hemos encontrado asociación alguna con el MDA, a diferencia de Tavilani et al. (2008). Por contra, en el modelo de agrupación de sujetos en función de la OMS, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para la SOD ( $p=0,014$ ). La concentración seminal de SOD resultó significativamente mayor en el grupo de referencia. A su vez, tras realizar la regresión logística binaria en este modelo (Tabla 62), observamos que la SOD reducía la probabilidad de pertenecer al grupo de estudio (ORP=0,991). Por todo esto, podemos afirmar que la SOD es un buen indicador de que el varón cumplirá los criterios de referencia de la OMS 1999, y de que se encontrará en mayores concentraciones en varones con normozoospermia. Estos resultados irían en la línea de Shiva et al. (2011) y Atig et al. (2012a) que defendían una asociación positiva de la SOD con la concentración y la motilidad espermáticas y, por tanto, una mayor concentración de estos antioxidantes en los varones normozoospermicos.

En cuanto a la relación de esta enzima con los hábitos de vida, comenzamos con la alimentación. La correlación positiva ( $p=0,019$ ) obtenida entre la SOD y el consumo de brócoli, espinacas y/o hortalizas de hoja verde, al menos una vez por semana, puede deberse al elevado contenido en Zn de estos alimentos, y por tanto del cofactor de esta enzima.

La SOD cataliza la transformación de los radicales superóxido a peróxido, lo que es crítico para la prevención del daño de EROs tóxicas generadas por el consumo de alcohol. Existe controversia en lo que respecta a los efectos de la exposición crónica al alcohol sobre el contenido celular o la actividad de la SOD, con resultados de aumentos, ningún cambio, o disminuciones de esta enzima, dependiendo del modelo, la dieta, la cantidad, y el tiempo de consumo de alcohol (Huang et al., 2009). Distintos estudios han relacionado el consumo crónico de alcohol con una disminución de la SOD en sangre, por lo que Huang et al. (2009) sugiere que la disminución en la actividad de la SOD sea un rasgo distintivo de exposición crónica al alcohol. No hemos encontrado estudios que lo hayan medido en plasma seminal, pero nosotros hemos obtenido concentraciones menores de SOD en plasma seminal en aquellos varones que declararon haber consumido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses ( $p=0,045$ ).

También encontramos tres asociaciones de la SOD relacionadas entre sí: el contacto con tóxicos, su frecuencia y tener una industria cerca del lugar de residencia. Aquellos sujetos que declararon mantener un contacto con tóxicos ( $p=0,012$ ), sobre todo con una frecuencia diaria ( $p=0,035$ ), y los que tenían una industria cerca de su hogar, eran los que presentaban mayores concentraciones de SOD ( $p=0,026$ ). Realmente desconocemos el por qué de estas asociaciones, en la bibliografía revisada no se detallan posibles tóxicos que provoquen un incremento de la concentración de la SOD. Según Hamada et al. (2013) la actividad de la SOD aumenta con la presencia de donadores de electrones y se inactiva con la de aceptores. Sería interesante estudiar cuáles son los posibles tóxicos con los que pueden estar en contacto los varones y qué tipo de materiales utilizan las industrias que puedan afectar a la concentración de SOD en plasma seminal.

Recordemos también las correlaciones positivas obtenidas con el Cd, el Cr y con la práctica totalidad de los metales considerados como antioxidantes (excepto con el Co): el Fe, el Se, el Cu, el Zn y el Mn. Los 3 últimos casos ( $p<0,001$ ) pueden deberse a los tres tipos de SOD identificados en los mamíferos: la CuZn-SOD y la Cu-SOD localizadas en el citoplasma o en los elementos extracelulares, y la Mn-SOD que se localiza en las mitocondrias (Celino et al., 2011), aunque se considera que la tercera enzima es insignificante en el fluido seminal.

Por último, cabe destacar que la fuerte asociación positiva de la vitamina B<sub>12</sub>, y el fólico con la actividad de la SOD en plasma seminal ( $p<0,001$ ) confirma la dificultad de



medir la eficacia de un antioxidante de forma aislada del resto ya que parece existir una cooperación. Esta asociación apoya el efecto de fenómeno concomitante de las dos vitaminas y la enzima contra los efectos deletéreos de lípoperoxidación y el estrés oxidativo que afecta a la calidad espermática.

Una vez expuestos todos los antioxidantes, queda patente que el que más influencia directa tiene sobre los parámetros seminales es la vitamina B<sub>12</sub>, puesto que es la única que correlaciona positivamente con dos de ellos, la concentración y la motilidad espermáticas. Además, esta vitamina estaba presente a niveles más elevados en el grupo que cumplía los criterios de la OMS 1999. El resto de antioxidantes no presentaron correlaciones significativas con los parámetros seminales o bien obtuvimos un carácter ambiguo (folato y vitamina C). Sin embargo, encontramos algunas asociaciones en el estudio por grupos. La SOD también estaba más elevada en el grupo que cumplía los criterios de la OMS 1999, y la GPx en el grupo de varones cuyos sémenes capacitaban bien. Por lo que también podríamos considerar que estos dos antioxidantes influyen sobre los parámetros seminales, quedando el folato y la vitamina C como los únicos con una implicación por determinar.

En resumen, respecto a los antioxidantes en plasma seminal, y considerando no sólo su influencia directa sobre los parámetros seminales, sino también el resto de asociaciones, podemos afirmar que los que demuestran con más claridad su acción antioxidante en general son la SOD y la vitamina B<sub>12</sub>. Mientras que en el caso de la GPx, la vitamina C, el folato y la catalasa, hemos obtenido resultados un tanto ambiguos.

A continuación presentamos los datos obtenidos en lo que respecta al producto de la oxidación, es decir, el MDA. Ya hemos reseñado que los espermatozoides, debido a su estructura específica, parecen ser muy sensibles al estrés oxidativo. La membrana plasmática del espermatozoide es muy rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales sufren peroxidación fácilmente, dando como producto el MDA. Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se concentran en la parte central del espermatozoide, por lo que una gran parte de la membrana del espermatozoide permanece sin protección (Zelen et al., 2010). Por ello, la peroxidación de los PUFAS causa cambios en la fluidez de la membrana espermática, que en última instancia puede conducir a una peor motilidad espermática y fertilización (Agarwal et al., 2012b). A pesar de esto, en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna correlación estadísticamente significativa entre los distintos parámetros del seminograma y el

MDA. No obstante, sí que observamos una asociación positiva con el porcentaje de formas anormales y con el ITZ, y una correlación negativa con la concentración espermática y la motilidad total, pero sin que estas correlaciones llegasen a ser significativas. Sin embargo, en el modelo de agrupación de sujetos en función del MDA, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos para la vitalidad espermática ( $p=0,041$ ), que presentaba un mayor porcentaje en el grupo con menor lipoperoxidación. Esto se puede deber a que la perfecta conservación de la membrana de los espermatozoides es fundamental para llevar a cabo sus funciones, por ello los que están vivos presentarán menor lipoperoxidación que los espermatozoides muertos. Pero al realizar el análisis de regresión logística binaria observamos que no había modelo, por lo que no podemos utilizarlo como factor predictor para esta agrupación. A pesar de esto, parece que la lipoperoxidación influye en la vitalidad de los espermatozoides.

En lo que respecta a los hábitos de vida, en el presente estudio se encontraron asociaciones significativas del MDA con el tipo de profesión ( $p=0,049$ ) y con el lugar de residencia ( $p=0,042$ ). La concentración de MDA fue superior en aquellos varones cuya profesión conllevaba un esfuerzo físico y los que residían en una gran ciudad. También encontramos asociaciones con el consumo de tabaco, pero sorprendentemente aquellos varones que declararon ser exfumadores ( $p=0,007$ ) y no encontrarse expuestos con frecuencia al humo del tabaco ( $p=0,022$ ), fueron los que presentaron mayores concentraciones de MDA en su plasma seminal, resultado que discutiremos más adelante. Por último, hallamos asociaciones positivas con la GPx ( $p=0,002$ ), la vitamina C ( $p<0,001$ ) y el consumo frecuente de naranja ( $p=0,035$ ), es decir, con dos de los antioxidantes en los que no hemos encontrado un potencial antioxidante bien definido.

Para finalizar con el análisis de las asociaciones significativas obtenidas, sólo nos queda profundizar en la relación entre las variables socio-demográficas y clínicas y la calidad seminal. Es conocido que los hábitos de vida y el estatus nutricional son determinantes críticos para una función reproductiva normal. Es más, según las Guías para la Infertilidad Masculina de la Asociación Europea de Urología, la infertilidad masculina idiopática está causada probablemente por factores genéticos y ambientales (Jungwirth et al., 2012). Una combinación de ejercicio físico reducido, cambios en la composición de la dieta, y un incremento de la ingesta de energía, ha contribuido a una epidemia mundial de obesidad con serias repercusiones en distintos aspectos de la salud, incluida la fertilidad (Braga et al., 2012). El estilo de vida se ha

relacionado con el estrés oxidativo. Los espermatozoides desde el momento en que son producidos en los testículos hasta que son eyaculados al tracto reproductor femenino, están continuamente expuestos al entorno oxidativo, y por ello el estrés oxidativo ha sido reconocido como una de las causas más importantes de infertilidad masculina (Ebisch et al., 2006; Tremellen, 2008; Li et al., 2011; Braga et al., 2012). Li et al. (2011) en su meta-análisis llegaron a la conclusión de que una elevada edad, el consumo de tabaco y alcohol, y el estrés psicológico, son factores de riesgo para la calidad seminal. A pesar de esto, la asociación de parámetros seminales pobres con malos hábitos de vida es difícil, puesto que si el varón es consciente de tenerlos en la mayoría de los casos no se presta a ser incluido en un estudio (Povey et al., 2012). A continuación exponemos nuestros resultados.

En cuanto a la edad (23-49 años), solamente se correlacionó positivamente con la motilidad total ( $p= 0,046$ ), es decir, que los sujetos de mayor edad de nuestra serie disponían de una mejor motilidad (siendo la edad máxima de nuestros sujetos de 49 años) en contraposición a lo afirmado por Agarwal et al. (2012a), que señalaba que está demostrada la asociación entre la edad paterna aumentada y los parámetros espermáticos disminuidos, sobre todo la motilidad progresiva y el recuento espermático.

Numerosos estudios han relacionado la obesidad con la infertilidad masculina, y exponen distintos mecanismos que podrían ser los responsables de los efectos dañinos de la elevación del IMC sobre los parámetros espermáticos: un estado hormonal reproductivo alterado (Jensen et. al, 2004; Hammoud et al., 2008a; Chavarro et al., 2010), un efecto perjudicial en la función epididimal (Braga et al., 2012), una deposición y un metabolismo alterado de tóxicos ambientales (Martínez, 2011), una resistencia a la insulina o una dislipidemia, que en ocasiones se asocian con un aumento del estrés oxidativo (Dandona et al., 2005; Davi et al., 2005). En la literatura encontramos asociaciones entre el IMC y la calidad seminal (Chavarro et al., 2010; Braga et al., 2012; Hammiche et al., 2012), aunque según Chavarro et al. (2010) sólo en presencia de obesidad extrema, y en cada estudio con distintos parámetros seminales. Hammoud et al. (2008a) defiende que el efecto de la obesidad sobre la infertilidad masculina parece ser modesto, pero con la creciente incidencia de la obesidad, se espera que el número de hombres obesos con la fertilidad reducida aumente también. El Instituto Nacional para la Excelencia Clínica de UK considera un IMC superior a  $29 \text{ kg/m}^2$  como un factor perjudicial para la calidad seminal (NCCWCH, 2004). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con estos datos, ya que no hemos

encontrado ninguna asociación entre el IMC y los parámetros del seminograma, en la línea de Duits et al. (2010) y MacDonald et al. (2010). Esto puede deberse a que nuestros varones presentaban una mediana de IMC de 26,205 kg/m<sup>2</sup> que, según la clasificación de la OMS (WHO, 2000b) se sitúa en Sobrepeso, pero con un RI que se encuentra entre Normal y Sobrepeso, sin llegar al Infrapeso (<15,99 kg/m<sup>2</sup>) ni a la Obesidad (≥ 30 kg/m<sup>2</sup>), por lo que al situarse todos los sujetos en un estrecho rango de IMC no hemos encontrado diferencias entre ellos que permitan asociarlas al resto de variables del estudio.

Cabe la posibilidad de que la pareja no consiga tener hijos pero que cada uno por separado con sus hipotéticas parejas respectivas sí que pudieran ser capaces de tenerlos, por ello incluimos en el Cuestionario la pregunta de si los varones habían tenido hijos previamente con otra pareja. En el modelo de agrupación de sujetos en función de los valores de la OMS, la mayoría de los varones que no había tenido hijos con otra pareja, pertenecía al grupo que no cumplía las características de la OMS (p=0,049). Asimismo, observamos que existían tres asociaciones con metales, dos de ellos considerados como oxidantes (Co y Hg) y uno de ellos que contribuye a modular la actividad de los antioxidantes, el Cd (p=0,008, p=0,044 y p=0,005 respectivamente). La mayoría de los individuos declararon no haber tenido hijos previamente, pero curiosamente cuando presentaban concentraciones superiores a 0,4 µg/L para el Cd y el Co, o de 0,5 µg/L para el Hg, aumentaba el porcentaje de varones que afirmaba haber tenido hijos con otra pareja.

La asociación entre los metales y la temperatura corporal es un dato que no ha sido descrito previamente. En nuestro estudio descartábamos las muestras de los varones que habían padecido fiebre con una temperatura superior a 38 °C. Por esta razón en el análisis estadístico de nuestros datos, los sujetos incluidos en el grupo que padeció un proceso febril en ningún caso superaron los 38 °C, por lo que trabajamos con un intervalo estrecho de temperaturas corporales. Aun así encontramos asociaciones significativas con los metales antioxidantes. En concreto con el Cu, el Mn, el Se y el Zn (p=0,008, p=0,011, p=0,025, p=0,026 respectivamente), también con el Co y el Fe pero estas últimas correlaciones no resultaron significativas. Asimismo ocurre con la vitamina B<sub>12</sub>, única vitamina que se ve afectada por un proceso febril (p<0,001) y que, como hemos reseñado, correlaciona significativamente de forma positiva con los metales anteriores. En todos los casos se encontraron niveles más bajos en plasma seminal cuando el paciente declaró haber padecido fiebre en los últimos 3 meses. Esto puede deberse a que un proceso febril va asociado a una infección vírica o bacteriana

en el que se producen citoquinas pro-inflamatorias que activan los macrófagos y otros leucocitos y de esta manera comienza la cascada de estrés oxidativo (Hou et al., 2011). Quizás sea interesante estudiar estas asociaciones cuando la temperatura corporal haya superado los 38 °C, y observar si aumenta el número de asociaciones significativas y a su vez, estudiar con mayor profundidad el mecanismo que tiene lugar.

Respecto a los hábitos alimenticios recomendados destaca que la única asociación significativa con los parámetros seminales fue el consumo de kiwi una vez a la semana con un mayor porcentaje de individuos con formas anormales ( $p=0,019$ ), a pesar de ser considerado una fruta rica en antioxidantes, sobre todo en vitamina C. Las asociaciones más importantes observadas respecto a los hábitos alimenticios recomendados con los antioxidantes y los Metales y Elementos Traza ya las hemos ido explicando previamente. Pero también obtuvimos otras asociaciones, unas de ellas positivas como son el consumo de naranja y tomate con el Al ( $p=0,004$  y  $p=0,034$  respectivamente); la ingesta de verduras y hortalizas con el Zn, la vitamina B<sub>12</sub> y la SOD ( $p=0,021$ ,  $p=0,024$  y  $p=0,019$  respectivamente); la calabaza con la catalasa ( $p=0,019$ ) y, como ya se ha comentado, los frutos secos y el kiwi con el folato. Las asociaciones negativas fueron el aceite de oliva con el Mn ( $p=0,027$ ), y el huevo con la GPx ( $p=0,036$ ). Pero son necesarios más estudios para confirmar estos resultados, ya que no hemos encontrado en la literatura actual asociaciones similares, y sería conveniente, si es posible, medir exactamente la cantidad de cada nutriente ingerido por los varones más que considerar sólo la frecuencia de consumo, como hemos realizado en este estudio.

Hay publicados un gran número de artículos que tratan de los efectos del consumo de tabaco sobre la función reproductiva masculina, sin embargo, sus resultados son un tanto contradictorios (Martini et al., 2004; El-Melegy et al., 2011). Además, el mecanismo exacto por el que influye, continúa sin esclarecerse (Ozgun et al., 2005; Kumosani et al., 2008; Pasqualotto et al., 2008; El-Melegy et al., 2011). Los que defienden una relación de la infertilidad masculina con el consumo de tabaco se basan directamente en una reducción de la calidad seminal (Künzle et al., 2003; Ozgun et al., 2005; Chen et al., 2007; Gaur et al., 2007; Ramlau-Hansen et al., 2007a; Hassan et al., 2009; El-Melegy et al., 2011; Li et al., 2011; Braga et al., 2012; Taha et al., 2012), especialmente en grandes fumadores (Chia et al., 1994), pero cada uno de ellos señala distintos parámetros espermáticos.

Otros trabajos, sin embargo, aportan algunas posibles explicaciones de dicha relación: apoptosis (El-Melegy et al., 2011), metabolismo aeróbico del espermatozoide (Chohan et al., 2010), afectación del eje hipotálamo-gónada pituitaria fetal (Ramlau-Hansen et al., 2007b), alteración hormonal (Trummer et al., 2002), aumento de la globulina fijadora de hormonas sexuales SHBG (Ravnborg et al., 2011), inducción de un entorno tóxico para el espermatozoide por parte de la nicotina y/o cotinina (Künzle et al., 2003; Chohan et al., 2010). Pero también hay autores que observan una implicación del estrés oxidativo.

Según Fariello et al. (2012) el tabaco se asocia con un aumento de los niveles seminales de EROs, que puede ocurrir por dos mecanismos principales: la primera por una leucocitospermia inducida por la inflamación crónica del tracto genital, y la segunda por la presencia de EROs en el propio cigarrillo. Según Church et al. (1985) se encuentran tres tipos de radicales en el cigarrillo: los radicales estables presentes en el alquitrán del tabaco, los generados en la combustión del cigarrillo, y los producidos tras la oxidación del NO a NO<sub>2</sub> y su posterior reacción con especies reactivas del tabaco. Close et al. (1990) al igual que Trummer et al. (2002) encontraron una asociación entre el consumo de tabaco y el aumento de los leucocitos en plasma seminal, a pesar de desconocer el mecanismo por el que esto ocurre. Estos autores consideran a los leucocitos como una de las principales fuentes de EROs, y por tanto, relacionan indirectamente el consumo de tabaco con el estrés oxidativo.

Otros autores se basan en una disminución en plasma seminal de Zn (Kumosani et al., 2008; Taha et al., 2012), de SOD (Kumosani et al., 2008), o en un aumento de Cd aislado (Chia et al., 1994; Kumosani et al., 2008), de Cd y Pb (Kiziler et al., 2007) o del daño del ADN espermático (Ramlau-Hansen et al., 2007a; El-Melegy et al., 2011; Taha et al., 2012). Nosotros no hemos observado una asociación significativa del consumo de tabaco con los metales anteriores, pero sí con la concentración de Cu en plasma seminal ( $p=0,029$ ). Encontramos mayores concentraciones de Cu en los sujetos que declararon no ser fumadores, seguidos de los exfumadores. Esto puede deberse a que es un metal antioxidante por si mismo, y además es un cofactor de la SOD, de manera que en los fumadores estaría disminuido por el desequilibrio oxidativo que causa el tabaco. En la bibliografía revisada también existen estudios que, al igual que nosotros, no han encontrado ninguna asociación entre el hábito tabáquico y la función espermática o el daño al ADN nuclear de los espermatozoides (Trummer et al., 2002; Swan et al., 2003; Martini et al., 2004; Okonofua et al., 2005; Pasqualotto et al., 2008; Li et al., 2009; Chohan et al., 2010).

Según Pasqualotto et al. (2008) fumar induce estrés oxidativo, bien aumentando los niveles de oxidantes que provienen del tabaco o bien disminuyendo los niveles de antioxidantes en el plasma seminal. Ya hemos explicado que en nuestro estudio encontramos una asociación significativa entre los niveles de vitamina C en plasma seminal y el hábito tabáquico, en la línea de Tremellen (2008). Los que presentaron mayores concentraciones de esta vitamina fueron los varones que declararon no ser fumadores o ser exfumadores y no encontrarse con frecuencia en ambientes cargados de humo de tabaco.

Taha et al. (2012) mostraron un test de HOS indicativo de una membrana celular defectuosa en fumadores. Nosotros encontramos una correlación del MDA (marcador de lipoperoxidación en la membrana espermática) con la frecuencia del consumo de tabaco y con la exposición a ambientes cargados de humo. Tanto en el estudio de correlaciones como en el modelo de agrupación en función del MDA observamos que la mayor lipoperoxidación la presentaban los varones exfumadores ( $p=0,007$  y  $p=0,033$  respectivamente), y aquellos que no se encontraban con frecuencia expuestos a ambientes cargados de humo de tabaco ( $p=0,022$  y  $p=0,036$  respectivamente). Además tras realizar la regresión logística binaria, comprobamos que el ser fumador activo disminuía la probabilidad de presentar una elevada peroxidación lipídica en su plasma seminal (ORP=0,344), lo que confirmaba los resultados anteriores. En suma, no hemos encontrado una relación lineal entre el consumo de tabaco y un aumento del MDA en el plasma seminal como indican otros autores.

De todos los artículos revisados en los que se estudia el hábito tabáquico y la infertilidad masculina, sólo Trummer et al. (2002) incluían como grupo a estudio el de exfumadores, además del de fumadores y el de no fumadores. Trummer et al. (2002) propusieron considerar a los exfumadores como un grupo especial de varones, y propusieron que deberían realizarse estudios exhaustivos comparando resultados entre fumadores y exfumadores. Por otro lado, Louhelainen et al. (2009) señalaron que el estrés oxidativo puede persistir varios meses en las vías aéreas después de que los pacientes dejen de fumar. Pero subrayaron que son necesarios futuros estudios para investigar los mecanismos específicos que pueden permanecer activados después del cese de fumar y conocer el desarrollo de una nueva modulación antioxidante. Una de las limitaciones de aquel estudio fue que no tuvo un seguimiento largo en el tiempo, por lo que podríamos encontrarnos que el estrés oxidativo permaneciera durante años y no sólo meses como ellos afirman. Con los datos aportados por Louhelainen et al. (2009) y extrapolados a la calidad seminal podríamos explicar el motivo de la mayor

concentración de MDA en los exfumadores que en el resto de varones. Debido a que no existen estudios que incluyan al grupo de exfumadores y que se centren en la calidad seminal, son necesarias más investigaciones para confirmar nuestros resultados.

La inconsistencia en la literatura parece deberse a que la mayor parte de los estudios que defienden una diferencia significativa en la calidad seminal, se realizaron con varones sanos que no asisten a clínicas de infertilidad, mientras que sólo el 25 % de los estudios se llevaron a cabo en sujetos con sospecha de infertilidad. Por otra parte, unos estudios relacionaban los parámetros del seminograma con los años de fumador, otros con el número de cigarrillos por día y otros con la concentración de cotinina en plasma seminal (Ramlau-Hansen et al., 2007a). También hay quien achaca la contradicción de resultados a la variación geográfica de los varones en los estudios, que puede asociarse con factores de nutrición y con una variabilidad genética (Li et al., 2011), o al hecho de que la mayor parte de los estudios tuvieran un tamaño muestral pequeño (Ramlau-Hansen et al., 2007a; Pasqualotto et al., 2008). En nuestro estudio, de 181 varones sólo el 35,1% eran fumadores y de ellos, sólo el 22% fumaba más de 10 cig/día. Puede ser que esta baja casuística sea la razón de que no hayamos encontrado asociaciones de interés entre el hábito tabáquico y la calidad seminal.

En cuanto al consumo de alcohol, numerosos estudios investigaron específicamente su implicación sobre la calidad espermática y algunos de ellos demostraron que tiene efectos perjudiciales (Merino et al., 1998; Rubes et al., 1998; Okonofua et al., 2005; Li et al., 2011; Braga et al., 2012), pero otros no encontraron ningún efecto dañino sobre los parámetros del seminograma e incluso observaron un efecto protector (Adelusi et al., 1998; Auger et al., 2001; Künzle et al., 2003; Martini et al., 2004). Según Ibrahim et al. (2012), después de un consumo crónico y excesivo, el alcohol puede acelerar el mecanismo oxidativo, directamente incrementando la producción de EROs o indirectamente debilitando los mecanismos de protección. Las dos únicas asociaciones que hemos encontrado en nuestro estudio para el consumo de alcohol, fueron con el Hg y con la SOD, ambas de carácter positivo como ya han sido comentadas con anterioridad, por lo que nuestros resultados no ayudan a esclarecer la influencia del alcohol en la infertilidad masculina.

Son pocos los estudios que relacionan directamente las drogas con la calidad seminal en humanos (Rossato et al., 2005), en animales son más frecuentes (Maccarrone et al., 2005; Morgan et al., 2012) o *in vitro* (Whan et al., 2006; Badawy et al., 2009). Los



estudios revisados relacionan el consumo de drogas principalmente con la motilidad (Rossato et al., 2005; Whan et al., 2006; Morgan et al., 2012) sobre todo por la presencia de receptores para cannabinoides (CB1-R) en los espermatozoides. Por otra parte, Agarwal et al. (2003) declaran que está demostrado que la cocaína afecta al DNA espermático rompiendo las hebras y provocando apoptosis. Estas afirmaciones están en línea con nuestros resultados, puesto que encontramos una fuerte correlación positiva entre el consumo de drogas y su frecuencia, con el ITZ ( $p=0,012$  y  $p=0,024$  respectivamente). Además, por otra parte, ya hemos señalado que el consumo de drogas se relacionaba con el Ni y el V, siendo en ambos casos la concentración en plasma seminal más elevada cuando el consumo de drogas era diario pero, a su vez, ambos metales correlacionaban positivamente con el ITZ. De manera que, según nuestro estudio, parece existir relación entre el consumo de drogas en general y la morfología espermática tanto de forma directa como indirecta. En nuestro caso, esta relación se hace más evidente para el cannabis y la cocaína, las más consumidas por los varones del presente estudio.

El ejercicio físico es otro de los hábitos de vida que se ha estudiado como posible factor influyente en la fertilidad masculina (Braga et al., 2012). Nuestros resultados indican que no existe una relación directa sobre los parámetros espermáticos, pero sí indirecta. Encontramos una fuerte correlación positiva con la vitamina B<sub>12</sub> y el folato en plasma seminal ( $p=0,011$ ,  $p=0,026$  respectivamente), aunque también una débil con el Ni, como ya hemos reseñado. Estas asociaciones no han sido estudiadas por otros autores. Pero coincidimos con Agarwal et al. (2012) en que probablemente sea mejor limitar la práctica de ejercicio físico para minimizar cualquier efecto pro-oxidante debido al exceso de metabolismo aeróbico del músculo, que generaría una gran cantidad de EROs (Tremellen, 2008), sobre todo en el caso de la práctica de deportes extremos (Jungwirth et al., 2012).

Una de nuestras inquietudes era conocer la calidad seminal de los varones nacidos en España respecto a los residentes en nuestro país pero de origen extranjero, por ello recogimos en nuestro Cuestionario el país de nacimiento de los varones. Con los resultados del estudio de asociaciones podemos afirmar que la calidad del semen de los varones nacionales era muy inferior a la de los inmigrantes. Los varones nacidos en España presentaron en su plasma seminal cifras más elevadas de ITZ ( $p=0,016$ ), menores de REM ( $p<0,001$ ) y menor concentración de espermatozoides ( $p=0,009$ ), de Cu ( $p=0,027$ ), Cr ( $p=0,044$ ), Mn ( $p=0,016$ ), vitamina B<sub>12</sub> ( $p=0,031$ ) y SOD ( $p=0,025$ ). Además, en el modelo de agrupación de sujetos en función de los valores de

referencia de la OMS, la mayoría de los que referían haber nacido en España pertenecían al grupo que no cumplían las características de la OMS 1999 ( $p=0,004$ ). Tras realizar la regresión logística binaria, observamos que no haber nacido en España aumentaba la probabilidad de pertenecer al grupo de referencia ( $ORP=0,249$ ) (Tabla 64). Todo esto nos permite afirmar que, entre los varones incluidos en nuestro estudio, el hecho de haber nacido en España aumenta las probabilidades de pertenecer al grupo que no cumple los criterios de la OMS y presentar una peor capacitación respecto de otros países.

Las características étnicas también se han considerado de interés clínico en la evaluación de la infertilidad (Aktan et al., 2013), pero en nuestra muestra poblacional el 96% de los sujetos era de raza blanca, por ello no obtuvimos resultados concluyentes.

El tipo de profesión y el lugar de residencia no mostraron una asociación directa con los parámetros seminales en nuestro estudio, pero hemos reseñado previamente que mostraron asociaciones significativas con el MDA. La concentración de MDA fue superior en aquellos varones cuya profesión conllevaba un esfuerzo físico y en los que residían en una gran ciudad. También cabe recordar la asociación positiva ya citada entre la residencia en una gran ciudad y el Pb. Por tanto, se observa que de forma indirecta, sí que se ve afectada la calidad seminal por el tipo de profesión y el lugar de residencia del sujeto.

El estrés es uno de los problemas sociales más importantes para la salud. Es responsable de distintas enfermedades y juega un papel perjudicial en la fertilidad. La angustia psicológica a menudo se propone como una causa de infertilidad inexplicada. Li et al. (2011), después de realizar su meta-análisis, sugirieron que la calidad del semen se ve afectada desfavorablemente por determinadas condiciones de trabajo, por algunos acontecimientos de la vida o por el estrés derivado de circunstancias sociales. Dichos factores psicológicos pueden ser una causa de infertilidad masculina. Estos autores advierten que el estrés psicológico puede afectar a la calidad del semen indirectamente incrementando el consumo de sustancias como el alcohol y el tabaco (Li et al., 2011). En nuestro estudio sólo un 18% de los varones consideraban que padecían un nivel de estrés elevado, quizás debido a esto no hayamos encontrado asociaciones estadísticamente significativas con la calidad seminal. La única relación observada fue con el Cr, como ya hemos explicado anteriormente, metal de carácter ambiguo que tampoco ayuda a esclarecer la influencia sobre la infertilidad masculina.

En resumen, de todas las circunstancias sociales y hábitos de vida estudiados, los que parecen afectar directamente a los parámetros espermáticos son el país de nacimiento y el consumo de drogas. En el primer caso, los varones que participaron en nuestro estudio nacidos en España presentaron una menor concentración de espermatozoides, un menor REM y una peor morfología con respecto a los nacidos en otros países. Y en el segundo caso, el consumo de drogas se asoció con una peor morfología mediante el incremento del ITZ. Aunque el resto de hábitos también parecen afectar indirectamente.

Finalmente, según los modelos de agrupación establecidos, que ya hemos ido comentando sobre cada variable, concluimos que:

- Para conocer si un varón cumplirá los criterios de la OMS 1999, los mejores indicadores de buena calidad seminal de nuestra investigación parecen ser el Mn, la SOD y el país de nacimiento (no haber nacido en España).
- Para identificar una buena capacitación, el mejor parámetro es la concentración de Co (cuando se presente entre 0,2 y 0,4 µg/L en plasma seminal).
- Para conocer la presencia de lipoperoxidación los indicadores a considerar son el Co (cuando su concentración es igual o superior a 0,2 µg/L), la vitamina C y el ser fumador activo, que aumentan la probabilidad de pertenecer al grupo de mayor lipoperoxidación en el plasma seminal, y el Pb (cuando es superior de 0,4 µg/L) que la disminuye.

La última parte de nuestra investigación consistió en el estudio de la precisión diagnóstica, o de la capacidad discriminante de las variables cuantitativas que mostraron diferencias estadísticamente significativas por medio de las curvas ROC, que ofrecieron algunos resultados novedosos.

Por una parte, se evidenció que para discriminar si un varón que acude a la Consulta de Infertilidad pertenecerá al grupo de sujetos que no cumplen los criterios de la OMS 1999, el mejor predictor es el modelo logístico mediante la aplicación de la ecuación 1 en el que se consideran de forma conjunta el Ni y el Mn, puesto que presenta un ABC de 0,730. La especificidad del modelo propuesto fue de 83,33%, pero su sensibilidad no fue tan buena (58,97%), por lo que podríamos considerarla sobre todo como un buen método confirmatorio. El punto de corte fue de 0,75 y el VPP del 90,8% (Fig. 50). Por tanto, podríamos afirmar que aquellos varones que presenten un valor mayor de 0,75 presentarán una elevada posibilidad de no cumplir los criterios de la OMS 1999

(Tabla 82). Este resultado, a su vez, ayuda a esclarecer la relación entre el Ni y el Mn con la calidad seminal puesto que, como hemos comentado, en la bibliografía no existe un consenso sobre ella (Marzec-Wróblewska et al., 2012). De esta manera nuestros resultados confirman la implicación de estos metales en la infertilidad masculina, su influencia directa sobre los parámetros seminales y, como consecuencia, su utilidad como predictores de la fertilidad del varón. Es más, se podría plantear que quizás simplemente la determinación del Ni y Mn en plasma seminal nos podría orientar sobre la calidad seminal que presenta el varón, evitándonos así realizar el seminograma en por primera instancia, técnica manual mucho más laboriosa y subjetiva.

Igualmente, el modelo logístico [Motilidad progresiva (A+B) + Formas Normales + GPx] nos puede permitir la identificación de varones cuyos sémenes no capacitarán bien, es decir, obtendrán un REM menor de  $10 \times 10^6$  (Fig. 55). Niveles superiores de 0,533 de este modelo, calculados con la ecuación 2, mostraron una sensibilidad y especificidad diagnósticas aceptables (S=81,25%, E=89,36%). Además, al mostrar un ABC de 0,898, un VPP del 88,6% y un VPN 82,4% (Tabla 85), observamos una gran capacidad para discriminar correctamente a los varones que acuden a la Consulta de Infertilidad, cuyos sémenes no capacitarán bien. No disponemos de bibliografía que haya relacionado el REM con estos parámetros pero este hallazgo es coherente con la idea de que la morfología y la motilidad progresiva de los espermatozoides sean las que condicionan el resultado de la capacitación. Además, si consideramos que la concentración de GPx es mucho mayor en los espermatozoides que en el plasma seminal (Gallardo, 2007), entendemos que nos estamos centrando en unos parámetros decisivos para la calidad de los espermatozoides que, lógicamente, son los que más van a influir en su capacitación. En este caso, para conocer a grandes rasgos la calidad de la capacitación seminal, una vez realizado el seminograma, no haría falta estudiar el REM, sólo sería necesario determinar la concentración de GPx en plasma seminal. De esta manera conoceremos los tres parámetros del modelo logístico y podremos calcular el valor que determinará la calidad de la capacitación mediante la ecuación 2, por lo que podríamos pasar de realizar otra técnica manual muy laboriosa a una automatizada.

Por último, para predecir si el varón que acude a la Consulta de Infertilidad presenta lipoperoxidación en el plasma seminal el mejor modelo logístico fue [Vitamina C + Co] (Fig. 59), con un ABC de 0,776, una S y una E de 63,24% y 82,72% respectivamente. Por su mayor especificidad podríamos considerarlo como un buen método

confirmatorio. Niveles iguales o inferiores a 0,513 mostraron un VPP de 75,4% y VPN de 72,8% (Tabla 88), por lo que con una elevada probabilidad el varón presentará una concentración de MDA en el plasma seminal superior a 40 µg/L ante dichos niveles.

La administración de antioxidantes, con el fin de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno parece mejorar la calidad espermática (Hamada et al., 2012). De todos los parámetros expuestos anteriormente como predictores para las curvas ROC en cualquiera de los tres modelos (Ni y Mn; motilidad progresiva, formas normales y GPx; vitamina C y Co), podemos intervenir con un aporte externo directamente en la concentración de vitamina C e indirectamente, a través de la vitamina B<sub>12</sub>, en la motilidad progresiva y Mn puesto que, como ya se ha comentado, observamos una correlación positiva con la motilidad y el Mn. De esta manera deberíamos aconsejar a los varones que aumenten la ingesta de aquellos alimentos ricos en vitamina C como son las frutas, sobre todo las cítricas o el kiwi, las verduras y las hortalizas. Y para la vitamina B<sub>12</sub> recomendaremos un aumento del consumo de carne, leche, productos lácteos y huevos (Dapcich et al., 2004; Deulofeu et al., 2005).

Por otra parte, también se puede intervenir en los hábitos de vida (Hamada et al., 2012) que influyen en los parámetros predictores descritos por nosotros. Como se ha expuesto con anterioridad la vitamina C correlacionaba negativamente con la frecuencia de consumo de tabaco y con la exposición a ambientes cargados, el Ni por su parte correlacionaba positivamente con el consumo de drogas y la frecuencia con la que se llevaba a cabo y, la vitamina B<sub>12</sub> correlacionaba positivamente con el ejercicio físico y la frecuencia con la que se realizaba. De manera que si un varón presenta un valor mayor de 0,75 en el modelo logístico [Ni + Mn] podríamos predecir que el varón no presentará un semen que cumpla los criterios de la OMS 1999 en los 4 parámetros más importantes, y por tanto le podríamos aconsejar que cesara el consumo de drogas y/o tabaco en caso de ser consumidor, y que incrementase su ingesta de vitamina B<sub>12</sub>, aumentando el consumo de los alimentos anteriormente citados.

En el caso de que el varón presente niveles superiores de 0,533 en el modelo logístico [Motilidad progresiva + Formas Normales + GPx] podremos predecir que su semen no capacitará bien, y si se va a someter a técnicas de reproducción asistida, podríamos aconsejarle un mayor aporte de vitamina B<sub>12</sub> por los mismos motivos expuestos con anterioridad.

Finalmente, si el varón presenta niveles iguales o inferiores a 0,513 en el modelo logístico [Vitamina C + Co], probablemente presentará lipoperoxidación en su plasma seminal, y podríamos recomendarle un mayor aporte de vitamina C para reducir esta peroxidación que perjudica a su calidad seminal.

A pesar de la asociación común entre la calidad del semen y el daño oxidativo, los hombres raras veces son protegidos para el estrés oxidativo ni tratados para esta condición. En cambio por lo general les ofrecen tratamientos “mecánicos” como la FIV, el ICSI o la IA. Este procedimiento no es la mejor opción puesto que el daño oxidativo de los espermatozoides no mejora con estas técnicas. Además, el tratamiento directo del estrés oxidativo podría permitir la concepción natural, ahorrando recursos médicos (Tremellen, 2008).

Cuando un varón acude junto a su pareja a la consulta de Infertilidad porque llevan tratando de concebir más de un año sin éxito, el ginecólogo debe realizar todas las pruebas necesarias para identificar la causa anatómica o funcional en cualquiera de los dos componentes de la pareja, incluyendo el estudio del seminograma como hasta ahora está establecido. Pero, según los resultados de nuestra investigación, para obtener un conocimiento rápido de si el varón cumple los criterios más importantes de la OMS 1999 o no, como cribado en el laboratorio podría determinarse la concentración de Mn y Ni en plasma seminal. Tras aplicar el modelo logístico [Mn + Ni] mediante la ecuación 1, si obtenemos un valor mayor de 0,75, nos indicaría que el sujeto probablemente no cumplirá los criterios de la OMS y por tanto habría que realizar el seminograma para identificar cuáles son los parámetros que se ven afectados. En cambio, con un resultado menor de 0,75 nos está indicando que el varón probablemente cumple los criterios de la OMS 1999, y por tanto no sería necesario realizar el estudio del seminograma para comprobar la calidad seminal. Ver figura 61.

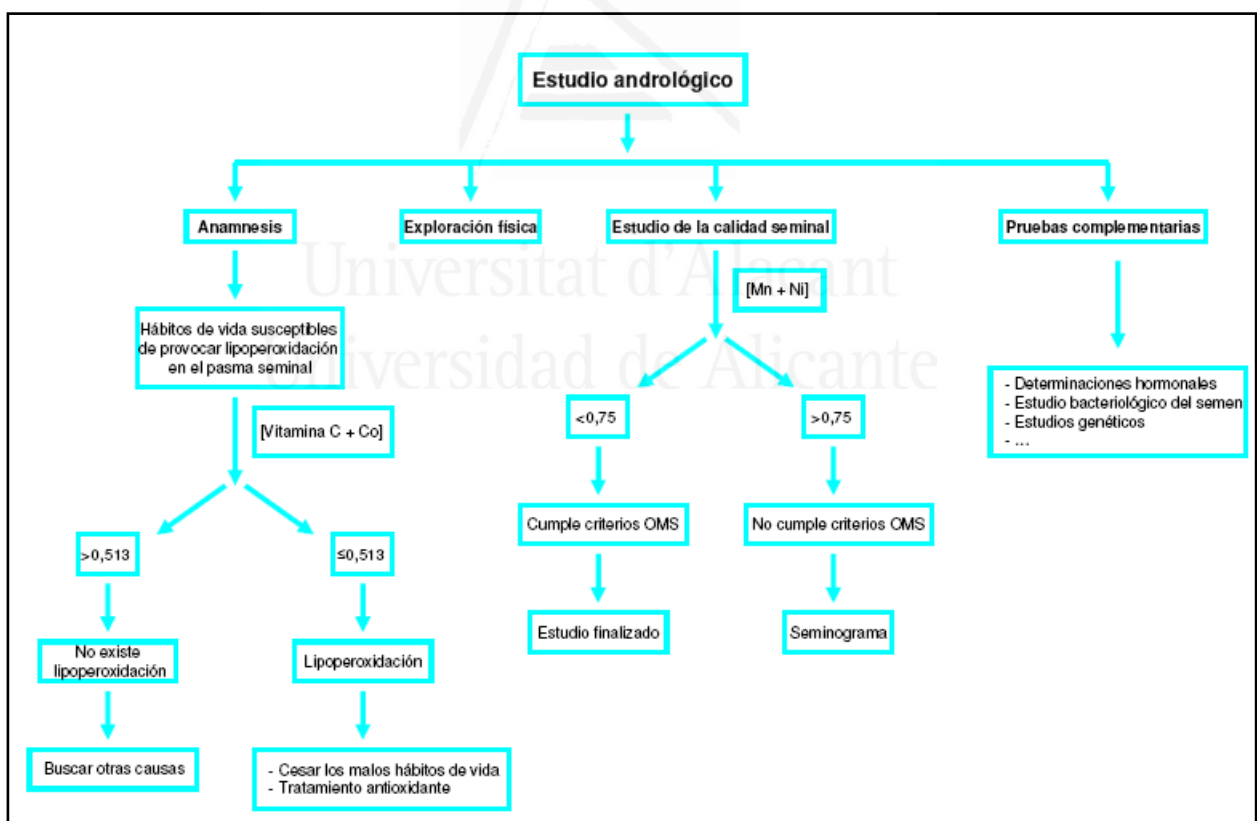
Otra opción podría ser utilizar este modelo matemático como confirmatorio ante un seminograma con resultado anodino, es decir, cuyos parámetros se encontrasen en torno a los límites de referencia. De esta manera se evitaría tener que solicitar al varón un segundo estudio del seminograma, con la consiguiente agilización del proceso en el que se haya inmerso el sujeto.

En el caso de no conseguir identificar la causa de la infertilidad, no se debe etiquetar a la pareja como infertilidad idiopática sin haber realizado también el estudio del estrés

oxidativo. Al realizar la anamnesis del varón, si por los hábitos de vida que refiere el sujeto, se sospecha que el varón es susceptible de presentar lipoperoxidación en el plasma seminal, el ginecólogo/urólogo solicitaría el estudio de vitamina C y Co, y aplicando la ecuación 3 del modelo logístico [Vitamina C + Co] se evidenciaría la presencia de lipoperoxidación (valores iguales o inferiores a 0,513) o su ausencia (valores superiores a 0,513). En el primer caso el ginecólogo/urólogo debería aconsejar al sujeto que cesara los hábitos de vida que puedan estar ocasionando el EO e incrementar la dieta con alimentos saludables ricos en antioxidantes, y en caso necesario, recomendar un aporte extra de antioxidantes. De esta manera se tratará de mejorar la calidad seminal y conseguir un embarazo natural sin necesidad de intervenciones mecánicas.

Esta propuesta de algoritmo diagnóstico para el manejo de varones durante el estudio de infertilidad se presenta esquematizada a continuación:

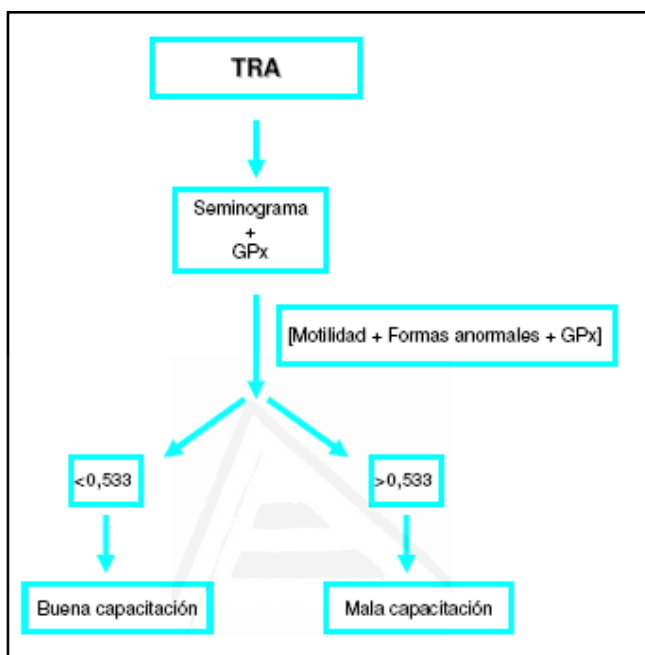
Figura 61. Propuesta de algoritmo diagnóstico



Si se toma la decisión de que la pareja acuda a técnicas de reproducción asistida por una causa justificada (algún problema anatómico, la edad de la mujer...), el ginecólogo/urólogo podría solicitar, además del estudio del seminograma, la determinación de GPx, y aplicando el modelo logístico con la ecuación 2 se podría

predecir de una forma rápida la calidad de la capacitación de ese semen, en función de si el valor obtenido es mayor o menor a 0,533. Y de esta manera decantarse por una técnica u otra, y sólo se realizaría la capacitación cuando realmente fuera necesario, es decir, durante el proceso de las TRA. A continuación se expone nuestra propuesta de actuación:

Figura 62. Propuesta de actuación para TRA



Actualmente, el seminograma rutinario es la espina dorsal en la evaluación de la infertilidad de factor masculino, además de la historia clínica detallada y el examen físico minucioso. Esto se debe a que los parámetros seminales tales como la concentración espermática, la motilidad y la morfología han demostrado estar muy relacionados con la concepción. Además, se ha propiciado el uso del seminograma en la evaluación inicial de los hombres estériles por ser una prueba rentable y no invasiva. Sin embargo, los criterios para los parámetros del semen normales varían según cuál sea la edición utilizada del manual de la OMS (Hamada et al., 2012), y por tanto influye en el manejo del estudio.

El empleo del nuevo manual de valores de referencia de la OMS (2010) en la práctica clínica probablemente cause una reclasificación de muchas de las parejas estériles. En concreto, aquellas parejas anteriormente clasificadas como infertilidad masculina cuyos parámetros seminales se encontraban por encima de los nuevos límites de referencia, pero por debajo de los valores de la edición anterior, ahora serán diagnosticadas como infertilidad de causa desconocida o de factor femenino. Se



desconoce por ahora, si esta nueva clasificación causa una evaluación más rentable de la pareja estéril o provoca un retraso en la evaluación del factor masculino con el subsecuente retraso del diagnóstico definitivo y el manejo de la pareja estéril (Hamada et al., 2012).

Además, el seminograma no proporciona información en cuanto a defectos en la funcionalidad de los espermatozoides. Muchos aspectos claves del proceso de fertilización como el transporte del espermatozoide al oocito, la interacción del espermatozoide con el moco cervical o con el oocito no pueden evaluarse por el seminograma convencional (Hamada et al., 2012). Según las Guías para la Infertilidad Masculina de la Asociación Europea de Urología, el seminograma en general es un pobre predictor de embarazo (Jungwirth et al., 2012). Por todo esto, se ha sugerido que deberían incluirse las pruebas funcionales de los espermatozoides en el análisis seminal dentro del estudio de la infertilidad masculina. Así, es imperativo concluir que seguramente sean necesarias nuevas pruebas más allá del seminograma para evaluar a los hombres subfértiles: inmunológicas, estrés oxidativo, pruebas genéticas específicas, defectos de fertilización... (Hamada et al., 2012).

La evaluación del estado del EO y el empleo de antioxidantes no es una rutina en la práctica clínica todavía, a pesar de que en el manual de la OMS 2010 ya se dedica un apartado al estudio del estrés oxidativo como un procedimiento de investigación complementario, y de que en las Guías para la Infertilidad Masculina de la Asociación Europea de Urología se considere que la contaminación ambiental y las EROs puedan provocar una disfunción testicular y una afectación en la producción espermática (Jungwirth et al., 2012). Debería tratarse de simplificar y validar la evaluación de las EROs y del estado del EO de modo que pueda ser realizado de forma rutinaria sin el empleo de equipos demasiados sofisticados, principal problema actualmente.

Nuestras propuestas anteriores agilizarían el proceso del estudio de la calidad seminal, puesto que estamos sustituyendo técnicas manuales por otras automatizadas, dejando las primeras sólo para los casos realmente necesarios. La determinación de GPx por espectrofotometría y de la vitamina C por HPLC está al alcance de la mayoría de los laboratorios, pero el principal problema es la cuantificación de los metales Ni, Mn y Co. Los Metales y Elementos Traza actualmente se determinan por espectroscopia de emisión de plasma como fue nuestro caso, o de absorción atómica, técnicas muy costosas y que requieren personal especializado, recursos que no están al alcance de todos los laboratorios.

Por lo tanto, de nuestras propuestas, la única factible actualmente para la mayoría de los laboratorios de Andrología sería la del cribado de los sujetos para la selección de las técnicas de reproducción asistida. Protocolo que, insistimos, descongestionaría a los laboratorios durante el estudio andrológico, ya que sólo se realizaría la capacitación seminal cuando la pareja ya estuviera en pleno proceso de reproducción asistida. El resto de propuestas quedan relegadas a laboratorios de tecnología más avanzada.

También es necesario tener más y mejor conocimiento del efecto del estrés oxidativo que sufren los espermatozoides cuando son manipulados durante el estudio andrológico y las TRA, y del uso de antioxidantes con el fin de disminuir el estrés oxidativo durante la conservación del semen. Es un tema muy interesante que requiere más investigación.

Finalmente, consideramos que debería determinarse el umbral de los niveles de las EROs por encima de los cuales podría utilizarse antioxidantes como tratamiento para la infertilidad masculina. La dosis y la duración de estos antioxidantes, también deberían ser cuantificadas y estandarizadas.





## **CONCLUSIONES**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



1. Se optimizaron las diferentes técnicas utilizadas para la determinación de los marcadores de estrés oxidativo en el plasma seminal. Todas ellas presentaron una aceptable repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad y límite de detección. Consideramos la determinación de la SOD la técnica menos exacta, por presentar un límite de tolerancia del 16,5%. Queda demostrada la aplicabilidad de estas técnicas para la evaluación del estatus oxidativo en el plasma seminal de los pacientes sometidos al estudio de la infertilidad masculina.

2. El metal presente en mayor concentración en el plasma seminal de los varones de nuestro estudio es el Zn, seguido, con mucha diferencia por el Fe, el Se y el Cu. Los que se encuentran en menor concentración son el Hg y el Cd. Según nuestros resultados, los metales que se comportaron claramente como oxidantes son el Al, el Hg, el Ni y el Co ( $>0.4 \mu\text{g/L}$ ), como antioxidantes el Cu, el Fe, el Mn, el Se, el Zn y el Co ( $0,2 - 0,4 \mu\text{g/L}$ ), como modulador de la actividad antioxidante el Cd, y con carácter ambiguo el Cr, el Pb y el V. Todos ellos influyen en los parámetros seminales ya sea directa o indirectamente y, por tanto, en la calidad seminal.

3. Los varones de nuestra serie presentan unas concentraciones de antioxidantes en plasma seminal superiores a los descritos en la bibliografía en el caso de la SOD, la GPx y la vitamina B<sub>12</sub>, pero similares para el folato e inferiores para la vitamina C y la catalasa. Además, de los antioxidantes estudiados, los que demuestran de forma más directa su acción antioxidante en el plasma seminal son la SOD y la vitamina B<sub>12</sub>.

4. Existen diferencias en el estatus oxidativo entre los grupos de sujetos considerados en el presente estudio. En función de la calidad seminal, según los criterios de la OMS 1999, observamos que los varones que cumplen dichos criterios presentan mayor concentración de Mn, vitamina B<sub>12</sub> y SOD, pero menor de Ni. Además forman parte del grupo de varones que no han tenido hijos previamente ni han nacido en España. Aquellos sujetos con un REM mayor o igual a  $10 \times 10^6$ , es decir, que sus sémenes capacitan bien, presentan una mayor concentración de GPx y un mayor porcentaje de concentraciones de Co entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ . En cuanto a los grupos creados en función de la peroxidación lipídica, los varones sin lipoperoxidación en el plasma seminal se caracterizan por disponer de un mayor porcentaje de vitalidad espermática, concentración de Co menor de 0,2  $\mu\text{g/L}$ , Pb mayor a 0,2  $\mu\text{g/L}$ , y una concentración de V superior, pero de vitamina C y GPx inferior a los sujetos sin lipoperoxidación. También existe mayor lipoperoxidación entre los varones exfumadores.

5. De los hábitos de vida estudiados, los que influyen directamente en la calidad seminal son el país de nacimiento y la edad, con peores resultados en los varones nacidos en España y los más jóvenes. Hábitos como el consumo de tabaco, la realización de ejercicio físico y la frecuencia del consumo de determinados alimentos, influyen indirectamente aumentando los oxidantes y disminuyendo los antioxidantes en el plasma seminal. Finalmente, el consumo de drogas influye negativamente tanto directa como indirectamente en la morfología espermática.

6. Determinados parámetros del EO presentan valor diagnóstico predictivo para las principales características seminales tras la aplicación de un modelo logístico específico. Para conocer si el semen cumplirá con los criterios de la OMS 1999 se podrían utilizar como predictores el Ni y el Mn y se aplicaría el punto de corte de 0,75. Para predecir si el semen del varón presentará una buena capacitación ( $REM \geq 10 \times 10^6$ ) se podría utilizar la motilidad progresiva, el porcentaje de las formas normales y los niveles de la actividad GPx, y aplicaríamos el punto de corte de 0,533. Por último, para conocer la lipoperoxidación presente en el plasma seminal de los varones se determinaría la vitamina C y el Co y utilizaríamos como punto de corte 0,513.

7. En base a nuestros resultados proponemos un algoritmo diagnóstico para tratar de simplificar el estudio andrológico. Para conocer si un varón presentará un seminograma con los 4 parámetros más importantes dentro de los valores de referencia de la OMS 1999, bastaría con determinar en el plasma seminal el Ni y Mn como cribado o confirmación, sólo en el caso de obtener un valor mayor de 0,75 en el modelo logístico procedería realizar el seminograma para identificar los parámetros afectados. Si lo que queremos conocer es la lipoperoxidación presente, sería suficiente con determinar la vitamina C y el Co en plasma seminal. Y, por último, para saber si el semen capacitará bien y decidir qué tipo de TRA aplicar, conociendo la motilidad y la morfología, bastaría con determinar la GPx, y dejaríamos la capacitación sólo para el proceso de la técnica de reproducción asistida.

8. En el caso de que el varón presente estrés oxidativo, según los parámetros que se vean afectados podremos intervenir. Cuando el varón no cumpla los criterios de la OMS 1999, aconsejaremos el cese del consumo de drogas, mayor aporte de vitamina B<sub>12</sub>, y mayor práctica de ejercicio físico. Cuando lo que se pretenda sea mejorar la capacitación seminal aconsejaremos la práctica de ejercicio físico y mayor aporte vitamínico de B<sub>12</sub>. Por último, para disminuir la lipoperoxidación en el plasma seminal se deberá evitar el consumo de tabaco e incrementar el aporte de vitamina C.

9. El estrés oxidativo es causa directa o indirecta de alteraciones en los parámetros del semen, por lo que debería incorporarse su determinación al estudio andrológico de un varón con posible infertilidad. Pero es necesario un mayor conocimiento, una estandarización y simplificación de los métodos utilizados, y una propuesta de valores de referencia con los que poder trabajar.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



1. Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol* 2008; 25:84-8.
2. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2447-54.
3. Adelusi B, al-Twaijiri MH, al-Meshari A, Kangave D, al-Nuaim LA, Younnus B. Correlation of smoking and coffee drinking with sperm progressive motility in infertile males. *Afr J Med Med Sci* 1998; 27:47-50.
4. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
5. Agarwal A. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *Business briefing: US Kidney & Urological Disease* 2005; 122-5.
6. Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG. *Studies on men's health and fertility. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. New York: Humana Press; 2012 (a).
7. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol* 2012; 9(12):678-90 (b).
8. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(1):2-11.
9. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(6):616–27.
10. Agarwal A, Prabakaran SA. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iran J Reprod Med* 2005; 3:1-8 (a).
11. Agarwal A, Prabakaran SA, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006; 67:2-8.
12. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *J Androl* 2005; 26(6):654-60 (b).
13. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9(4):331-45.
14. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil (Camb)* 2010; 13(4):217-25.
15. Agarwal A, Sekhon LH. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: is it justified? *Indian J Urol* 2011; 27:74-85.
16. Aitken RJ, De Iuliis GN, Gibb Z, Baker MA. The simmet lecture: new horizons on an old landscape – oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reprod Domest Anim* 2012; 47(4):7-14.
17. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122(4): 497–506.

18. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 1(1):15-24.
19. Akinloye O, Arowojolu AO, Shittu OB, Anetor JI. Cadmium toxicity: A possible cause of male infertility in Nigeria. *Reprod Biol* 2006; 6(1): 17-30.
20. Aktan G, Dođru-Abbasođlu S, Kűcűkgergin C, Kadiođlu A, 20demirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2013; 99(5):1211-5.
21. Alabi NS, Whanger PD, Wu ASH. Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoa oxygen consumption and motility *in vitro*. *Biol Reprod* 1985; 33(4):911-9.
22. Alba LE, Monz3n G, Pel3ez LA, Quintero Y. Papel del estr3s oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19(3):202-5.
23. Alonso C. Causas gen3ticas de la infertilidad. Actualizaciones en el laboratorio cl3nico. Vol 3. Madrid: Asociaci3n Espa3ola de Biopatolog3a M3dica; 2008.
24. Anderson P, Gual A, Colon J. Alcohol y atenci3n primaria de la salud: informaciones cl3nicas b3sicas para la identificaci3n y el manejo de riesgos y problemas. Washington: OPS/OMS; 2008.
25. Angulo C, Maldonado R, Pulgar E, Mancilla H, C3rdova A, Villarroel F, et al. Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. *Biol Res* 2011; 44(2):169-80.
26. Aruldhas M, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, Akbarsha MA. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca Radiata Geoffroy*). *Hum Reprod* 2005; 20:2801-13.
27. Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. *Int J Biol Sci* 2012; 8(1):139-49 (a).
28. Atig F, Raffa M, Habib B, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urol* 2012; 12(6):1-8 (b).
29. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, J3rgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001; 16(12):2710-7.
30. Aydemir B. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biol Trace Elem Res* 2006; 112(3):193-203.
31. Badawy ZS, Chohan KR, Whyte DA, Penefsky HS, Brown OM, Soud AK. Cannabinoids inhibit the respiration of human sperm. *Fertil Steril* 2009; 91(6):2471-6.
32. Baker MA, Aitken RJ. The Importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 216(1-2):47-54.

33. Barber SJ, Parker HM, McDaniel CD. Broiler breeder. semen quality as affected by trace minerals *in vitro*. *Poult Sci* 2005; 84(1):100-5.
34. Barbosa KBF, Bressan J, Zulet MA, Martínez JA. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *An. Sist. Sanit. Navar* 2008; 31(3):259-80.
35. Bassas L. Exploración de la función testicular. *Endocrinol Nutr.* 2009; 56(1):18-31.
36. Benoff S, Centola GM, Millan C, Napolitano B, Marmar JL, Hurley IR. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum Reprod* 2003; 18(2):374-83 (a).
37. Benoff S, Hurley IR, Millan C, Napolitano B, Centola GM. Seminal lead concentrations negatively affect outcomes of artificial insemination. *Fertil Steril* 2003; 80(3):517-25 (b).
38. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Postprandial oxidative stress in exercise trained and sedentary cigarette smokers. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6(2):579-91.
39. Bonde JP. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl* 2010; 12(2):152-6.
40. Boxmeer JC, Smit M, Weber RF, Lindemans J, Romijn JC, Eijkemans MJ, et al. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. *J Androl* 2007; 28:4:521-7.
41. Braga DP, Halpern G, Figueira R de C, Setti AS, Iaconelli A, Borges E. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* 2012; 97(1):53-9.
42. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. *Rev Colomb de Obstet Ginecol* 2003; 54(4): 227-48.
43. Bruna I, Collado O, Prados F, Pérez G. El estudio básico de esterilidad desde el punto de vista de la medicina basada en la evidencia. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 2007; 24(3): 145-50.
44. Calvo ML, Velázquez C, Llorente MT, Izquierdo S. Valores de referencia del cobre en diferentes matrices. Revisión. Comisión de Elementos Traza. Comité Científico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 2013.
45. Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, et al. Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One* 2011; 6(2):1-11.
46. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010; 93(7):2222-31.
47. Chen HW, Kuo CT. Cotinine characterization and quality effect of sperm for smoking and nonsmoking students. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007; 79(1):11-4.

48. Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994; 39(5):292-8.
49. Chohan KR, Badawy SZ. Cigarette smoking impairs sperm bioenergetics. *Int Braz J Urol* 2010; 36(1):60-5.
50. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64:111-26.
51. Close CE, Roberts PL, Berger RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 1990; 144(4):900-3.
52. Cocho JA, Escanero JF, González JM. Elementos Traza: aspectos bioquímicos analíticos y clínicos. Barcelona: Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1998, 471-505.
53. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res* 2009; 29(2):82-8.
54. Collins JA, Burrows EA, Willan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril* 1995; 64:22-8.
55. Córdova A, Ruiz CG, Córdova CA, Córdova MS, Guerra JE, Rodríguez BE, et al. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2009; 3(1):1-38.
56. Crha I, Kralikova M, Melounova J, Ventruba P, Zakova J, Beharka R, Husicka R, et al. Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(9-10):533-8.
57. Cuquerella MD, Peinado I, Ruíz I, Mohand W, Mayoral S, Romeu A. Influencia de los factores ambientales en la generación de especies reactivas de oxígeno. Papel en la infertilidad humana. *Rev Iberoam Fert* 2003; 20(6):369-76.
58. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111(11):1448-54.
59. Danscher G, Hammen R, Fjerdingsstad E, Rebbe H. Zinc content of human ejaculate and the motility of sperm cells. *Int J Androl* 1978; 1:576-81.
60. Dapcich V, Salvador G, Ribas L, Pérez C, Aranceta J, Serra LI. Guía de la alimentación saludable. Madrid: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria; 2004.
61. Davi G, Falco A. Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus* 2005; 14(9):760-4.
62. Deulofeu R, Vilaseca MA, Pastor MC. Vitaminas. Vol.1 Vitaminas hidrosolubles. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC); 2005.
63. Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z, Krausz C. Guidelines on male infertility. Rotterdam: European Association of Urology; 2010.

- 
64. Domar AD, Clapp D, Slawsby EA, Dusek J, Kessel B, Freizinger M. Impact of group psychological interventions on pregnancy rates in infertile women. *Fertil Steril* 2000; 73:805-11.
  65. Duits FH, van Wely M, van der Veen F, Gianotten J. Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertil Steril* 2010; 94(4):1356-9.
  66. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007; 13:163-74.
  67. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 2006; 21(7):1725-33.
  68. Edwards RS. Principles and practice of assisted human reproduction. Brody S.A eds. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1995.
  69. Elejalde JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna* 2001; 18(6):326-35.
  70. Ellis NJ, Saboda K, O'Connor J, Nasca PC, Staner EJ, Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996; 11(2):406-12.
  71. El-Melegy NT, Ali MEM. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 2011; 37(4): 495-506.
  72. Espinosa O. Estrés oxidativo y expresión de proteínas relacionadas en enfermedades de alto riesgo cardiovascular: estudio especial de la hipertensión arterial. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis doctoral. Universitat de València. 2007.
  73. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics* 2011; 66(4):691-700.
  74. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease due to selected major risk factors. Chapter 12: Alcohol use. Vol 1. Geneva: World Health Organization; 2004.
  75. Farias P, Echavarria M, Hernandez-Avila M, Villanueva C, Amarasiriwardena C, Hernandez L, et al. Bone, blood and semen lead in men with environmental and moderate occupational exposure. *Int J Environ Health Res* 2005; 15(1):21-31.
  76. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod* 2012; 27(11):3140-9.
  77. Fernández B. Fundamentos de reproducción asistida para enfermería. Unidad de Reproducción Asistida. Alicante: Clínica Vistahermosa; 2005.
  78. Figà-Talamanca I, Traina ME, Urbani E. Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med* 2001; 51(3):174-88.
-



79. Fontes J, Martínez L, Calderón MA, Castilla JA, Clavero A, Gonzalvo MC et al. Estudio básico de esterilidad. Programa de formación continuada a distancia. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA); 2008.
80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (FAO/WHO). Human vitamin and mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand. Rome: Food and Nutrition Division; 2001.
81. Franco M, Vivo JM. Análisis de curvas Roc. Principios básicos y aplicaciones. Ed La Muralla, S.A. 2007.
82. Frías S, Díaz C, Conde JE, Pérez Trujillo JP. Selenium and mercury concentrations in sweet and dry bottled wines from the Canary Islands, Spain. Food Addit Contam 2003; 20(3):237-40.
83. Gallardo JM. Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. Rev Invest Clín 2007; 59(1):42-7.
84. García J, Carriazo AM, Aldana JM. Guía de reproducción humana asistida en el servicio andaluz de salud. Granada: Dirección General de Asistencia Sanitaria. Subdirección de Programas y Desarrollo; 2006.
85. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J Androl 2004; 6(1):59-65.
86. Gaur DS, Talekar M, Pathak VP. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. Singapore Med J 2007; 48(2):119-23.
87. Giudice LC. Infertility and the environment: the medical context. Semin Reprod Med 2006; 24(3):129-33.
88. González JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 2ª Edición. Barcelona: Masson; 2004.
89. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991; 196:143-52.
90. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular Injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. Circulation 2003; 108(16):1912-6.
91. Grunberg NE, Popp KA, Winders SE. Effects of nicotine on body weight in rats with access to "junk" foods. Psychopharmacology 1988; 94(4):536-9.
92. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. Fertil Steril 1998; 70(2):207-13.
93. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. Nat Rev Urol 2013; 10(1):26-37.
94. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. Int Braz J Urol 2012; 38(5):576-94.

- 
95. Hammiche F, Laven JSE, Twigt JM, Boellaard WPA, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RP. Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod* 2012; 27(8):2365-72.
  96. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 2008; 90(4):897-904 (a).
  97. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; 90(6):2222-5 (b).
  98. Hassan A, Abo-Azma SM, Fayed SM, Mostafa T. Seminal plasma cotinine and insulin-like growth factor-I in idiopathic oligoasthenoteratozoospermic smokers. *BJU Int* 2009; 103(1):108-11.
  99. Hou CC, Lin H, Chang CP, Huang WT, Lin MT. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. *Eur J Pharmacol* 2011; 667(1-3):6-12.
  100. Hovatta O, Venalainen E, Kuusimäki L, Heikkilä J, Hirvi T, Reima I. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum Reprod* 1998; 13(1):115-9.
  101. Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci* 2006; 2(1):23-9.
  102. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, Lee YS, Tsai HD, Lin CS. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J Clin Lab Anal* 2002; 16(3):127-31.
  103. Huang MC, Chen CH, Peng FC, Tang SH, Chen CC. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. *J Formos Med Assoc* 2009; 108(7):560-9.
  104. Huang YL, Tseng WC, Lin TH. *In vitro* effects of metal ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) on sperm motility and lipid peroxidation in human semen. *J Toxicol Environ Health A* 2001; 62(4):259-67.
  105. Ibrahim M, Hassan W, Meinerz DF, Leite O, Nogueira CW, Rocha JB. Ethanol-induced oxidative stress: the role of binaphthyl diselenide as a potent antioxidant. *Biol Trace Elem Res* 2012; 147(1-3):309-14.
  106. Instituto Nacional de Estadística (INE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Consumo de Drogas. Madrid: Gobierno de España; 2009. <http://www.ine.es>.
  107. Jain A, Agrawal BK, Varma M, Jadhav AA. Antioxidant status and smoking habits: relationship with diet. *Singapore Med J* 2009; 50(6):624-7.
  108. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; 82(4):863-70.
-

109. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *European Urology* 2012; 62:324-32.
110. Keck C, Bramkamp G, Behre HM, Muller C, Jockenhovel F, Nieschlag E. Lack of correlation between cadmium in seminal plasma and fertility status of nonexposed individuals and two cadmium exposed patients. *Reproductive Toxicology* 1995; 9:35-40.
111. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol* 2007; 7:6.
112. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, et al. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res* 2007; 120(1-3):82-91.
113. Kruger TF, Franken DR. *Atlas of human sperm morphology evaluation*. London: Taylor and Francis; 2004.
114. Kruger TF, Oehninger SC. *Male infertility. Diagnosis and treatment*. London: Informa Healthcare; 2007.
115. Kumar S, Sathwara NG, Gautam AK, Agarwal K, Shah B, Kulkarni PK, et al. Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium. *J Occup Health* 2005; 47(5):424-30.
116. Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and  $Ca^{2+}$ -ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem* 2008; 41(14-15):1199-203.
117. Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003; 79(2):287-91.
118. Kvist U, Björndahl L. *ESHRE monographs: manual on basic semen analysis*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2002.
119. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011; 95(1):116-23.
120. Li Y, Lin H, Ma M, Li L, Cai M, Zhou N, et al. Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. *Hum Reprod* 2009; 24(2):459-69.
121. Lipshultz LI, Howards SS, Niederberger CS. *Infertility in the male*. 4th Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
122. Liu RZ, Gao JC, Hang HGZ, Ang RXW, Zhang ZH, Liu XY. Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. *J Int Med Res* 2010; 38(3):923-8.

- 
123. López L, Fernández LM, González M, Cuadrado MA. Elementos traza y ultratrazas. Taller del laboratorio clínico. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; 2008.
124. Louhelainen N, Ryttilä P, Haahtela T, Kinnula VL, Djukanović R. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med* 2009; 9:25.
125. Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, et al. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci* 2005; 118(20):4393-404.
126. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16(3):293-311.
127. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129(4):357-67.
128. Mallok A; Flores-Sánchez RM, Alonso-Rodríguez CA, Martínez-Sánchez G. Desbalance redox en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Farmacia* 2011; 45:283-96.
129. Martínez R. Obesidad e infertilidad en el varón. Actualizaciones en el laboratorio clínico. Vol 1. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; 2011.
130. Martini AC, Molina RI, Estofán D, Senestrari D, de Cuneo MF, Ruiz RD. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril* 2004; 82(2):374-7.
131. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P. Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. *Folia Biol* 2012; 58(1):7-15.
132. Massnyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalick M, Kornekov B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J Androl* 2003; 5(2):101-4.
133. Matorras R, Hernandez J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.
134. Mayo Medical Laboratories. Mayo Clinic.  
<http://www.mayomedicallaboratories.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/60296>.
135. McLachlan RI, de Kretser DM. Male infertility: the case for continued research. *Med J Aust* 2001; 174(3):116-7.
136. Meeker JD, Rossano MG, Protas B, Diamond MP, Puscheck E, Daly D, et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008; 116(11):1473-9.
-

137. Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juárez N, Martínez-García MJ, García-Sánchez A, et al. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health* 2011; 10(1):6.
138. Merino G, Lira SC, Martinez-Chequer JC. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Androl* 1998; 41(1):11-5.
139. Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, Roca M, López-Espín JJ, Guillén JJ, Moreno JM, et al. Correlations between different heavy metals in diverse body fluids: studies of human semen quality. *Adv Urol* 2012.
140. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. *Adv Urol* 2012.
141. Morgan DJ, Muller CH, Murataeva NA, Davis BJ, Mackie K.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) attenuates mouse sperm motility and male fecundity. *Br J Pharmacol* 2012; 165(8):2575–83.
142. Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium–vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int J Gen Med* 2011; 4:99-104.
143. Murawski M, Saczko J, Marcinkowska A, Chwiłkowska A, Gryboś M, Banaś T. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(1):123-6.
144. Murphy LE, Mills JL, Molloy AM, Qian C, Carter TC, Strevens H, et al. Folate and vitamin B12 in idiopathic male infertility. *Asian J Androl* 2011; 13(6):856-61.
145. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (NCCWCH). Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. London: National Institute for Clinical Effectiveness, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Press; 2004.
146. Observatorio Español sobre Drogas (OED). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España. Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES). 2009. [http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES\\_2009.pdf](http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES_2009.pdf).
147. Okonofua F, Menakaya U, Onemu SO, Omo-Aghoja LO, Bergstrom S. A case-control study of risk factors for male infertility in Nigeria. *Asian J Androl* 2005; 7(4):351-61.
148. Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K. Selenium in human male reproductive organs. *Hum Reprod* 1998; 13(8):2172-6.
149. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M, et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4):485-92.
150. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de laboratorio para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Organización Mundial de la Salud (OMS). 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A; 2001.

- 
151. Overstreet JW, Coats C, Katz DF, Hanson FW. The importance of seminal plasma for sperm penetration of cervical mucus. *Fertil Steril* 1980; 34(6):569-72.
  152. Ozgur K, Isikoglu M, Seleker M, Donmez L. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 271(2):109-12.
  153. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1):158-69.
  154. Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Borges E, Sobreiro BP, Pasqualotto EB. Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2008; 90(2):278-83.
  155. Pereira ML, Pires-das-Neves R, Oliveira H, Margarida-Santos T, Pedrosa-de-Jesus J. Effect of Cr(V) on reproductive organ morphology and sperm parameters: an experimental study in mice. *Environ Health* 2005; 4(9):1-6.
  156. Povey AC, Clyma JA, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Pacey AA, et al, Participating Centres of Chaps-uk. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Hum Reprod* 2012; 27(9):2799-806.
  157. Queiroz EKR, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad. Saúde Pública* 2006; 22(3):485-93.
  158. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007; 22(1):188-96 (a).
  159. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007; 165(12):1372-9 (b).
  160. Rantala ML. Causes and outcome of infertility in previously unexamined couples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988; 67(5):429-32.
  161. Ravnborg TL, Jensen TK, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Hum Reprod* 2011; 26(5):1000-11.
  162. Rengan AK, Agarwal A, van der Linde M, du Plessis SS. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10:92.
  163. Rodrigo R. Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. New York: Nova Biomedical Books; 2009.
  164. Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30:36-44.
  165. Rossato M, Ion F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):984-91.
-

166. Rubes J, Lowe X, Moore D, Perreault S, Slott V, Evenson D, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 1998; 70(4):715–23.
167. Ruiz A, Gutiérrez A. Capacitación espermática. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)*. *Cont Lab Clín* 2011; 15:11-21.
168. Saaranen M, Suistomaa U, Kantola M, Saarikoski S, Vanha-Perttula T. Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: comparison with semen parameters and fertility. *Hum Reprod* 1987; 2(6):475-9.
169. Safarinejad MR, Safarinejad S. The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. *Asian J Androl* 2012; 14(4):514–5.
170. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 23(6):737-52.
171. Sánchez I, Mar C, Castilla JA, Marcos M, Martín I, Galán A, et al. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. Barcelona: Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)*; 2009.
172. Sanocka D, Kurpysz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2(12):1-7.
173. Saradha B, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21(1):34-41.
174. Sarafian TA, Magallanes JAM, Shau H, Tashkin DP, Roth MD. Oxidative stress produced by marijuana smoke. An adverse effect enhanced by cannabinoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(6):1286-93.
175. Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 2000; 15(6):1314-21.
176. Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, et al. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys* 2010; 47(1): 38-43.
177. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4):529-36.
178. Shinohara A, Chiba M, Takeuchi H, Kinoshita K, Inaba Y. Trace elements and sperm parameters in semen of male partners of infertile couples. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 2005; 60(4):418-25.
179. Shiraishi K, Takihara H, Matsuyama H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World J Urol* 2010; 28(3):359-64.
180. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem* 2011; 44(4):319-24.

181. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. Study for future families research group. *Environ Health Perspect* 2003; 111(4):414–20.
182. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostaza T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 2012; 80(4):822-5.
183. Tavilani H, Goodarzi MT, Vaisi-raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int Braz J Urol* 2008; 34(4):485-91.
184. Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Boris R. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000; 108(1):45-53.
185. Thonneau P, Marchand E, Tallec A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French region (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6(6):811-6.
186. Toro-Montoya AI. Espermograma. *Medicina & Laboratorio* 2009; 15:149-69.
187. Tortolero I, Arata G, Osuna CJ, Gómez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. *Rev Venez Endocrinol Metabol* 2005; 3:12-9.
188. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14(3):243–58.
189. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod* 2002; 17(6):1554-9.
190. Vujkovic M, Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, et al. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2009; 24(6):1304-12.
191. Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergère M, Lombroso R, et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intruterine insemination. *Hum Reprod* 2004; 19(9):2060-5.
192. Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN and Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 2001; 75(2):252-9.
193. Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1):31-44.
194. Whan LB, West MCL, McClure N, Lewis SEM. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function *in vitro*. *Fertil Steril* 2006; 85(3):653-60.
195. Whichelow MJ, Golding JF, Treasure FP. Comparison of some dietary habits of smokers and non-smokers. *Br J Addict* 1988; 83(3):295-304.



196. World Health Organization. WHO laboratory manual of examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
197. World Health Organization. WHO Manual for standardized investigation and diagnosis and management of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2000 (a).
198. World Health Organization. WHO Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO; 2000 (b).
199. World Health Organization. Reproductive health indicators for global monitoring: guidelines for their generation, interpretation and analysis for global monitoring. Geneva: WHO; 2006.
200. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva: WHO; 2010.
201. Willett WC. Nutritional Epidemiology. 2nd edn. Boston: Oxford University Press; 1998.
202. Wong EWP, Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(5):290-9.
203. Xu DX, Shen H.M, Zhu Q.X, Chua L, Wang Q.N, Chia S.E, Ong C.N. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003; 534(1-2):155-63.
204. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. on behalf of ICMART and WHO. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. *Hum Reprod* 2009; 24(11):2683-7.
205. Zelen I, Mitrović M, Jurišić-Škevin A, Arsenijević S. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med Pregl* 2010; 63(9-10):624-9.
206. Zemanová J, Lukác N, Massányi P, Trandzík J, Burócziová M, Nad P, et al. Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 54(6):281-6.







**ANEXOS**

---

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



# ANEXO I

 **GENERALITAT VALENCIANA**  
**CONSELLERIA DE SANITAT**  
**HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARI**  
**D'ELX**

## PETICIÓN SEMINOGRAMA

Etiqueta Varón

Etiqueta Mujer

Seminograma Remitir a .....

Semen Capacitado Fdo. ....

Estudios Especiales .....

Observaciones: .....

### Datos Capitación

Fecha: (Día/mes/año):

#### ANÁLISIS PREVIO:

Volumen

Viscosidad

Recuento Total (millones/ml)

MR/ML (Millones/ml)

#### METODO DE CAPACITACIÓN:

Swim-Up

Gradientes

**RESULTADOS: REM** ..... Millones Volumen capacitado: ..... ml.

#### OBSERVACIONES:

Responda a las preguntas del siguiente cuestionario. Esta información es importante para interpretar los resultados.

Nombre y Apellidos .....

Fecha ..... Hora de la eyaculación ..... Hora de la entrega .....

¿Ha recogido todo el semen? .....

Días de abstinencia sexual sin eyacular .....

¿Ha sufrido alguna enfermedad, o ha experimentado fiebre (más de 38° C) durante los últimos tres meses? ..... (Explique) .....

¿Ha tomado algún medicamento durante los últimos dos meses? .....

Observaciones .....

Cod. 13973

## ANEXO II

### INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE SEMEN.

- Guarde abstinencia sexual antes del análisis, entre 3-5 días.
- Antes de recoger el semen realice el aseo de la zona genital con agua y jabón.
- El semen ha de recogerse por masturbación. No es válida la recogida con preservativo. El recipiente debe ser estéril.
- Acuda al laboratorio para que le proporcionen un recipiente estéril y diríjase a los aseos públicos en la Primera Planta del Hospital (junto a Solarium), donde podrá hacer la recogida.
- Es esencial recoger **TODO** el semen de la eyaculación. Cierre bien el recipiente.
- No debe transcurrir mas de 45 minutos entre la obtención de la muestra y la entrega.
- La muestra debe de ser entregada en el laboratorio (planta semisótano) el día acordado.
- Durante el transporte es aconsejable llevar el frasco cerca del cuerpo y no someterlo a temperaturas extremas.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ANEXO III

## HOJA DE TRABAJO: SEMINOGRAMA

NOMBRE MUJER  
FECHA DE NACIMIENTO  
EDAD  
Nº DE HISTORIA  
Nº TELÉFONO

NOMBRE VARÓN  
FECHA DE NACIMIENTO  
EDAD  
Nº DE HISTORIA  
Nº TELÉFONO

DIAGNÓSTICO					
FECHA					
PRUEBA SOLICITADA					
Nº LABORATORIO					
DATOS PREANALÍTICOS					
ABSTINENCIA					
¿RECOGIDO TODO EL SEMEN?					
HORA DE EYACULACIÓN					
HORA DE ENTREGA					
ANTECEDENTES QUIRÚRGICOS					
PATOLOGÍA FEBRIL RECIENTE					
FÁRMACOS					
CARACTERES FÍSICOS					
ASPECTO					
LIQUEFACCIÓN					
VISCOSIDAD					
VOLUMEN					
PH					
RECUESTO ESPERMÁTICO					
RECUESTO					
MOTILIDAD					
PROGRESIVA RÁPIDA					
PROGRESIVA LENTA					
NO PROGRESIVA					
INMÓVILES					
LEUCOCITOS					
CELAS ESPERMATÓGENESIS					
MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA					
FORMAS NORMALES					
FORMAS ANORMALES					
ANOMALÍAS DE CABEZA					
ANOMALÍAS DE P. INTERMEDIA					
ANOMALÍAS DE COLA					
ÍNDICE DE TARATOZOOSPERMIA					
VITALIDAD ESPERMÁTICA					
FORMAS VIVAS					
FORMAS MUERTAS					
INTEGRIDAD DE MEMBRANA (HOST)					
EXAMEN INMUNOLÓGICO					
AGLUTINACIÓN					
MAR TEST					
EXAMEN BIOQUÍMICO					
FRUCTOSA					
ÁCIDO CÍTRICO					
ESTUDIO DE CAPACITACIÓN					
RECUESTO ESPERMÁTICO					
VOLUMEN CAPACITADO					
REM					



## ANEXO IV

# IMPLICACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ESTERILIDAD MASCULINA: CUESTIONARIO PARA EL PACIENTE

## DATOS PERSONALES

Número de muestra: \_\_\_\_\_  
Fecha de cumplimentación: \_\_\_\_\_  
Iniciales: \_\_\_\_\_  
Número de Historia: \_\_\_\_\_  
Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

## I. DATOS CLÍNICOS

1. ¿CUÁNTOS AÑOS HA TRATADO DE CONCEBIR SIN ÉXITO?

Menos de 2 años       2-5 años       Más de 5 años

2. ¿HA TENIDO HIJO/S CON OTRA PAREJA?

Si       No

3. ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

a. Peso: \_\_\_\_\_

b. Altura: \_\_\_\_\_

4. ENFERMEDADES:

a. ¿Padece alguna enfermedad crónica de tipo diabetes, anemia, insuficiencia renal, prostatitis, etc.?

Si       No

b. ¿Cuál? \_\_\_\_\_

c. ¿Ha padecido alguna enfermedad recientemente (3 meses)?

Si       No

d. ¿Cuál/es? \_\_\_\_\_

e. ¿Y ha tenido fiebre (p.ej gripe...) en los últimos 3 meses?

Si  No

f. ¿Ha sufrido infecciones genito-urinarias en los últimos 3 meses?

Si  No

## 5. FÁRMACOS:

a. ¿Ha tomado algún fármaco durante los 2 últimos meses? Si  No

- ¿Cuál/es? \_\_\_\_\_
- ¿Durante cuánto tiempo? \_\_\_\_\_
- ¿Qué dosis? \_\_\_\_\_

b. ¿Y vasodilatadores? Si  No

- ¿Cuál/es? \_\_\_\_\_
- ¿Durante cuánto tiempo? \_\_\_\_\_
- ¿Qué dosis? \_\_\_\_\_

## II. HÁBITOS DE VIDA

### 6. DÉFICIT DIETÉTICOS:

#### a. Consumo de Frutas y Verduras:

¿Ingiere...:

- Limón como complemento al menos 2 veces a la semana? Si  No
- Naranja 2/3 veces en semana? Si  No
- Tomate 3 o más veces por semana? Si  No
- Kiwi al menos 1 vez a la semana? Si  No

¿Toma...?

- Zanahoria al menos 2 veces a la semana? Si  No
- Calabaza, calabacín al menos 1 vez por semana? Si  No
- Brócoli, espinacas y/o hortalizas de hoja verde al menos 2 veces a la semana? Si  No

**b. Consumo de Huevo, Carnes y Lácteos:**

¿Forma parte de su alimentación...

- Huevo 4 veces por semana? Si  No
- Carne 2/3 veces a la semana? Si  No
- Leche 1-2 vasos diariamente? Si  No
- Queso al menos 3 veces en semana? Si  No

**c. Consumo de Aceites y Frutos secos:**

- ¿Ingieres aceites vegetales (aceite de girasol, de nueces, de sésamo, de soja, o margarina) diariamente? Si  No
- ¿Y aceite de oliva diariamente? Si  No
- ¿Ingieres avellanas, nueces, almendras al menos 1 vez por semana?  
Si  No

**d. ¿Ha seguido algún complejo vitamínico en los últimos 2 meses?**Si  No 

¿Cuál? \_\_\_\_\_

**e. ¿Y ha tomado algún concentrado dietético en los últimos 2 meses?**Si  No 

¿Cuál? \_\_\_\_\_

**7. CONSUMO DE TÓXICOS:****a. Tabaco**- ¿Fuma? Si  No 

- Para personas que fuman:

• ¿A qué edad comenzó a fumar? \_\_\_\_\_

• ¿Fuma diariamente? Si  No 

• ¿Cuántos fuma al día?

Menos de 10  10-20  más de 20 

- Para personas que no fuman actualmente, pero han fumado antes:

• ¿A qué edad comenzó a fumar? \_\_\_\_\_

• ¿Cuánto tiempo hace que dejó de fumar?

Menos de 1 año

1-5 años

Más de 5 años

- ¿Cuántos fumaba al día en la última etapa aproximadamente?

Menos de 10

10-20

Más de 20

- ¿Acostumbra a estar en ambientes cargados de humo de tabaco?

Si

No

#### b. Alcohol

- ¿Ha bebido con frecuencia bebidas alcohólicas en los últimos 3 meses?

Si

No

- Si ha contestado que sí, especifique la frecuencia:

A diario

Fines de semana

Esporádicamente

- ¿Qué cantidad ingería en cada toma? \_\_\_\_\_

#### c. Drogas

- ¿Consume o ha consumido algún tipo de droga?

Cannabis

Anfetaminas

Alucinógenos

Cocaína

Otras

- ¿En los últimos tres meses? Si  No

- ¿Con qué frecuencia?

Diaria

Semanal

Esporádicamente

#### 8. SEDENTARISMO:

- a. ¿Realiza ejercicio físico? Si  No

- b. ¿De qué tipo?

Andar aproximadamente 1 hora al día

Gimnasio

Deporte intenso al aire libre, en equipo...

Otros ¿Cuál? \_\_\_\_\_

c. ¿Con qué frecuencia?

- Diaria
- Cada 2-3 días
- Semanal
- Esporádicamente

### III. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

9. RAZA: Blanca  Negra  Asiática

10. PAÍS DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_

11. PROFESIÓN:

a. ¿Cuál es su profesión? \_\_\_\_\_

b. ¿Su profesión/puesto de trabajo conlleva estrés laboral? Si  No

c. En caso afirmativo, el nivel de estrés es:

Leve  Moderado  Intenso

d. ¿Su profesión o puesto de trabajo conlleva estar en contacto con pesticidas, plaguicidas, sustancias químicas, desinfectantes, pinturas, fundiciones, productos industriales, u otro tipo de sustancias tóxicas?

Si  No

o ¿Qué tipo de sustancia? \_\_\_\_\_

o ¿Con qué frecuencia está en contacto con esa sustancia?

Diaria  Semanal  Mensual

o ¿Cómo es la exposición a esa sustancia?

Por inhalación

Por contacto directo

## IV. DATOS AMBIENTALES

12. **LUGAR DE RESIDENCIA** (Nombre del pueblo/ciudad): \_\_\_\_\_

13. **¿DÓNDE TIENE SU DOMICILIO?**

- En el campo/ medio rural
- En un pueblo o ciudad de tamaño medio (Crevillente, Santa Pola, Torrellano...)
- En una gran ciudad (Elche)

14. **¿CERCA DE SU HOGAR HAY ALGUNA INDUSTRIA QUE TRABAJE CON PRODUCTOS TÓXICOS?**

Si  No

15. **¿ESTÁ EN CONTACTO CON ALGUNA DE ESTAS SUSTANCIAS?:**

Pesticidas, plaguicidas, desinfectantes, sustancias químicas, desinfectantes, pinturas, fundiciones, productos industriales, u otro tipo de sustancias tóxicas...

Si  No

a. ¿Qué tipo de sustancia? \_\_\_\_\_

b. ¿Con qué frecuencia está en contacto con esa sustancia?

Diaria  Semanal  Mensual

c. ¿Cómo es la exposición a esa sustancia?

- Por inhalación
- Por contacto directo

## ANEXO V

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS DE SEMEN PARA INVESTIGACIÓN Y APLICACIÓN CLÍNICA

D. ....  
como donante, de ..... años de edad, con domicilio en .....  
..... DNI nº .....

#### DECLARO:

Que el/la Dr./Dra....., me ha explicado que:

#### 1.- Identificación, descripción y objetivos del procedimiento.

El Hospital General Universitario de Elche realiza investigaciones para estudiar aspectos bioquímicos relacionados con la fertilidad humana a través de la colaboración entre los Servicios de Ginecología y Obstetricia y el Servicio de Análisis Clínicos.

Los resultados derivados de dichos proyectos de investigación pueden incluir el descubrimiento, testado o producción de medicinas y métodos para el mejor diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina.

El procedimiento que se me propone consiste en donar voluntariamente una muestra de semen, para ser utilizado en proyectos de investigación de aplicación clínica. En algunos tipos de estudios es necesario el material biológico de individuos sanos sin antecedentes que sirven de control. Este es el motivo por el que se me solicita una muestra.

#### 2.- Beneficios que se espera alcanzar

Yo no recibiré ninguna compensación económica ni otros beneficios por donar mi semen sin embargo si las investigaciones tuvieran éxito, podría ayudar en el futuro a parejas con problemas de fertilidad.

Las muestras de semen o sus derivados no serán vendidos o distribuidos a terceros con fines comerciales pero los costes logísticos se cubrirán sobre una base sin ánimo de lucro.

#### 3.- Alternativas razonables

La decisión de donar mi semen es totalmente voluntaria, pudiendo negarme a donarla e incluso pudiendo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación.

#### 4.- Consecuencias previsibles de su realización y de la no realización

Si decido libre y voluntariamente donar mi semen, tendré derecho a decidir ser o no informado de los resultados de la investigación, si es que ésta se lleva a cabo.

#### 5.- Riesgos frecuentes y poco frecuentes

La donación de semen nunca supondrá un riesgo adicional para mi salud.

#### 6.- Riesgos y consecuencias en función de la situación clínica personal del paciente y con sus circunstancias personales o profesionales .....

.....

#### 7.- Protección de datos personales y confidencialidad.

La información sobre mis datos personales y de salud será incorporada y tratada en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria.

La cesión a otros centros de investigación o a compañías farmacéuticas de mis muestras de tejidos o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a mi estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación por el que se generará un código de identificación que impida que se me pueda identificar directa o indirectamente.

Asimismo, se me ha informado que tengo la posibilidad de ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, en los términos previstos en la normativa aplicable.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presto, la parte de las muestras de semen que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida y no será utilizada en ninguna investigación después de la fecha en que haya retirado mi consentimiento, si bien, los datos obtenidos de mis muestras hasta ese momento seguirán formando parte de la investigación.

### **Yo entiendo que:**

Mi donación es voluntaria, y que puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Otorgo mi consentimiento para que la Fundación u otros centros de investigación o compañías farmacéuticas utilicen mis datos y las muestras de semen, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones médicas, manteniendo siempre mi anonimato y la confidencialidad de mis datos.

La información y el presente documento se me han facilitado con suficiente antelación para reflexionar con calma y tomar mi decisión libre y responsablemente.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

### Observaciones:

.....  
 .....  
 .....

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y en tales condiciones estoy de acuerdo y **CONSIENTO DONAR VOLUNTARIAMENTE UNA MUESTRA DE SEMEN PARA INVESTIGACIÓN.**

En ..... de ..... de 200...

Firma del paciente

Firma de un testigo  
DNI:

Firma del médico

Fdo.: .....

Fdo.:.....

Fdo.:.....

(Nombre y dos apellidos)

(Nombre y dos apellidos)

(Nombre y dos apellidos)



**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN  
VOLUNTARIA DE  
SEMEN PARA INVESTIGACIÓN**

D./D<sup>a</sup> .....  
como paciente (o representante del paciente  
D.....), de .....  
años de edad, con domicilio en  
.....  
..... DNI. n<sup>o</sup>  
..... Revoco el consentimiento prestado en  
fecha....., que doy con esta fecha por finalizado, sin tener  
que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

En ..... de ..... de 200...

Firma del paciente

Firma de un testigo  
DNI:

Firma del médico

Fdo.: .....  
(Nombre y dos apellidos)

Fdo.: .....  
(Nombre y dos apellidos)

Fdo.: .....  
(Nombre y dos apellidos)

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante