



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

INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA INFERTILIDAD EN UN  
GRUPO DE ESTUDIANTES VARONES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE,  
NÚCLEO SUCRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

ANGGE MARIEL ESTRADA PETRIGLIA

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

CUMANÁ, 2013

INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA INFERTILIDAD EN UN  
GRUPO DE ESTUDIANTES VARONES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE,  
NÚCLEO SUCRE

APROBADO POR:

---

Profa. Raquel Salazar  
Asesor

---

Prof. Aníbal Lobo  
Coasesor

---

Profa. Gilda Millán  
Jurado

---

Prof. Henry De Freitas  
Jurado

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA .....	9
Población.....	9
Criterios de exclusión.....	9
Lavado del material.....	10
Obtención de muestras seminales.....	10
Determinación de la calidad espermática.....	10
A. Examen macroscópico del semen.....	11
Viscosidad.....	11
Aspecto.....	11
Licuefacción.....	11
Volumen.....	11
pH.....	11
B. Examen microscópico del semen.....	12
Directo.....	12
Movilidad espermática.....	12
Vitalidad espermática.....	13
Concentración espermática.....	13
Tinción de peroxidasa.....	14
Obtención del plasma seminal.....	15
Determinación de óxido nítrico (ON).....	15
Determinación de tioles totales (TT).....	16
Determinación de glutatión (GSH).....	16

Determinación de metalotioninas (MTS).....	17
Extracción y separación de las MTS .....	17
Cuantificación de MTS .....	17
Análisis estadístico .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES .....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
APÉNDICE .....	40
ANEXOS.....	52
HOJA DE METADATOS.....	55

## DEDICATORIA

A

Dios, por darme más de una oportunidad; proveerme fortaleza, sabiduría y dirección a mi vida, acompañarme en todo momento, sin que se agotaran mis fuerzas.

Mis padres, Elías Simón Estrada Albarrán y Lisvia del Rosario Petriglia Salazar, por su gran amor, confianza en mí, por todo lo que me han dado en esta vida; gracias por sus sabios consejos y por estar siempre a mi lado, ustedes fueron la fortaleza de cada día.

Mi esposo Juan Carlos Cabello Cova, por su gran apoyo y paciencia para la conclusión de esta meta.

Mi hermoso hijo, Giancarlo Elias Cabello Estrada, el regalo más grande y maravilloso de mi vida; mi motor de vida.

Mis hermanos, quienes me acompañaron en silencio con una comprensión a prueba de todo. A mi linda y conservada familia, abuelos, tíos y primos.

Todas las personas maravillosa que me rodearon en esta gran experiencia.

## AGRADECIMIENTOS

A

Mis compañeras de proyecto y grandes amigas: Georgina Basmadji, Mariela Chelhod, Andreína Martínez, Marian Martínez, Diorelis González por acompañarme y tener su apoyo y confianza en todo momento.

Al profesor Aníbal Lobo, responsable de este macro proyecto, por permitirme formar parte de su novedoso y gran proyecto y brindarme sus conocimientos oportunamente.

Mi profesora y amiga Raquel Salazar; mi asesora experimental, gracias por todo su apoyo y sabios consejos fueron fortaleza para la conclusión de este trabajo de grado.

La profesora Evelin Flores, por su asesoramiento fundamental y estadístico en la realización de este trabajo de grado.

La profesora Mairín Lemus, por su asesoramiento científico y fundamental que contribuyeron en la realización del estudio experimental.

La profesora Luisa Rojas, por su asesoramiento químico, que contribuyeron en la realización del estudio experimental.

La licenciada Aridays Olivero, por su colaboración es la estandarización de métodos.

Todos los estudiantes que formaron parte de este proyecto de investigación y dieron su aporte a la ciencia.

¡Gracias!

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución por edad de estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009. ....	19
Tabla 2. Clasificación de la calidad espermática en relación con las alteraciones detectadas en el espermatograma de estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. 2009.....	20
Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas del espermatograma de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009. ...	21
Tabla 4. Concentraciones de óxido nítrico en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.....	22
Tabla 6. Concentraciones de glutatión en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.....	23
Tabla 7. Concentraciones de metalotioninas en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.....	24
Tabla 8. Asociación de los niveles de óxido nítrico y tioles totales en individuos normozoospermicos, astenozoospermicos, oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.....	25
Tabla 9. Asociación de los niveles de glutatión y metalotioninas en individuos normozoospermicos, astenozoospermicos, oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009. ...	27

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la concentración de óxido nítrico y la motilidad espermática en estudiantes normozoospermicos .....	26
Figura 2. Relación entre la concentración de tioles totales y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos .....	27
Figura 3. Relación entre la concentración de glutatión y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos. ....	28

## RESUMEN

Se evaluó la calidad espermática y el estrés oxidativo en plasma seminal, en un grupo de 100 estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. A cada participante se le tomó muestra de sangre por punción venosa y se recolectó muestra de líquido seminal. En el estudio, el 68,00% de los estudiantes fueron normozoospermicos y la calidad espermática resultó estar afectada en el 32,00% de la población estudiada, clasificándose en individuos que presentaron astenozoospermia, oligozoospermia y oligoastenozoospermia, obteniéndose como frecuencias 12,00%, 11,00% y 9,00%, respectivamente. La edad promedio en los estudiantes normozoospermicos y con astenozoospermia, oligozoospermia y oligoastenozoospermia fue de  $24,12 \pm 4,49$ ;  $24,83 \pm 7,22$ ;  $20,91 \pm 2,34$  y  $25,44 \pm 9,25$ , respectivamente. Las variables tiempo de licuefacción, volumen, pH y morfología se encontraron dentro de los valores de referencia, según valores establecidos por la OMS. Las células peroxidasa positiva tuvieron un valor promedio de 0,05 millones/ml, resultando no significativa, por ser su valor inferior a 1 millón/ml. La producción de óxido nitroso (ON), tioles totales (TT), concentración de glutatión (GSH) y concentración de metalotioninas (MTS) fueron medidas mediante métodos espectrofotométricos. Al aplicar el análisis de varianza para metalotioninas, se demostró que existían diferencias significativas entre los valores de concentración de MTS en los grupos estudiados, el análisis *a posteriori* demostró que se formaban dos grupos superpuestos: uno entre los individuos astenozoospermicos, normozoospermicos y oligoastenozoospermicos y el otro, entre los oligoastenozoospermicos y los oligozoospermicos. Al aplicar el análisis de regresión lineal simple, se encontró una relación positiva débil entre las variables motilidad y la concentración de ON en el grupo de los normozoospermicos, lo que sugiere que a medida que aumenta la concentración de ON aumenta la motilidad espermática en los normozoospermicos. Entre la concentración de TT y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos, se encontró asociación estadísticamente significativa; el coeficiente de correlación (r) indicó una relación positiva débil entre las variables, lo que sugiere que a medida que aumenta la concentración de TT aumenta la concentración espermática en los normozoospermicos. El coeficiente de correlación (r) indicó una relación negativa moderada entre las variables GSH y concentración en el grupo oligozoospermicos, a medida que aumenta la concentración de GSH disminuye la concentración espermática en estudiantes oligozoospermicos. La inclusión de parámetros tales como MTS, TT, GSH y ON en los estudios de infertilidad masculina podrían ser considerados en la evaluación de la infertilidad masculina dada su relación directa con el estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo, es el desbalance en que se encuentran las células que presentan el desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes, bien sea por un exceso en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), bien por una deficiencia en los sistemas de detoxificación de éstas, lo cual conduce a un aumento en la concentración de ERO y en consecuencia a un aumento en el daño celular (Aitken y Fisher, 1994).

Numerosos autores han demostrado que el estrés oxidativo, juega un papel predominante en la etiología de la infertilidad masculina (Agarwal et al., 2003). Entre las ERO, destacan esencialmente el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo (-OH) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este último es la principal especie reactiva, y es la molécula que más se ha implicado en el daño de los espermatozoides de equino (Baumber et al., 2000). El  $H_2O_2$  no posee electrones libres y por lo tanto no es un radical libre; sin embargo, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales -OH en presencia de metales de transición (Hicks, 2001).

La producción celular de ERO fue observada por primera vez en espermatozoides de mamíferos a finales de los años cuarenta. Iwasaki y Gagnon (1992), coinciden en afirmar que los gametos masculinos constituyen la principal fuente de esos radicales libres en el semen. Se postula que la función espermática es regulada por el manejo estricto del estrés oxidativo; una peroxidación leve puede ser la responsable de la capacitación y la activación del espermatozoide pero un exceso de estrés oxidativo resulta en daño espermático (Gadella et al., 2001).

El gameto masculino fue el primer tipo celular donde se constató la capacidad para generar ERO (Tosic y Walton, 1946). La habilidad para generar ERO es un aspecto fundamental de la fisiología del espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2003). Los metabolitos

del oxígeno están implicados en procesos tan importantes como la capacitación espermática, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión de membranas para la fecundación. La capacitación espermática, por ejemplo, implica un gran aumento en el nivel de tirosina fosforilada en la cola y sobre todo en la pieza intermedia (Visconti *et al.*, 1995). Las señales implicadas para que tenga lugar la fosforilación son el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y el estado redox de la célula, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son dos factores importantes en este proceso (Baker *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que la infertilidad pudiera ser el resultado del incremento en la producción de las ERO o del decremento en las defensas antioxidantes (Lewis *et al.*, 1995; Thiele *et al.*, 1995), es por ello que, se vuelve importante conocer cuáles son los valores que se utilizarán como referencia para cada población en los agentes antioxidantes y oxidantes que actúan sobre los espermatozoides. Los espermatozoides, como casi todas las células del organismo, experimentan daño en presencia de las ERO con un posible efecto en la disminución de la movilidad, lo que explica una hipofertilidad primaria masculina (WHO, 1999).

El medio en que se desenvuelven los espermatozoides es vital para su supervivencia permitiendo mantener un pH óptimo, aportándoles nutrientes y regulando la homeostasis seminal; sin embargo, cuando ese ambiente es alterado se presentan cambios en su capacidad para fecundar. Se ha propuesto que en los pacientes con infertilidad primaria o secundaria, en presencia de espermatozoides morfológicamente normales, pudieran existir alteraciones bioquímicas en el líquido seminal (Zini *et al.*, 1993). Resulta incuestionable la participación del estrés oxidativo en la patogenia de la infertilidad masculina. Una buena parte de los pacientes que sufren de este padecimiento presentan niveles elevados de especies reactivas del oxígeno, cuya presencia en el semen constituye un reflejo del desbalance entre su producción por los elementos celulares y su degradación por los sistemas antioxidantes (Zayas *et al.*, 2000).

Entre 4,00 y 10,00% de los casos de esterilidad masculina se atribuyen a inflamación del

tracto genital, la inflamación produce infiltración del líquido seminal con leucocitos, los que alteran la función espermática disminuyendo la motilidad, desencadenando prematuramente la reacción del acrosoma y disminuyendo la capacidad de fusión al ovocito (Aitken y Fisher, 1994; Plante *et al.*, 1994). Asimismo, la contaminación leucocitaria resulta nociva para las poblaciones espermáticas desprovistas del plasma seminal, debido a la producción de radicales libre de oxígeno. Los leucocitos que infiltran el líquido seminal provienen en un 50,00 a 60,00% de la próstata y de las vesículas seminales, es por ello que las infecciones de estas glándulas accesorias se traducen en un aumento de leucocitos inflamatorios en el eyaculado. La detección de leucocitos en el semen mediante la tinción de peroxidasa ha sido recomendada como un indicador adecuado de infección del tracto genital (WHO, 1992), encontrándose una correlación positiva entre el número de células peroxidasa positivas y los niveles de elastasa, proteasa liberada por los granulocitos inflamatorios (Wolf, 1995). Se indica leucocitospermia cuando existe una concentración de leucocitos peroxidasa positivos en el semen ( $1 \times 10^6$  ml), y se asocia con una disminución de la calidad del semen y con la generación de ERO (Wolff *et al.*, 1990). En estudios realizados sobre la infertilidad masculina se ha detectado una disminución de la actividad de enzimas y de moléculas antioxidantes (Alkan *et al.*, 1997).

Las enzimas antioxidantes citoplasmáticas mantienen controladas la concentración de ERO y protegen a las células de su exceso, pero los espermatozoides son más susceptibles ya que, su reducido citoplasma hace que carezcan de estos mecanismos endógenos para reparar los daños asociados al estrés oxidativo. La generación excesiva de ERO en el semen, principalmente por los neutrófilos, pero también por espermatozoides anormales, podría ser una causa de esterilidad (Garrido *et al.*, 2004).

El peróxido de hidrógeno es la principal ERO tóxica para los espermatozoides humanos. Las concentraciones moderadamente altas no afectan la viabilidad de los espermatozoides, pero los inmovilizan, generalmente por agotamiento del ATP intracelular y disminución ulterior en la fosforilación de las proteínas del axonema

(Agarwal, 2004; Awad *et al.*, 2006).

Se han encontrado concentraciones significativamente menores de antioxidantes en el semen de hombres estériles en relación con los controles. No obstante, las concentraciones patológicas de ERO detectadas en el semen de hombres estériles se deben más probablemente, al aumento de la producción de ERO que a la disminución de la capacidad antioxidante del líquido seminal. El alto contenido de los espermatozoides con ácidos grasos poliinsaturados también contribuye a que estas células sean más sensibles al estrés oxidativo (Álvarez y Storey, 1995). La peroxidación lipídica afecta sobre todo a las membranas y se asocia a una disminución de la movilidad espermática. La pérdida de fluidez en la membrana, origina un fallo en la actividad  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPasa, que provoca un aumento del calcio intracelular y como consecuencia la pérdida de la movilidad espermática. En este sentido, se ha señalado que los niveles de producción de ERO por las poblaciones espermáticas puras se correlacionaron negativamente con la calidad del semen; funciones dependientes de la fluidez de la membrana como la fusión al ovocito y la reacción acrosómica, también se ven alteradas (Gómez *et al.*, 1998).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define leucocitospermia como el aumento de la infiltración de leucocitos en semen, con presencia de leucocitos peroxidasa-positivos, cuyas concentraciones son  $> 1 \times 10^6$  por mililitro de semen (WHO, 1999). La presencia de leucocitos activados como consecuencia de una infección del tracto reproductor masculino, las radiaciones electromagnéticas, las radiaciones de teléfonos móviles o agentes xenobióticos como las quinonas, favorecen la producción de ERO llegando a niveles perjudiciales (Paul *et al.*, 2008; De Iuliis *et al.*, 2009; Bennetts *et al.*, 2008).

Otros factores hacen a los espermatozoides más susceptibles de sufrir daños por las especies reactivas, porque impiden el correcto empaquetado del ADN, como ocurre con algunos pesticidas organofosforados y tóxicos ambientales; algunas patologías asociadas

a una espermatogénesis incompleta o a una disminución del sistema de antioxidantes, también incrementan los efectos producidos por el exceso de ERO; es lo que ocurre en casos de criptorquidia, torsión testicular, varicocele, hipertiroidismo o diabetes. Durante procesos dependientes del estado redox como la capacitación espermática se han observado transformaciones morfológicas en las mitocondrias (Ozdamar *et al.*, 2004; Piña *et al.*, 2006; Agbaje *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Zamoner *et al.*, 2007;). Se ha demostrado que estos orgánulos, tan abundantes en la cola y la pieza intermedia, son los principales generadores de ERO en los espermatozoides y que cualquier factor capaz de interferir en la cadena transportadora de electrones es un potencial inductor de ERO. Prácticamente el semen de cada eyaculación está contaminado con posibles fuentes de ERO (Koppers *et al.*, 2008).

Se deduce que, en cada eyaculación algunos espermatozoides sufrirán daño oxidativo y pérdida ulterior de la función. De esta manera, el impacto de las ERO sobre la fertilidad masculina es un problema de grado más que, de presencia o ausencia de la patología. En las mitocondrias disfuncionales la producción de ERO aumenta significativamente, y estas moléculas a su vez, afectan la función mitocondrial de los espermatozoides. Esta relación se puede deber a dos fenómenos interconectados mutuamente: las ERO que lesionan la membrana mitocondrial, y la membrana mitocondrial lesionada que aumenta la producción de ERO. Por otro lado, las mitocondrias tienen una función clave en el mecanismo de la apoptosis. Su integridad está determinada por la presencia de citocromo c en el espacio de la membrana interna. Los niveles altos de ERO desorganizan las membranas interna y externa de las mitocondrias, ésto produce la liberación de la proteína citocromo c de la mitocondria, que activa las caspasas e induce apoptosis. Se ha demostrado en varios tipos celulares que el estrés oxidativo puede ser inductor de la apoptosis (Brookes *et al.*, 2004).

Una de las ERO que juega un papel primario en el sistema reproductivo masculino es el óxido nítrico (ON), la cual es una molécula muy versátil que actúa como un mensajero intracelular y transcelular; se empezó a conocer en 1980, gracias a los estudios

realizados por Furchgott y Zawadzki (1980), quienes inicialmente la denominaron factor relajante del endotelio. Actualmente, se sabe que interviene en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (Hurford, 2003; Harukuni y Bhardwaj, 2006). El ON se libera de manera pulsátil, es muy lábil, posee un electrón no apareado y tiene una vida media muy corta, aproximadamente seis segundos. Por ser un radical libre, es una molécula inestable que logra estabilizarse al unirse a otras especies paramagnéticas como el oxígeno formando nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (Coggins y Bloch, 2007; Tessari, 2007).

Por otro lado, la presencia del ON en el epidídimo y testículos sugiere un benéfico rol en el sistema reproductivo masculino. El ON es un modulador importante de las funciones celulares, un potente vasodilatador y neurotransmisor, ha sido implicado en numerosos procesos psicológicos, farmacológicos y patológicos, es también un mediador esencial en los tractos reproductivos, tanto femenino como masculino. El ON puede actuar como radical de desechos, volviéndose inactivo, incluso inhibiendo la producción de los aniones peróxido, los cuales, causan peroxidación lipídica y por consiguiente, discapacidad funcional de los espermatozoides (Donnelly *et al.*, 1997).

La importancia del mantenimiento de un estado redox adecuado en el semen, que ayude a conservar los espermatozoides viables, supone la presencia de una maquinaria bioquímica para neutralizar el daño oxidativo generado por la misma naturaleza de estas células, la presencia de barredores de radicales libres como el glutatión (GSH) y metalotioninas (MTS) son esenciales para proveer las condiciones adecuadas para mantener un equilibrio oxidativo. Una molécula que juega un papel central en el mantenimiento del estado redox de la célula es el GSH, el cual junto a un grupo de enzimas que funcionan en su presencia, puede neutralizar los radicales libres evitando de esta forma que provoque daño en el organismo, existen patologías donde el nivel de GSH se encuentra disminuido ya sea, por falta de su producción o por un alto consumo en reacciones de neutralización. El agotamiento del GSH conduce a muerte celular y ha sido documentado en muchas condiciones degenerativas; su estado intracelular parece

ser un indicador sensible de la salud general de las células y de su habilidad para resistir las demandas tóxicas (Rojas *et al.*, 2004).

Antioxidantes como el GSH, puede proteger contra el efecto perjudicial de los leucocitos derivados de ERO en el movimiento de los espermatozoides y ser de valor clínico en los procedimientos de reproducción asistida. El GSH y enzimas relacionadas con el GSH podrían jugar un papel importante en la calidad del esperma (Knapen *et al.*, 1999).

Además del GSH, las células presentan pequeñas proteínas ricas en grupos tioles que contribuyen al mantenimiento del estado redox de la célula ya que se unen a metales neutralizándoles e impidiendo que induzcan estados oxidativos en la célula. Las MTS están presentes en todos los organismos, incluyendo mamíferos, peces e invertebrados, algas, plantas superiores y microorganismos procariontas y eucariotas (Roesijadi, 1992).

La literatura reporta que los metales pesados, aumentan la expresión de pequeñas proteínas conocidas como tioredoxinas, metalotioninas y de péptidos como el glutatión; estas moléculas tienen alto contenido de cisteínas. Al respecto, se han desarrollado pruebas sencillas y rápidas que permiten la identificación y cuantificación de estas moléculas en diferentes tejidos de los organismos. Dentro de estas pruebas tenemos la estimación del contenido de tioles totales (TT) (proteínas, péptidos, cisteína y otras moléculas ricas en tioles) y de tioles solubles en ácido (TA) (pequeñas moléculas ricas en tioles), que se han empleado mayormente como un indicador de la contaminación con metales pesados en las plantas; aunque también se utiliza en la evaluación de las concentraciones de GSH, homocisteína y cisteína en niños autistas. Esta prueba tiene la ventaja de poder ser realizada en sangre, de tal forma que es posible seguir, a través de las mismas, la capacidad que tiene el organismo de desintoxicarse (Salazar *et al.*, 2009).

Al respecto, existe un grupo elevado de hombres que acuden a consulta por infertilidad con un espermograma estándar normal (49,20%) según el estudio multicéntrico de la OMS, los cuales se clasifican en la categoría diagnóstica de causa no demostrable. Ésto indica que, en ocasiones son necesarios otros elementos que permitan definir mejor la

capacidad de fertilización de los espermatozoides (Padrón *et al.*, 1998). Así que, tomando conciencia de la importancia del factor masculino en la fertilidad de pareja y la necesidad de buscar sus causas, se hace interesante desarrollar este trabajo que aparte de evaluar la calidad espermática, profundiza en las posibles causas, poco estudiadas, como alteraciones del estrés oxidativo en el líquido seminal. De allí, la importancia de evaluar la calidad espermática de varones jóvenes, el cual está condicionado en gran manera por el equilibrio que pueda existir entre los sistemas antioxidantes.

## METODOLOGÍA

### **Población**

La población en estudio estuvo conformada por 100 individuos del sexo masculino, con edades comprendidas entre 17 y 46 años, que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, con indicación de estudio del líquido seminal.

A la población estudiada, se le realizó una encuesta sobre sus datos personales y datos clínicos (apéndice 2). De igual forma, se siguieron las normas de ética establecidas por la OMS para trabajos de investigación en humanos, según la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, para lo cual a cada individuo seleccionado se le informó sobre los alcances y objetivos de esta investigación, así como las ventajas y desventajas de su participación, ésto con el propósito de obtener su consentimiento por escrito (apéndice 1) (OPS, 2000; De Abajo, 2001).

El promedio del tiempo de abstinencia sexual de los estudiantes que participaron en la presente investigación, fue de  $3,97 \pm 0,76$  días; siendo recomendado por la OMS un lapso de 3 a 5 días. Eyaculaciones frecuentes ocasionan una disminución en el volumen del líquido eyaculado y de la concentración espermática. Por el contrario, eyaculaciones poco frecuentes (mayores a 7 días) dan lugar a un volumen y una concentración de espermatozoides mayor, con una disminución de la movilidad y un aumento de las formas anormales (WHO, 1999; Botero *et al.*, 2004; Poirot y Cherruau, 2005).

### **Criterios de exclusión**

Fueron excluidos aquellos estudiantes que recibieron tratamiento médico que pudiera afectar de alguna manera la función reproductora (quimioterapia, radioterapia), varicocele, individuos vasectomizados u otras patologías similares.

### **Lavado del material**

Los recolectores de orina utilizados para la obtención de las muestras de semen y todos los materiales para el procesamiento de las muestras y preparaciones de los patrones, fueron previamente tratados para evitar cualquier tipo de interferencias en las determinaciones de los diferentes parámetros estudiados.

El tratamiento aplicado fue el siguiente:

El material utilizado (recolectores de orina, puntas plásticas de pipeta, tubos de vidrio, tubos de polietileno, tapones de goma, cilindro graduado, varilla de vidrio, entre otros) se colocó en remojo durante 12 horas en una solución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) diluido al 10,00% con la finalidad de eliminar cualquier contaminación del material que pueda interferir en las determinaciones. Posteriormente, todo el material se enjuagó con agua desionizada de alta pureza Milli-Q (18 MW/cm de resistividad) y se secó perfectamente dejándolo escurrir. Luego, fue guardado en bolsas plásticas selladas, para evitar cualquier contaminación por polvo hasta el momento de su uso (Grosso, 2001).

### **Obtención de muestras seminales**

Se analizaron muestras de líquido seminal provenientes de los individuos seleccionados, cada individuo mantuvo una abstinencia sexual de 3 a 5 días antes del estudio; las muestras fueron obtenidas por masturbación y recogidas en recipientes plásticos, previamente tratados con ácido nítrico diluido al 10,00%, debidamente rotulados con el número de muestra, tiempo de abstinencia, fecha y hora de recolección. Luego, las muestras de semen fueron analizadas inmediatamente después del tiempo de licuefacción (WHO, 1999).

### **Determinación de la calidad espermática**

Siguiendo los criterios y parámetros establecidos por la OMS (WHO, 1999), cada una de las muestras de semen recolectadas, fueron sometidas a las siguientes pruebas espermáticas:

## **A. Examen macroscópico del semen**

### Viscosidad

Para evaluar la viscosidad se introdujo una varilla de vidrio en la muestra y se observó la longitud del filamento que se forma al retirarlo, el cual no debe ser mayor a 2,00 cm de longitud. La viscosidad del semen se reportó según el filamento que formaba la muestra, ya sea ausente, normal o aumentada.

### Aspecto

El aspecto del eyaculado se valoró según su color, opacidad/transparencia y presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El color del semen normalmente varía de blanco amarillento a blanco grisáceo, mientras que su aspecto es opalescente y homogéneo.

### Licuefacción

El tiempo de licuefacción en el semen normal debe completarse a los 30 minutos. Por lo que, una vez recolectadas las muestras de semen, se esperó un lapso de tiempo de aproximadamente 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, para que ocurriera la licuefacción y así proceder a su evaluación.

### Volumen

El volumen normal de eyaculado varía de 2,00 a 4,00 ml y fue medido con un cilindro graduado.

### pH

El pH de las muestras de semen se considera normal a partir de 7,20 y se midió depositando una gota de esperma sobre una tira de papel de pH y al cabo de 30 segundos, el color de la zona impregnada fue comparado con una escala colorimétrica para leer el pH.

## **B. Examen microscópico del semen**

### Directo

Se colocaron 10,00  $\mu\text{l}$  de la muestra de semen bien mezclada y licuada en un portaobjeto limpio y calentado a 37°C (para mantener la movilidad espermática), se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm<sup>2</sup>. Posteriormente, la preparación fue examinada con un objetivo de 40X, en la cual se observó la presencia de bacterias, eritrocitos, células redondas, células epiteliales y aglutinación espermática.

### Movilidad espermática

Se colocaron 10,00  $\mu\text{l}$  de semen licuado entre un portaobjeto y cubreobjeto secos y desengrasados. El análisis de movilidad de los espermatozoides de la muestra de semen se realizó contando solamente, los espermatozoides libres y nunca los que estuvieran agregados entre sí o a otras células. Se llevó a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos seleccionados al azar y con un objetivo de 40X, fueron contados no menos de 100 espermatozoides. Primero, se registraron los espermatozoides móviles progresivos del campo o de un área determinada y luego, se contaron los móviles no progresivos e inmóviles del mismo campo.

En función de la movilidad que presentaron los espermatozoides, éstos fueron agrupados en las siguientes categorías:

a+b: móviles progresivos.

c: móviles no progresivos.

d: inmóviles.

El resultado de la movilidad fue presentado como los porcentajes de espermatozoides a+ b, c y d.

### Vitalidad espermática

Se utilizó la tinción vital con eosina, cuya técnica se basa en el principio de que las células muertas que presentan alteraciones de la membrana plasmática, absorben determinadas tinciones, como en este caso, la de eosina. Para ello, se preparó una solución de eosina al 0,50% (5 g/l) en una solución acuosa al 0,90% (9 g/l) de cloruro sódico y se procedió a mezclar en proporción 1:1 del semen fresco con la solución de eosina en un tubo. Después de 1 ó 2 minutos, se tomaron 10,00 µl de la mezcla y se añadieron en un portaobjeto cubriéndolo con un cubreobjeto para luego observar la preparación a 40X, con luz brillante. Finalmente, se contaron los espermatozoides no teñidos (vivos) y los teñidos (muertos), y se expresaron en porcentaje.

### Concentración espermática

Se diluyó la muestra de semen en una proporción 1:19 con un diluyente preparado de la siguiente manera: 1 000 ml de agua destilada se le agregó 50,00 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 10,00 ml de solución de formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) de 36,00-40,00% y 0,25 g de azul de tripano. La muestra diluida se mezcló enérgicamente y se añadieron 10,00 µl en una cámara de Neubauer; una vez sedimentadas las células, se realizó el recuento de espermatozoides presentes en los 5 cuadrados medianos del cuadrado central de ambos retículos. La cámara de Neubauer utilizada para el contaje de los espermatozoides, posee un cuadrado central conformado por 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales contiene 16 cuadros más pequeños. Para las muestras que contenían menos de 10 espermatozoides por cuadrado se contaron todos los cuadrados, es decir, 25 cuadrados; para las que contenían de 10 a 40 espermatozoides por cuadrado se contaron 10 cuadrados y aquellos con más de 40 células por cuadrado fue suficiente contar 5 cuadrados (OMS, 1987). Sólo se contaron espermatozoides del lado superior o izquierdo del cuadrado en estudio, cuando uno de éstos se ubicó en la línea que divide a dos cuadrados adyacentes, con la finalidad de evitar el contaje repetitivo de células. La concentración de espermatozoides en la muestra de semen original en millones/ml, se obtuvo dividiendo la cantidad de espermatozoides contados por los factores de

corrección que se indican en el anexo 1 y luego, se multiplicó por el factor  $10^6$ .

#### Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática se realizó a partir de extendidos de la muestra de semen aplicando la coloración de Giemsa. Para ello, se utilizaron 10,00  $\mu$ l de semen sobre un portaobjetos limpio y desengrasado para la extensión y se dejó secar al aire. El estudio de la preparación se llevó a cabo con un microscopio de campo claro, con un objetivo de 100X en aceite de inmersión, contándose un mínimo de 100 espermatozoides, desechándose aquellos espermatozoides mal teñidos, colas sueltas y espermatozoides cabezas de alfiler. Un espermatozoide anormal puede presentar defectos de la cabeza (grande, pequeña, redonda, piriforme, atilada, amorfa, vacuolada, doble), de la pieza media (ausente, pequeña, anormalmente fina, conteniendo residuos citoplasmáticos) o de la cola (doble, enrollada, con residuos citoplasmáticos, horquillada). Una vez contados y clasificados los espermatozoides, dependiendo de su morfología, ya sean como normales y anormales, fueron expresados en porcentajes.

#### **Tinción de peroxidasa**

A 4,00 ml de una solución de benzidina al 50,00% en etanol, se le adicionaron 37,50  $\mu$ l de  $H_2O_2$ . Se tomaron 20,00  $\mu$ l de eyaculado fresco y se mezclaron con 20,00  $\mu$ l de la solución recién preparada de benzidina- $H_2O_2$ . Después de 5 minutos de incubación, se adicionaron 160,00  $\mu$ l de buffer fosfato (PBS) pH 8, obteniéndose una dilución 1/10. El recuento se realizó colocando entre lámina y laminilla 10,00  $\mu$ l de la dilución final y observando en varios campos la presencia de células peroxidasa-positivas (células teñidas de color café). En aquellos, donde se encontraron células peroxidasa-positivas, se llenó la cámara de Neubauer a partir de la dilución final y se realizó el conteo en los 25 cuadros del cuadrado central (conteo en ambos retículos). El factor de conversión para una dilución 1/10 y 25 cuadrados analizados es 10. Por lo tanto, el número total de células peroxidasa-positivas fue dividido por el factor de conversión 10. El número de células peroxidasa positivas se expresó en millones de células por mililitro de eyaculado (Politch, *et al.*, 1993).

### **Obtención del plasma seminal**

El plasma seminal se obtuvo mediante centrifugación por 10 minutos a 3 000 rpm y se guardó en tubos limpios y estériles a -20°C hasta su procesamiento (Morisawa *et al.*, 1983).

### **Determinación de óxido nítrico (ON)**

El ON se determinó mediante el método de Griess descrito por la OAC norma N° 973.31 (1990) para la determinación de nitritos en carnes curadas; este método fue estandarizado para plasma seminal. La medición de ON se realizó mediante la determinación de la cantidad total de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), que son los productos estables del metabolismo de ON en el líquido seminal. Se procedió a centrifugar el líquido seminal por 10 min a 3 000 rpm para separar el plasma de las células, seguidamente se agregó en un tubo 50,00  $\mu\text{l}$  de plasma seminal con 2,50 ml de agua destilada previamente calentada a 80°C aproximadamente; inmediatamente se incubó la preparación en baño de María a 80°C por 2 horas. Luego, se retiraron las muestras del baño de María y se dejó en reposo hasta temperatura ambiente, se centrifugó a 3 000 rpm por 10 min y se separó el sobrenadante del sedimento, el sobrenadante se desproteinizó de la siguiente forma: se tomó 1 750,00  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se agregó 250,00  $\mu\text{l}$  de ácido sulfosalicílico (con el objeto de ajustar la solución final al 5,00% del ácido), se centrifugó a 3 000 rpm por 10 min y separó sobrenadante del sedimento, se montó un blanco igual al de la reacción colorimétrica (con 150,00  $\mu\text{l}$  de sulfanilamida, 150,00  $\mu\text{l}$  de reactivo N-1-naftiletilendiamina (NED) y 2,00 ml de agua destilada) y se sirvió la reacción colorimétrica que contenía 1,50 ml del sobrenadante final, 150,00  $\mu\text{l}$  de sulfanilamida, 150,00  $\mu\text{l}$  de reactivo NED y 1,20 ml de agua destilada; luego se mezclaron los componentes, se dejaron reposar por 15 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrónico PerkinElmer Lambda 25 a una densidad óptica de 540 nm. Para estimar la concentración de ON en el plasma seminal, se elaboró una curva estándar, de ON (0 – 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) a partir de una solución madre de  $\text{NaNO}_2$  1 ppm. La ecuación de la recta obtenida de graficar los valores de absorbancias de los estándares (Y) contra sus concentraciones (X) permitió determinar las concentraciones de ON en ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) presentes

en plasma seminal. Las lecturas fueron multiplicadas por el factor de dilución, el cual fue de 58,29. A los resultados obtenidos se le calculó el logaritmo base diez, para eliminar cualquier dependencia de la desviación estándar sobre la media (Gallardo, 2007).

### **Determinación de tioles totales (TT)**

La presencia de TT se determinó mediante la técnica descrito por Ellman's, (1959). Se centrifugó el líquido seminal por 10 min a 3 000 rpm para separar el plasma de las células, se montó un blanco igual al de la reacción colorimétrica (400,00  $\mu\text{l}$  buffer tris HCl pH 8,90; 40,00  $\mu\text{l}$  solución ácido ditionitrobenzoico (DTNB) y 2 560,00  $\mu\text{l}$  de agua destilada, de concentración cero). Se procedió a la preparación de las muestras para la posterior lectura de las absorbancias, se tomaron 100,00  $\mu\text{l}$  de plasma seminal, se le adicionaron 400,00  $\mu\text{l}$  buffer tris HCl pH 8,90; 40,00  $\mu\text{l}$  solución DTNB y 2 460,00  $\mu\text{l}$  de agua destilada; luego se mezclaron los componentes y se dejaron en reposo por 5 min para inmediatamente realizar la lectura en el espectronic PerkinElmer Lambda 25, a una densidad óptica de 412 nm. Para estimar la concentración de TT en el plasma seminal, se elaboró una curva estándar, de GSH (0 – 80  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a partir de una solución madre de 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  SH/ml. La ecuación de la recta obtenida de graficar los valores de absorbancias de los estándares (Y) contra sus concentraciones (X) permitió determinar los TT en ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) presentes en plasma seminal. Las lecturas de las absorbancias fueron multiplicadas por el factor de dilución, de 2. A los resultados obtenidos se les calculó el logaritmo base diez, para eliminar cualquier dependencia de la desviación estándar sobre la media.

### **Determinación de glutatión (GSH)**

La concentración de glutatión reducido se determinó mediante el método de Beutler *et al.*, (1963), se prepararon 2 soluciones: a) solución precipitante: 1,67 g de ácido metafosfórico glacial (mezcla de  $\text{HPO}_3$  y  $\text{NaPO}_3$ ); 0,20 g de EDTA y 30,00 g de NaCl en 100,00 ml de agua destilada. b) reactivo DTNB: 5,5' dithiobis (2-ácido nitrobenzoico) al 0,40% en buffer fosfato pH 7,50. Se mezclaron 100,00  $\mu\text{l}$  de líquido seminal con 450,00

μl de agua destilada, se adicionaron 750,00 μl de solución precipitante y se dejó en reposo por un tiempo de 5 min. Posteriormente, a 250,00 μl del filtrado se le añadió 1 ml de buffer fosfato y 500,00 μl del reactivo DTNB, se midieron inmediatamente en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 412 nm en un espectral 21D MILTON ROY y la concentración final de metalotioninas fue estimada utilizando una curva de calibración para glutatión reducido (GSH). Se preparó un blanco de reactivo con 250,00 μl de buffer fosfato pH 7,5; 500,00 μl de la solución precipitante diluida (2 a 3 partes de agua destilada) y 500,00 μl del reactivo DTNB.

### **Determinación de metalotioninas (MTS)**

#### Extracción y separación de las MTS

Las metalotioninas fueron determinadas en plasma seminal, usando el método espectrofotométrico de Viarengo, (1989). El semen fue centrifugado, se tomaron 100,00 μl del sobrenadante y 300,00 μl buffer (mezcla: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) Mercaptoetanol), se homogenizó por 1 min y se centrifugó a 3 000 rpm durante 20 min a 4°C; se tomó el sobrenadante y se le agregaron 100,00 μl etanol absoluto frío y 8,00 μl cloroformo. Esta mezcla fue centrifugada a 1 500 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante colectado se combinó con 4,00 μl HCl al 37%, 1 200,00 μl de etanol frío al 87% y 1,00 mg e ARN, se homogenizó en un vortex y se mantuvo a -20°C por espacio de 1 hora. Se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 min a 4°C; seguidamente el sobrenadante fue descartado y el precipitado adherido a las paredes de los tubos, se dejó secar por un tiempo aproximado de 20 a 30 min. Con este procedimiento se logró la extracción y separación de las metalotioninas.

#### Cuantificación de MTS

Una vez seco el material resultante se resuspendió en 1 000,00 μl de DTNB 0,43 mmol.l<sup>-1</sup> en buffer fosfato de sodio 0,20 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8 (Ellman's, 1959). La muestra finalmente se centrifugó a 6 000 rpm durante 10 min a 4°C, seguidamente se leyó la absorbancia del sobrenadante a una densidad óptica de 412 nm, en un espectral 21D

MILTON ROY y la concentración final de metalotioninas fue estimada utilizando una curva de calibración para glutatión reducido (GSH). Estableciendo la siguiente relación equimolar (asumiendo que la tionina enlazadora de Cd, Zn de hígado de conejo tienen un contenido de cisteína de 18 cys/mol MT) (Reyes, 1999).

### **Análisis estadístico**

Las muestras se agruparon de acuerdo a las alteraciones encontradas en cuatro grupos: astenozoospermicos, oligozoospermicos, oligoastenozoospermicos y normozoospermicos; se les aplicó un análisis de varianza sencillo para determinar las diferencias significativas entre los valores de ON, TT, GSH y MTS en los cuatro grupos conformados. Se empleó una prueba *a posteriori* diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel de confiabilidad del 95,00% y análisis de regresión simple la cual es una técnica estadística que se utiliza para investigar y modelar la relación entre dos variables, es decir, analiza cuando una variable independiente ejerce influencia sobre otra variable dependiente (Sokal y Rohlf, 1981). El programa empleado para las determinaciones estadísticas fue el Statgraphics Centurion versión 16.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se resume la distribución por edad de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, donde se destaca que el mayor grupo de jóvenes se encuentra en el rango de 17-28 años, correspondiendo al 87% del total de la población estudiada.

Tabla 1. Distribución por edad de estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Grupo Etario	Porcentaje (%) estudiantes
17 - 22	49
23 - 28	38
29 - 34	8
35 - 40	3
41 - 46	2
Total	100

El promedio del tiempo de abstinencia sexual de los estudiantes que participaron en la presente investigación, fue de  $3,97 \pm 0,76$  días; siendo recomendado por la OMS un lapso de 3 a 5 días. Eyaculaciones frecuentes ocasionan una disminución en el volumen del líquido eyaculado y de la concentración espermática. Por el contrario, eyaculaciones poco frecuentes (mayores a 7 días) dan lugar a un volumen y una concentración de espermatozoides mayor, con una disminución de la movilidad y un aumento de las formas anormales (WHO, 1999; Botero *et al.*, 2004; Poirot y Cherruau, 2005).

En la tabla 2 se presenta la clasificación de la calidad espermática la cual resultó afectada en un 32,00% de la población estudiada, clasificándose en individuos que presentaron astenozoospermia (espermatozoides con movilidad tipo “a+b” < 50,00%), oligozoospermia (concentración de espermatozoides < 20 000 000 esp/ml), y oligoastenozoospermia (baja concentración y movilidad), obteniéndose como frecuencias 12,00%, 11,00% y 9,00%, respectivamente, lo cual indica que la astenozoospermia es una de las alteraciones más predominantes en esta población joven,

seguida de la oligozoospermia, y por último, la oligoastenoospermia. Aunque la oligoastenoospermia representó el porcentaje menor en la población estudiada, hay que considerar este resultado, debido a que estos estudiantes tienen alteraciones en dos variables del espermograma (concentración y movilidad), las cuales resultan ser importantes al tratarse de calidad espermática. La edad promedio en los estudiantes normozoospermicos, y con astenoospermia, oligozoospermia y oligoastenoospermia fue de  $24,12 \pm 4,49$ ;  $24,83 \pm 7,22$ ;  $20,91 \pm 2,34$  y  $25,44 \pm 9,25$  años, respectivamente. Los resultados aquí encontrados indican una proporción ligeramente diferente de individuos con alteración de astenoospermia y oligozoospermia a diferencia de los reportado por Barja y Berrios (2003), quienes indican una frecuencia de individuos astenoospermicos de 39,10% seguido de un 14,00% los oligozoospermicos. Igualmente, en un estudio realizado por Mendeluk y Chiavetta (2005), se obtuvo un 49,00% de astenoospermia y un 17,00% de oligozoospermia, y Salabarría *et al.*, (2006) reportaron la astenoospermia con un 63,40% y la oligozoospermia con 21,50%.

Tabla 2. Clasificación de la calidad espermática en relación con las alteraciones detectadas en el espermograma de estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. 2009.

Alteraciones espermáticas	Porcentaje (%)
Normozoospermicos	68
Astenoospermicos	12
Oligozoospermicos	11
Oligoastenoospermicos	9
Total	100

En la tabla 3 se observan las características macroscópicas y microscópicas del espermograma de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Las variables evaluadas: tiempo de licuefacción, volumen, pH, y morfología se encontraron dentro de los valores de referencia, según valores establecidos por la OMS; no obstante, en Venezuela no hay reportes en la literatura, de estudios similares

realizados en una población joven estudiantil, que permitan comparar los resultados arrojados en la presente investigación.

Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas del espermatograma de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

N: normozoospermicos; A: astenozoospermicos; O: oligozoospermicos; OA: oligoastenozoospermicos;

Características macroscópicas y microscópicas	Alteraciones				
	N $\bar{x} \pm DS$	A $\bar{x} \pm DS$	O $\bar{x} \pm DS$	OA $\bar{x} \pm DS$	VR
Tiempo de licuefacción (min)	27,91±8,19	38,42±10,86	26,00±4,98	34,56±15,49	≤60
Volumen (ml)	3,44±1,50	3,03±1,08	3,50±2,01	3,03±1,46	≥2
pH	8,96±0,21	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	≥7,2
Concentración (esp/ml)	79 102 900± 52 486 600	40 333 300± 24 092 900	11 500 000± 3 788 140	10 544 400± 5 638 730	≥20 mlns
Motilidad progresiva (a+b%)	65,26±9,23	37,67±9,68	64,82±9,81	36,56±14,06	≥50
Morfología normal (%)	72,53±12,66	65,00±11,75	57,36±9,23	55,89±16,75	≥15
Morfología anormal (%)	27,47±12,66	35,00±11,75	42,64±9,23	44,11±16,75	

VR: valores de referencia OMS 1999;  $\bar{x} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar; %: porcentaje; mlns: millones; esp/ml: espermatozoides por mililitro.

En las tablas 4, 5 y 6 se presentan los valores de ON, TT y GSH; el ANOVA indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos normozoospermicos, astenozoospermicos, oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos para el ON, TT y GSH.

En los últimos años, el ON ha sido reconocido como una molécula que juega un papel importante en la regulación de la biología y la fisiología de la reproducción, y sabemos

que puede afectar las funciones del espermatozoides humano, como la motilidad, la viabilidad y el metabolismo. A bajas concentraciones puede tener un efecto positivo en las células, pero un efecto negativo en altas concentraciones (European Society for Human Reproduction and Embryology, 2006). En los seres humanos, ON es una sustancia biológica importante y se encuentra en una variedad de tejidos incluidos los del sistema reproductivo. El ON ha sido implicado como la protección contra ERO mediada por daños; sin embargo, en las situaciones inadecuadas, ON puede exacerbar ERO mediada por patología (Kanner *et al.*, 2001). La sobreproducción de ON en el tracto genital de hombres infértiles tiene un papel patogénico potencial en la reducción de la integridad del ADN espermático (Iraj *et al.*, 2007).

Tabla 4. Concentraciones de óxido nítrico en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Grupos	N	$\bar{X} \pm DS$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	F	p
Normozoospermicos	68	0,784 $\pm$ 0,206	1,87	0,140
Astenoospermicos	12	0,862 $\pm$ 0,223		
Oligozoospermicos	11	0,742 $\pm$ 0,241		
Oligoastenoospermicos	9	0,650 $\pm$ 0,190		

N: número;  $\bar{X} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar; F: coeficiente de correlación; p: valor estadístico.

Tabla 5. Concentraciones de tioles totales en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Grupos	N	$\bar{X} \pm DS$ ( $\mu\text{mol}/\text{l}^{-1}$ )	F	p
Normozoospermicos	68	1,481 $\pm$ 0,199	0,69	0,559
Astenoospermicos	12	1,563 $\pm$ 0,253		
Oligozoospermicos	11	1,475 $\pm$ 0,246		
Oligoastenoospermicos	9	1,444 $\pm$ 0,149		

N: número;  $\bar{X} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar; F: coeficiente de correlación; p: valor estadístico.

Tabla 6. Concentraciones de glutatión en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Grupos	N	$\bar{x} \pm DS$ (mmol/ml)	F	p
Normozoospermicos	68	3,325 $\pm$ 0,499	0,84	0,478
Astenozoospermicos	12	3,251 $\pm$ 0,240		
Oligozoospermicos	11	3,412 $\pm$ 0,528		
Oligoastenozoospermicos	9	3,550 $\pm$ 0,419		

N: número;  $\bar{x} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar; F: coeficiente de correlación; p: valor estadístico.

En el mantenimiento del balance redox en los organismos, las moléculas ricas en grupos tioles juegan un papel principal así como en el transporte y manejo de metales pesados (Hernández *et al.*, 2006; Jurczuk *et al.*, 2006).

Al respecto, se han desarrollado pruebas sencillas y rápidas que permiten la identificación y cuantificación de estas moléculas en diferentes tejidos de los organismos. Dentro de estas pruebas están la estimación del contenido de tioles totales (proteínas, péptidos, cisteína y otras moléculas ricas en tioles) y de tioles solubles en ácido (pequeñas moléculas ricas en tioles), que se ha empleado mayormente como un indicador de la contaminación con metales pesados en las plantas (Salazar *et al.*, 2009), aunque también se utiliza en la evaluación de las concentraciones de glutatión, homocisteína y cisteína en niños autistas (James *et al.*, 2004). Esta prueba tiene la ventaja de poder ser realizada en sangre, de tal forma es posible seguir, a través de las mismas, la capacidad que tiene el organismo de desintoxicarse.

En cuanto GSH, se ha demostrado que en pacientes con oligozoospermia, la concentración de GSH disminuye en plasma seminal, concluyendo que los niveles medios de GSH son significativamente menor en los hombres subfértiles (Raijmakers *et al.*, 2003). Estos autores también encontraron una asociación positiva entre los niveles de GSH en plasma seminal, la morfología de los espermatozoides y la motilidad espermática. Los resultados mencionados no coinciden con los arrojados por el presente trabajo de investigación, puesto que a pesar de las alteraciones espermáticas reportadas,

no se encontraron bajos niveles de GSH en estos pacientes, ésto puede deberse a que quizás estos valores no son permanentes, o quizás el nivel de anormalidad no es lo suficientemente grave como para generar disminución del GSH encontrándose a nivel subclínico.

Tabla 7. Concentraciones de metalotioninas en plasma seminal, de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Grupos	N	$\bar{X} \pm DS$ (mmol/ml)	F	p
Normozoospermicos	68	0,020 $\pm$ 0,004		
Astenozoospermicos	12	0,018 $\pm$ 0,004	2,93	0,038*
Oligozoospermicos	11	0,023 $\pm$ 0,002		
Oligoastenozoospermicos	9	0,021 $\pm$ 0,004		

N: número;  $\bar{X} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar; F: coeficiente de correlación; p: valor estadístico; \*: estadísticamente significativo (p<0,05).

El ANOVA indicó que existían diferencias significativas entre los valores de concentración de MTS en los grupos estudiados; el análisis *a posteriori* demostró que se formaban dos grupos superpuestos: uno entre los individuos normozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos y el otro, entre los oligozoospermicos y los oligoastenozoospermicos (anexo 3). La literatura reporta que los metales pesados, aumentan la expresión de pequeñas proteínas conocida como metalotioninas, moléculas con alto contenido de cisteína; estas proteínas se han empleado mayormente como un indicador de la contaminación por metales pesados.

En un estudio realizado con el mismo grupo de estudiantes, se encontró asociación estadísticamente significativa (p<0,05) entre la motilidad espermática tipo “a+b” del grupo oligoastenozoospermicos con las concentraciones de plomo en suero sanguíneo, cuyo resultado sugiere que el plomo está actuando sobre la motilidad de los espermatozoides y no en su concentración para reducir la fertilidad en este grupo de estudiantes (Basmadji, 2009). Las metalotioninas trasportan plomo y probablemente, este aumento observado tanto en los oligoastenozoospermicos como en los oligozoospermicos esté relacionada con agregación de las mismas para quelar el plomo.

Tabla 8. Asociación de los niveles de óxido nítrico y tioles totales en individuos normozoospermicos, astenozoospermicos, oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Alteraciones espermáticas	N	V p Oxido Nítrico log <sub>10</sub> (µg/µl)	V r	V p Tioles Totales log <sub>10</sub> (µmol/l <sup>-1</sup> )	V r
Normozoospermicos	68				
Motilidad “a+b”		0,033*	0,26	0,586 ns	-0,07
Concentración esp/ml		0,529 ns	0,08	0,009*	0,32
Astenozoospermicos	12				
Motilidad “a+b”		0,790 ns	-0,09	0,172 ns	0,42
Oligozoospermicos	11				
Concentración esp/ml		0,381 ns	-0,29	0,548 ns	-0,20
Oligoastenozoospermicos	9				
Motilidad “a+b”		0,820 ns	-0,09	0,708 ns	-0,15
Concentración esp/ml		0,982 ns	-0,01	0,796 ns	-0,10
Total	100				

ns: estadísticamente no significativo (p>0,05); N: número; Vp: valor estadístico; Vr: coeficiente de correlación; \*: estadísticamente significativo (p<0,05); esp/ml: espermatozoides por mililitro.

El coeficiente de correlación (r) indicó una relación positiva débil entre las variables motilidad a+b y la concentración de ON, lo que sugiere que a medida que aumenta la concentración de óxido nítrico aumenta la motilidad espermática en los normozoospermicos. Los bajos niveles de ON, generado en condiciones fisiológicas, pueden ser beneficiosos para las funciones de los espermatozoides.

El óxido nítrico es una molécula muy versátil que actúa como un mensajero intracelular y transcelular; se empezó a conocer en 1980, gracias a los estudios realizados por Furchgott y Zawadzki (1980), quienes inicialmente la denominaron factor relajante del endotelio (Hurford, 2003; Harukuni y Bhardwaj, 2006). Actualmente, se sabe que interviene en diferentes procesos fisiológicos y patológicos.

El ON es un modulador importante de las funciones celulares, un potente vasodilatador y neurotransmisor, ha sido implicado en numerosos procesos psicológicos,

farmacológicos y patológicos; es también un mediador esencial en los tractos reproductivos, tanto femenino como masculino. A pesar de ser un radical libre, el ON puede actuar como radical de desechos, volviéndose inactivo, incluso inhibiendo la producción de los aniones peróxido, los cuales, causan peroxidación lipídica, lo cual da una discapacidad funcional de espermatozoides (Donnelly *et al.*, 1997).

En un estudio realizado por Darab *et al.* (2005), observaron una correlación negativa significativa entre la concentración de ON en el plasma seminal y la motilidad espermática ( $r = -0,290$ ;  $P = 0,003$ ) y también el conteo de espermatozoides ( $r = -0,260$ ;  $P = 0,008$ ). En un estudio realizado por Badade *et al.*, (2011), el óxido nítrico fueron significativamente mayores ( $p < 0,001$ ) en los pacientes oligoastenozoospermicos que los hombres normozoospermicos. Estos resultados difieren con los encontrados en la presente investigación; probablemente, los niveles de óxido nítrico determinados en el presente estudio representen valores considerados en el rango adecuado para este metabolito en el plasma seminal.

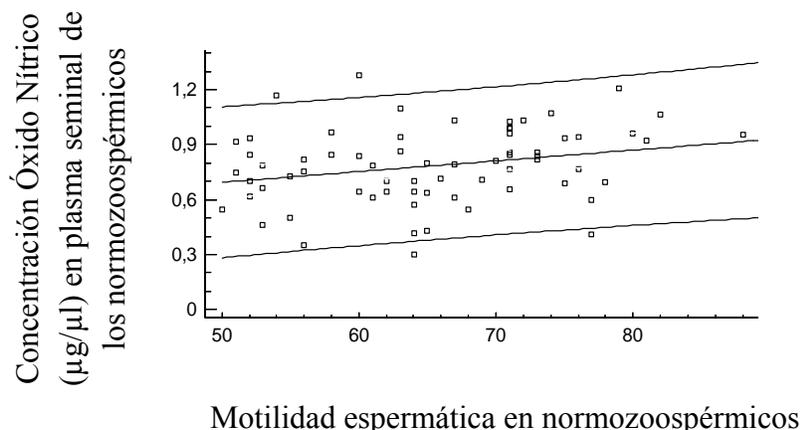


Figura 1. Relación entre la concentración de óxido nítrico y la motilidad espermática en estudiantes normozoospermicos

Entre la concentración de tioles totales y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos, se encontró asociación estadísticamente significativa y el coeficiente de correlación (r) indicó una relación positiva débil entre las variables (figura 2). La realización de esta prueba en plasma seminal no está documentada y en este trabajo se presentan los primeros resultados de esta prueba en ese fluido corporal.

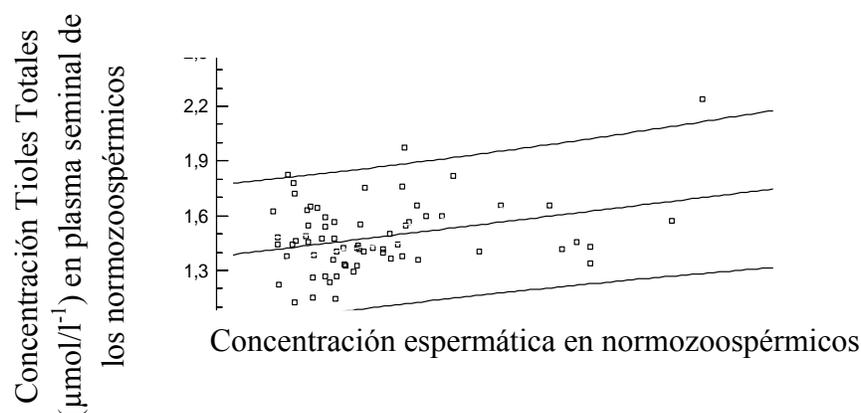


Figura 2. Relación entre la concentración de tioles totales y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos

Tabla 9. Asociación de los niveles de glutatión y metalotioninas en individuos normozoospermicos, astenozoospermicos, oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. 2009.

Alteraciones espermáticas	N	Glutatión (mmol/ml)		Metalotioninas (mmol/ml)	
		V p	V r	V p	V r
Normozoospermicos	68				
Motilidad "a+b"		0,091 ns	-0,21	0,959 ns	0,01
Concentración esp/ml		0,195 ns	0,16	0,765 ns	0,04
Astenozoospermicos	12				
Motilidad "a+b"		0,927 ns	-0,03	0,519 ns	-0,21
Oligozoospermicos	11				
Concentración esp/ml		0,034*	-0,64	0,477 ns	-0,24
Oligoastenozoospermicos	9				
Motilidad "a+b"		0,598 ns	0,20	0,570 ns	-0,22
Concentración esp/ml		0,470 ns	0,28	0,584 ns	-0,21
Total	100				

ns: estadísticamente no significativo ( $p > 0,05$ ); N: número; Vp: valor estadístico; Vr: coeficiente de correlación; \*: estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ); esp/ml: espermatozoides por mililitro.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) indicó una relación negativa moderada entre las variables GSH y la concentración espermática en el grupo oligozoospermicos, a medida que aumenta la concentración de glutatión disminuye la concentración espermática en estudiantes oligozoospermicos (figura 3).

En un estudio realizado en Turquía a 34 estudiantes de medicina, voluntarios sanos, durante un período de estrés y 3 meses después, sin período de estrés, se encontró que el glutatión contenido en el plasma seminal y el índice de motilidad de los espermatozoides fueron significativamente más bajos durante el período estrés; además, encontraron un mayor porcentaje de anomalías en la morfología espermática. Los autores sugieren que, un menor nivel de GSH en el plasma seminal se asocia con mala calidad del líquido seminal y un mayor nivel de GSH se asocia con una buena calidad del esperma (Eskiocak *et al.*, 2005). En la presente investigación la población evaluada se encontraba cursando su semestre regular, es posible que se encontraran bajo condiciones de estrés.

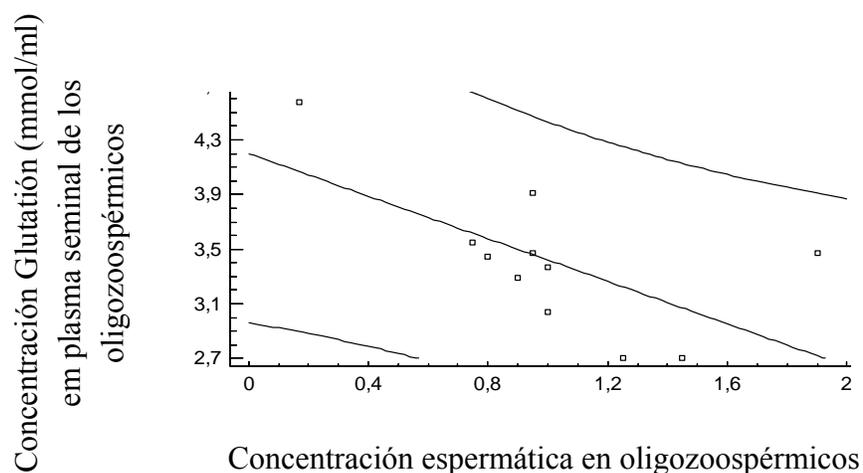


Figura 3. Relación entre la concentración de glutatión y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos.

Hasta la fecha, no existen métodos fiables y reproducibles de uso clínico rutinario para calcular los niveles de ERO y complementar el estudio del varón. Por otro lado, se tiene el inconveniente de que aún no se ha definido el nivel normal de ERO en hombres fértiles. La presencia de leucocitos en el líquido seminal es sugestivo de alteraciones en

el sistema redox (Aitken y Fisher, 1994; Plante *et al.*, 1994). La función espermática está asociada con el estrés oxidativo y se ve afectada por las ERO, que pueden alterar, reversible o irreversiblemente a los espermatozoides, estas son generadas por las células espermática y los leucocitos fagocíticos (Aitken y Fisher, 1994). Las muestras estudiadas no presentaron leucocitos en número tal, que pudiese indicar alteraciones significativas en los valores de los marcadores analizados.

La infertilidad primaria en algunos sujetos, se debe a cambios importantes en el balance redox del semen. Iwasaki y Gagnon, (1992) mencionan que las ERO se encuentran alteradas en 40,00% de los hombres con infertilidad en tanto que Agarwal, (2004) señalan que es en 25,00%. Un estado de estrés oxidante se cree que regula la función espermática en dos sentidos, tanto benéfica como perjudicial (Wang *et al.*, 2003; Moustafa *et al.*, 2004). Resulta favorecedor que una peroxidación leve puede originar la capacitación y, actúa como interruptor en la tirosina cinasa, por lo que ocurre una hipermovilidad inducida por el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y un aumento en la afinidad por la zona pelúcida ayudando así a la fertilización, y es perjudicial porque una peroxidación excesiva resulta en daño espermático (Gadella *et al.*, 2001).

Resulta de gran importancia desarrollar este estudio, para la región, ya que hasta la fecha no existe estudio de referencia que permita establecer comparación de cómo estas moléculas pudieran estar afectando la calidad espermática de la población estudiantil evaluada en la Universidad de Oriente, Núcleo Sucre. Los resultados de espermatoograma reportan gran variabilidad, inclusive en el mismo paciente, donde los resultados de los espermatoograma se encuentran dentro de los valores de referencia y presentan dificultades para la fertilización; estas determinaciones especiales vienen a complementar el estudio del varón y a reforzar un diagnóstico para la determinación de posibles causas de la no fertilización.

A la vista de algunos estudios, estos resultados necesitan mayor consideración. Una

posible explicación podría ser el efecto del laboratorio, rendimiento técnico. Independientemente de que la mayor presencia de ERO en plasma seminal, se traduce en un deterioro sobre la espermatogénesis y la fertilidad, ésto debe ser aclarado por otros estudios con una muestra de mayor tamaño.

## CONCLUSIONES

La calidad espermática resultó estar afectada en un 32,00% de la población estudiada, clasificándose en individuos que presentaron astenozoospermia, oligozoospermia, y oligoastenozoospermia, siendo la astenozoospermia una de las alteraciones más predominantes en esta población joven, seguida de la oligozoospermia, y de la oligoastenozoospermia.

Las variables tiempo de licuefacción, volumen, pH, y morfología no se encontraron alteradas, según valores establecidos por la OMS.

Las muestras estudiadas no presentaron leucocitos que podrían estar modificando los valores de los marcadores analizados. Las células peroxidasa positiva tuvieron un valor inferior a los valores de referencia establecidos por la OMS.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa, entre la concentración de MTS y la media de los grupos estudiados, observándose dos grupos, uno entre los individuos normozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos y el otro, entre los oligozoospermicos y los oligoastenozoospermicos.

Se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre la concentración de óxido nítrico y la motilidad espermática en estudiantes normozoospermicos; entre la concentración de tioles totales y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos y entre la concentración de glutatión y la concentración espermática en estudiantes oligozoospermicos.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar con las investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo en líquido seminal, que permitan definir los niveles normales de ERO en hombres fértiles y estandarizar métodos fiables y reproducibles de uso clínico rutinario para calcular los niveles de ERO y complementar el estudio del varón.

Cuando existan alteraciones físicas, genéticas y hormonales es recomendable realizar una evaluación temprana del estado fértil, ya que el mismo le permitirá tomar previsiones a tiempo en caso de haber alguna alteraciones, puesto que la infertilidad no es una enfermedad; sino más bien un conjunto de alteraciones que la mayoría de los jóvenes desconocen hasta el momento que deciden procrear.

Incluir como parte del espermograma, los niveles normales de ERO en hombres fértiles y la determinación de células peroxidasa positiva, para poder determinar la causa de problemas en caso de un espermograma normal, lo cual refuerce el diagnóstico final del paciente.

Con base en los antecedentes bibliográficos, y con los resultados de este trabajo, se puede justificar que se soliciten las mediciones de glutatión y óxido nítrico en el semen de sujetos con hipofertilidad. Tal vez, con una terapéutica antioxidante se mejore la capacidad fecundante del semen de los pacientes con este tipo de alteraciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A. 2004. Role of antioxidants in the treatment of men infertility: an overview of the literature. *RBM Online.*, 8: 616-627.

Agarwal, A.; Saleh, R. y Bedaiwy, M. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.*, 79(1): 829-843.

Agbaje, I.; Rogers, D.; McVicar, C. 2007. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum. Reprod.*, 22(7): 1871-1877.

Aitken, J. y Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, 16(1): 259-267.

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

Alvarez, J. y Storey, B. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 42: 334-346.

AOAC N° 973.31. 1990. Nitrites in cured meat. Colorimetric methods. *JAOAC*. 56:922.

Awad, H.; Halawa, F.; Mostafa, T. 2006. Melatonin hormone profile in infertile males.

*Int. J. Androl.*, 29: 409-413.

Badade, Z.; Kavita, M. y Jayashree, N. 2011. Oxidative stress adversely affects spermatogenesis in male infertility. *Biomed. Research*, 22(3): 323-328.

Baker, M.; Hetherington, L. y Aitken, R. 2006. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosinekinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J. Cell. Sci.*, 119: 3182-3192.

Barja, L. y Berrios, L. 2003. *Alteraciones de esperatograma en varones que acudieron por infertilidad de pareja a la unidad de reproducción humana del hospital Edgardo Rebagliati Martins*. Trabajo de postgrado. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Basmadji, G. 2009. *Concentraciones de plomo y de zinc en suero sanguíneo y en semen y su relación con la fertilidad masculina en estudiantes*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Baumber, J.; Ball, B.; Gravance, C.; Medina, V. y Davies, M. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, 21(1): 895-902.

Bennetts, L.; De Iuliis, G. y Nixon, B. 2008. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities.

*Mutat. Res.*, 641: 1-11.

Beutler, E.; Duron, O. y Mikus, B. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61(1): 882-888.

Botero, J.; Jubiz, A. y Henao, G. 2004. *Obstetricia y ginecología*. Séptima edición. Corporación para Investigaciones Biológicas.

Brookes, P.; Yoon, Y.; Robotham, J.; Andrews, M. y Sheu, S. 2004. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 287: 817-833.

Coggins, M. y Bloch, K. 2007. Nitric oxide in the pulmonary vasculature, arteriosclerosis. *Thromb. Vasc. Biol.*, 27: 1877-1885.

Darab, M.; Mohammad, A.; Hossein, K.; Mohammadali, S.; Gholamhossein, N. y Fateme, E. 2005. Comparison of nitric oxide concentration in seminal fluid between infertile patients with and without varicocele and normal fertile men. *J. Urol.*, 2(2): 106-110.

- De Abajo, F. 2001. La declaración de Helsinki VI. *Rev. Esp. Salud Pública.*, 75: 407-420.
- De Iuliis, G.; Newey, R.; King, B. y Aitken, R. 2009. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa *in vitro*. *PLoS ONE.*, 4(7): 6446.
- Donnelly, E.; Lewis, S.; Thompson, W. y Chakravarthy, U. 1997. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Rev. Mol. Hum. Reprod.*, 3(9): 755-762.
- Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Biochem. Biophys. Arch.*, 82: 70-77.
- Eskiocak, S.; Gozen, A.; Yapar, S.; Tavas, S.; Kilic, A. y Eskiocak, M. 2005. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. *Human Reproduction.*, 20(9): 2595-2600.
- European Society for Human Reproduction and Embryology. 2006. "Un estudio relaciona los niveles altos de óxido nítrico a la infertilidad y daño del ADN espermático." *ScienceDaily*. <<http://translate.google.co.ve/translate?hl=es&sl=en&tl=es&u=http%3A%2F%2Fwww.sciencedaily.com%2F2006%2F06%2F06%2F060620082951.htm>>(17/11/ 2011).
- Furchgott, R. y Zawadzki, J. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.
- Gadella, B.; Rathi, R.; Brouwers, J.; Stout, T. y Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 68(1): 249-265.
- Gallardo, J. 2007. Evaluación del sistema antioxidante en semen normal. *Rev. Invest. Clín.*, 59(1): 42-47.
- Garrido, N.; Meseguer, M. y Simon, C. 2004. Proxodatoxivo and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. *Asian J. Androl.*, 6(1): 59-65.
- Gómez, E.; Irvine, D. y Aitken, R. 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int. J. Androl.*, 21: 81-94.
- Grosso, G. 2001. *Correlación entre las concentraciones de Mg, Cr, Cu, Zn y Se con la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, en jóvenes diabéticos*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Harukuni, I. y Bhardwaj, A. 2006. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol. Clin.*, 24: 1-21.

Hernández, J.; Garbisu, C.; Becerril, J.; Barrutia, O.; García, J.; Zhao, F. y McGrath, S. 2006. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant. Cell. Environ.*, 29(7): 1422-1429.

Hicks, J. 2001. *Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill. México.

Hurford, W. 2003. *Inhaled Nitric Oxide: Current Concepts*. The American Society of Anesthesiologists.

Iraj, A.; Nasrin, S. y Rezvan, N. 2007. Nitric oxide level in seminal plasma and its relation with sperm DNA damages. *Irán Biomed. J.*, 11(4): 259-264.

Iwasaki, A. y Gagnon, C. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertility patients. *Fertil Steril*, 57(2): 409-416.

James, S.; Cutler, P.; Melnyk, S.; Jernigan, S.; Janak, L.; Gaylord, D. y Neubrandner, J. 2004. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 1611-1617.

Jurczuk, M.; Moniuszko, J. y Brzóška, M. 2006. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicol.*, 219(1-3): 11-21.

Kanner, J.; Harel, S. y Granit, R. 2001. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 289: 130-136.

Knapen, M.; Zusterzeel, P.; Peters, W. y Steegers, E. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 82: 171-184.

Koppers, A.; De Iuliis, G.; Finnie, J.; McLaughlin, E. y Aitken, R. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93: 3199-3207.

Lewis, S.; Boyle, P.; McKinney, K.; Young, I. y Thompson, W. 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril.*, 64: 868-870.

Mendeluk, G. y Chiavetta, L. 2005. Estudio básico de semen en el Hospital J. M. Ramos Mejía. Reporte de cien casos. *Rev. Hosp. J. M. Ramos Mejía.*, 10(2): 1-3.

Moustafa, M.; Sharma, R.; Thornton, J.; Mascha, E.; Abdel, M. y Thomas, A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod.*, 19(1): 129-138.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1987. *Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. *Bioética*. Principios éticos para los investigadores en seres humanos. Publicación científica. OPS-OMS.

Ozdamar, A.; Soyulu, A. y Culha, M. 2004. Testicular oxidative stress: effects of experimental varicocele in adolescent rats. *Urol. Int.*, 73: 343-347.

Padrón, R.; Fernández, G. y Gallardo, M. 1998. Interpretación del análisis seminal. *Rev. Cubana Endocrinol.*, 9(1): 81-90.

Paul, C.; Murray, A.; Spears, N. y Saunders, P. 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*, 136:73-84.

Piña, B.; Solís, M.; Rojas, A.; Urióstegui, M. y Quintanilla, B. 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 216: 216-224.

Plante, M.; Lamirandee, E. y Gagnon, C. 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril.*, 62(1): 387-393.

Poirot, C. y Cherruau, B. 2005. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.*, 39(2): 225-241.

Politch, J.; Wolff, H.; Hill, J. y Anderson, D. 1993. Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertil Steril.*, 60(1): 372-375.

Raijmakers, M.; Roelofs, H.; Steegers, E.; Steegers-Theunissen, R.; Mulder, T.; Knapen, M.; Wong, W. y Peters, W. 2003. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril.*, 79: 169-172.

Reyes, R. 1999. Las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Rev. Med.*, 24(6): 366-371.

Roesijadi, G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Tox.*, 22(2): 81-114.

- Rojas, M.; Suarez, M. y Lemus, M. 2004. Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia. *Rev. Med.*, 29(1): 556-561.
- Salabarría, M.; Aganza, O.; Guzmán, A.; Ortiz, A. y De la torre, A. 2006. La infección y su interacción en la reproducción. *Rev. Int. Androl.*, 4(3): 98-135.
- Salazar, R.; Perez, R. y Leon, A. 2009. Determinación de tioles totales y tioles solubles en ácido en el pez *colossoma macropomum* (cuvier, 1818) expuesto a cadmio. *Rev. Cient.*, 19(4): 414-420.
- Smith, G.; Kaune, G. y Parodi, C. 2007. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility: relationship with oxidative stress. *Rev. Med. Chil.*, 135: 279-286.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1981. *Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Ediciones Blume. H. Madrid. España.
- Tessari, P. 2007. Acute effect of insulin on nitric oxide synthesis in humans: a precursor-product isotopic study. *Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293: 776-782.
- Thiele, J.; Freisleben, H.; Fuchs, J. y Ochsendorf, F. 1995. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.*, 10: 110-115.
- Tosic, J. y Walton, A. 1946. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature*, 158: 485-485.
- Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation a toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.*, 1: 295-317.
- Visconti, P.; Moore, G. y Bailey, J. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a AMP-dependent pathway. *Development*, 121: 1139-1150.
- Wang, X.; Sharma, R.; Sikka, S.; Thomas, A.; Falcone, T. y Agarwal, A. 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.*, 80(1): 531-535.
- Wolf, H. 1995. The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.*, 63(2): 1143-1157.

Wolff, H.; Politch, J.; Martínez, A.; Haimovich, F.; Hill, J. y Anderson, D. 1990. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril.*, 53(2): 523-536.

World Health Organization (WHO). 1992. *Manual for the examination of human semen and sperm-cervical-mucus interaction*. Cambridge University Press, Cambridge (UK).

World Health Organization (WHO). 1999. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Fourth edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Zamoner, A.; Barreto, K. y Filho, D. 2007. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. *Mol. Cell Endocrinol.*, 267: 116-126.

Zayas, A.; Lázaro, E.; Monzón, G.; Pelaez, L. y Quintero, Y. 2000. Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Biomed.*, 19(3): 202-205.

Zini, A.; Delamirande, E. y Gagnon, C. 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase - like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 16: 183-188.

**APÉNDICE**  
**CONSENTIMIENTO VÁLIDO**

Bajo la coordinación del Dr. Anibal lobo, profesor del área de Histología adscrito al departamento de Bioanálisis de la Escuela de Ciencias de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre; y la Dra. Raquel Salazar, encargada del laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad de Postgrado de Biología Aplicada, ubicado en cerro del medio de la Universidad de Oriente Núcleo-Sucre, se realizara el proyecto de investigación titulado: “INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA INFERTILIDAD EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES VARONES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO SUCRE”.

Yo: \_\_\_\_\_  
C.I.: \_\_\_\_\_ Nacionalidad: \_\_\_\_\_  
Estado civil: \_\_\_\_\_ Domiciliado: \_\_\_\_\_

---

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio indicado, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: "INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA INFERTILIDAD EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES VARONES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO SUCRE".
2. Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado es: Evaluar la influencia del estrés oxidativo sobre la infertilidad en estudiantes varones de la Universidad de Oriente, Núcleo Sucre.
3. Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación en el trabajo es: donar de manera voluntaria una muestra de líquido seminal, la muestra será obtenida por el estudiante, en las instalaciones de laboratorio de Histología del departamento de Bioanálisis.
4. Que la muestra de líquido seminal que acepto donar será utilizada única y exclusivamente para determinar la actividad de enzimas y moléculas antioxidantes como: óxido nítrico (NO), metalotioninas (MT), glutatión (GSH) y los tioles totales

(TT).

5. Que el equipo de personas que realizan esta investigación coordina por el Dr. Anibal Lobo, me ha garantizado confiabilidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto a mi participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
7. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo e inconveniente alguno para mi salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas.
9. Que bajo ningún concepto se ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

#### DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

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

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en las muestras de líquido seminal que acepto donar para los fines indicados anteriormente.
2. Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

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

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

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

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

## DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

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

1. Por el proyecto "INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA INFERTILIDAD EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES VARONES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO SUCRE".

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

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

**APÉNDICE**  
**ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA**

Lugar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Muestra N°** \_\_\_\_\_

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

C.I.: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Días de abstinencia: \_\_\_\_\_ Hora de recolección de la muestra: \_\_\_\_\_

Dirección de residencial: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Especialidad y tiempo que tiene estudiando en la UDO-Sucre: \_\_\_\_\_

1. ¿Ha trabajado usted antes o durante de ingresar a la Universidad de Oriente?

SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

En caso de ser afirmativa su respuesta, indique el tipo de actividad en su trabajo y si fue, es realizada actualmente o fue y sigue siendo su trabajo:

\_\_\_\_\_

2. ¿posee usted en este momento una pareja sexual estable?

SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

3. ¿Tiene usted Hijos? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

3.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique cuantos: \_\_\_\_\_

3.2. En caso de ser negativa su respuesta, indique si a intentado tener hijos y no lo ha logrado: \_\_\_\_\_

4. ¿Tiene usted antecedentes familiares de infertilidad? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

5. ¿Ha padecido o padece alguna enfermedad de transmisión sexual?

SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

5.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique cuál de estas:

Sífilis: \_\_\_\_\_ Gonorrea: \_\_\_\_\_ Candidiasis: \_\_\_\_\_ Chlamydia: \_\_\_\_\_

Chancro: \_\_\_\_\_ Otra(s): \_\_\_\_\_

6. ¿presenta usted varicoceles? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

6.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique ha sido usted operado.

SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_ y de ser afirmativa su respuesta señale cuál de ellas e

indique al menos el año de la operación: Varicoceles: \_\_\_\_\_

Vasectomía: \_\_\_\_\_ Otra(s): \_\_\_\_\_

7. ¿Presenta usted algún trastorno endocrino? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

7.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique cuál de estos:

Hipopituitarismo: \_\_\_\_\_ Hipertiroidismo: \_\_\_\_\_ Hipotiroidismo: \_\_\_\_\_

Diabetes: \_\_\_\_\_ Otra(s): \_\_\_\_\_

8. ¿Actualmente se encuentra bajo tratamiento médico? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

8.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, especifique:

\_\_\_\_\_

9. ¿fuma usted cigarrillos o algún tipo de tabaco? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

9.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, especifique e indique con qué frecuencia lo

hace: Todos los días de la semana: \_\_\_\_\_ Dos o tres días por semana: \_\_\_\_\_

Cada quince días: \_\_\_\_\_ Una vez al mes: \_\_\_\_\_.

10. ¿Consume usted bebidas alcohólicas? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

10.1. . En caso de ser afirmativa su respuesta, indique con qué frecuencia lo hace:

Todos los días de la semana: \_\_\_\_\_ Dos o tres días por semana: \_\_\_\_\_ Cada

quince días: \_\_\_\_\_ Una vez al mes: \_\_\_\_\_.

11. ¿Consumo o ha consumido usted algún tipo de estupefacientes?

SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

11.1. . En caso de ser afirmativa su respuesta, indique con qué frecuencia lo hace o lo hizo: Con frecuencia: \_\_\_\_\_ Eventualmente: \_\_\_\_\_ Casi Nunca: \_\_\_\_\_.

12. ¿Se encuentra usted en situaciones de estrés? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

12.1. . En caso de ser afirmativa su respuesta, indique con qué frecuencia:

Siempre: \_\_\_\_\_ Con frecuencia: \_\_\_\_\_ Eventualmente: \_\_\_\_\_

Casi Nunca: \_\_\_\_\_.

13. indique si usted consume los siguientes alimentos:

Tipo de Alimento	Si	No	En caso de ser afirmativa su respuesta, indique con qué frecuencia lo hace:				
			Todos los días	2-3 veces por r semana	Cada 15 días	1 vez al mes	Nunca
Pescado y Mariscos							
Carne de res							
Pollo, especialmente muslos y patas							
Hígado de ternera							
Leche o Yogur							
Jugo de Naranja							
Papas							
Habas							
Frijoles							
Garbanzos							
Productos enlatados							
Comida Rápida o chatarra							

14. ¿Ha vivido o vive cerca de una fuente de contaminación de plomo (fabrica de pintura, imprenta, taller mecánico, estación de servicio, recuperación de baterías u otros)? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

14.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique ¿Cuánto tiempo y que tipo de fuente de contaminación? \_\_\_\_\_

Por medio de la presente, hago constar que he dado mi consentimiento para que los datos aquí recopilados sean usados con fines de investigación.

---

Paciente

## APÉNDICE

### RECOMENDACIONES Y CONDICIONES PARA UNA BUENA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL

1. Es recomendable la asepsia de los genitales antes de la toma de la muestra.
2. Es necesaria tener una abstinencia sexual entre 3-5 días para el momento de la toma de muestra.
3. Es recomendable una abstinencia alcohólica de entre 5-7 días.
4. Para el momento de la toma de la muestra el paciente no debe de estar tomando antibióticos, ni haber presentado fiebre, algún proceso viral o bacteriano; pues ello interfiere en forma negativa en los resultados.
5. Los frascos usados para la recolección de la muestra de semen deben ser de boca ancha, con la finalidad de facilitar y evitar cualquier derrame o pérdida de la muestra durante su recolección.
6. La muestra debe ser obtenida por masturbación directamente en el envase de plástico estéril entregado por el personal encargado de realizar el análisis.
7. La muestra debe llegar al laboratorio la antes posible, nunca después de los 30-45 minutos, razón por la cual se recomienda que la toma de la muestra sea realizada en el mismo laboratorio.

## APÉNDICE

### DATOS REFERENTES A LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL

1. ¿Cumplió usted con los días de abstinencia sexual recomendados para la toma de la muestra? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

1.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique ¿cuantos días de abstinencia sexual tuvo? \_\_\_\_\_.

2. ¿Cumplió usted con los días de abstinencia alcohólica recomendados para la toma de muestra? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

2.2. En caso de ser afirmativa su respuesta, indique ¿cuantos días de abstinencia alcohólica tuvo? \_\_\_\_\_.

3. ¿Cumplió usted con las normas de asepsia recomendados para la toma de muestra? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

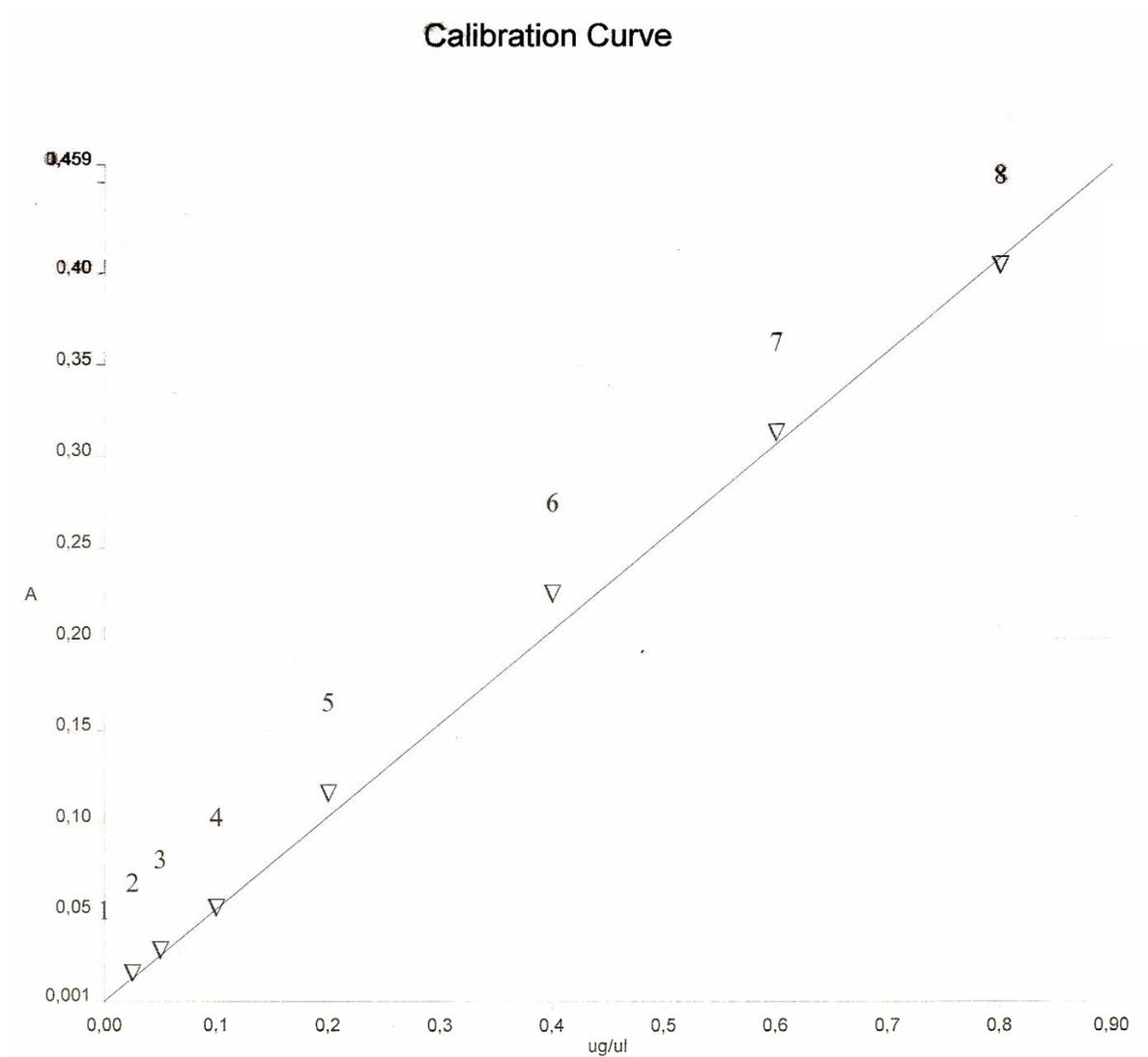
4. ¿La muestra de líquido seminal fue tomada directamente en un envase estéril de boca ancha? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

5. ¿Durante la recogida de la muestra se le derramó alguna porción de la misma? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_.

5.1. En caso de ser afirmativa su respuesta, especifique ¿Qué porción del eyaculado derramo?: Primera porción: \_\_\_\_\_ Porción intermedia: \_\_\_\_\_ Última porción: \_\_\_\_\_

## APÉNDICE

Curva de calibración de Óxido Nítrico.



Spectrum Name: ONestand

Description:  $y = 1.306468e-03 + 5.090751e-01 * x$

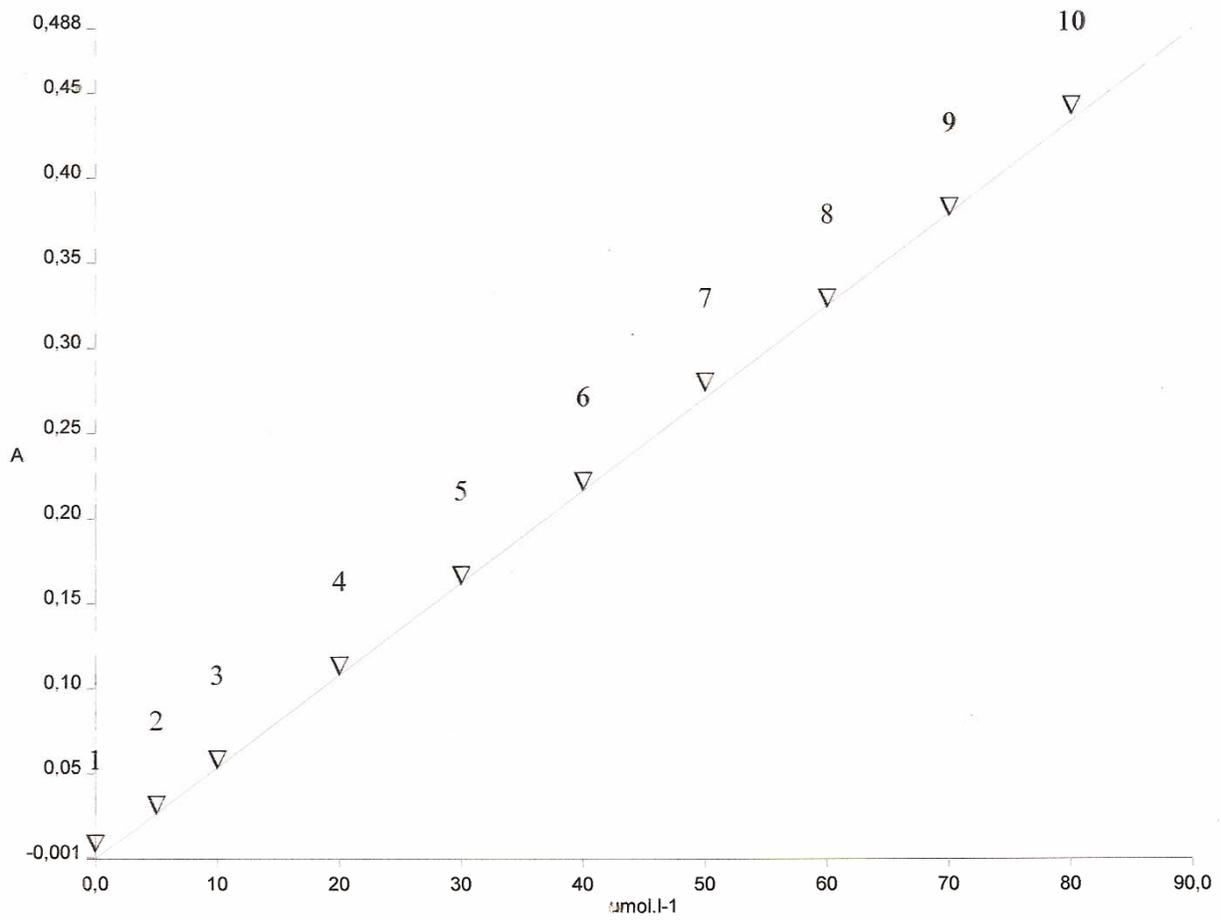
Comments: RE = 8.370038e-03, CC = 9.986983e-01

Date Created: Mon Sep 22 12:23:44 2008

# APÉNDICE

Curva de calibración de Tioles totales.

Calibration Curve



Spectrum Name: ctioles7

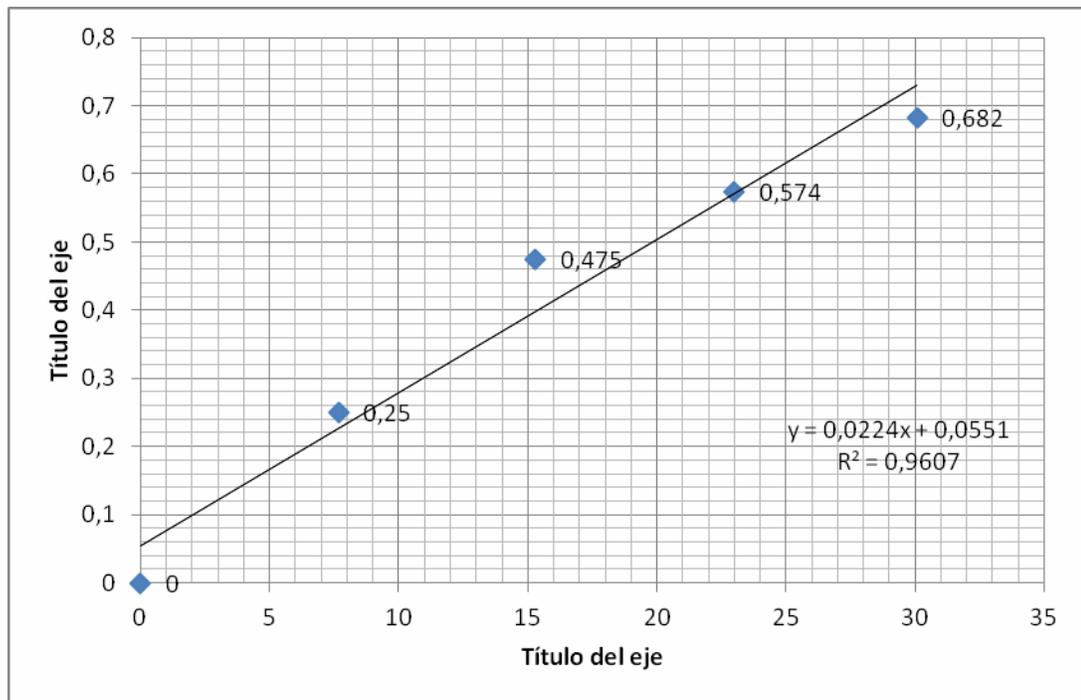
Description:  $y = -7.303696e-04 + 5.430805e-03 * x$

Comments: RE = 2.313317e-03, CC = 9.998978e-01

Date Created: Mon Oct 13 10:00:04 2008

## APENDÍCE

Curva de calibración para glutatión y metalotioninas.



0	7,7	15,3	23	30,08	38,4 $\mu\text{g/ml}$ GSH
0	0,25	0,475	0,574	0,682	0,708

## ANEXOS

Factores de corrección para hemocitometría.

Dilución ( $\mu$ l) Semen+diluyente	Número de cuadrados grandes contados		
	25	10	5
1+9	10	4	2
1+19	5	2	1
1+49	2	0,8	0,4

## ANEXO

Medias, desviaciones estándar, valores mínimos y máximos entre individuos normozoospermicos y tipo de alteración, según concentración de tioles total, óxido nítrico, glutatión y metalotioninas, en estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tipo de Alteración	Normo	Asteno	Oligo	Oligoastenos
N	68	12	11	9
<b>Tioles totales (<math>\mu\text{mol/l-1}</math>) <math>\log_{10}</math></b>				
IC <sub>95%</sub> $\bar{X}$	1,4814	1,5632	1,4752	1,4440
IC <sub>95%</sub> DS	0,1994	0,2533	0,2458	0,1492
IC <sub>95%</sub> Valor min	1,0631	1,3232	1,2085	1,2287
IC <sub>95%</sub> Valor max	2,2396	2,2818	2,0162	1,6350
<b>Óxido nítrico (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) <math>\log_{10}</math></b>				
IC <sub>95%</sub> $\bar{X}$	0,7842	0,8620	0,7418	0,6501
IC <sub>95%</sub> DS	0,2061	0,2226	0,2407	0,1901
IC <sub>95%</sub> Valor min	0,2983	0,5594	0,2189	0,2734
IC <sub>95%</sub> Valor max	1,2793	1,3834	1,0610	0,9108
<b>Glutatión (mmol/ml)</b>				
IC <sub>95%</sub> $\bar{X}$	3,3246	3,2506	3,4122	3,5498
IC <sub>95%</sub> DS	0,4986	0,2403	0,5280	0,4190
IC <sub>95%</sub> Valor min	2,4985	2,9344	2,7036	3,0882
IC <sub>95%</sub> Valor max	4,7549	3,6779	4,5754	4,3190
<b>Metalotioninas (mmol/ml)</b>				
IC <sub>95%</sub> $\bar{X}$	0,0202	0,0183	0,0231	0,0206
IC <sub>95%</sub> DS	0,0041	0,0041	0,0023	0,0039
IC <sub>95%</sub> Valor min	0,0114	0,0121	0,0201	0,0135
IC <sub>95%</sub> Valor max	0,0267	0,0246	0,0261	0,0254

IC<sub>95%</sub>  $\bar{X}$  : intervalos de confianza del 95% para la media; Normo: Normozoospermicos; Asteno: Astenozoospermicos; Oligo: Oligozoospermicos y Oligoastenos: Oligoastenozoospermicos

## ANEXO

Prueba *a posteriori* (LSD), de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis 2009

Alteraciones espermáticas	N	$\bar{x}$ ( MTS, mmol/ml)	Grupos Homogéneos
Normozoospermicos	68	0,0202	X
Astenozoospermicos	12	0,0183	X
Oligozoospermicos	11	0,0231	X
Oligoastenozoospermicos	9	0,0206	XX

LSD: diferencia mínima significativa; N: número;  $\bar{x}$  : media.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Influencia del estrés oxidativo sobre la infertilidad en un grupo de estudiantes varones de la universidad de oriente, núcleo Sucre
Subtítulo	

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
ESTRADA P., ANGGE M	CVLAC	15 740 721
	e-mail	anggestrand@hotmail.com
	e-mail	anggeestrada@gmail.com

#### Palabras o frases claves:

Líquido seminal, infertilidad masculina, espermatograma, células peroxidasa positiva, estrés oxidativo, ERO (especies reactivas del oxígeno) óxido nítrico, tioles totales, glutatión y metalotioninas.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Se evaluó la calidad espermática y el estrés oxidativo en plasma seminal, en un grupo de 100 estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. A cada participante se le tomó muestra de sangre por punción venosa y se recolectó muestra de líquido seminal. En el estudio, el 68,00% de los estudiantes fueron normozoospermicos y la calidad espermática resultó estar afectada en el 32,00% de la población estudiada, clasificándose en individuos que presentaron astenozoospermia, oligozoospermia y oligoastenozoospermia, obteniéndose como frecuencias 12,00%, 11,00% y 9,00%, respectivamente. La edad promedio en los estudiantes normozoospermicos y con astenozoospermia, oligozoospermia y oligoastenozoospermia fue de  $24,12 \pm 4,49$ ;  $24,83 \pm 7,22$ ;  $20,91 \pm 2,34$  y  $25,44 \pm 9,25$ , respectivamente. Las variables tiempo de licuefacción, volumen, pH y morfología se encontraron dentro de los valores de referencia, según valores establecidos por la OMS. Las células peroxidasa positiva tuvieron un valor promedio de 0,05 millones/ml, resultando no significativa, por ser su valor inferior a 1 millón/ml. La producción de óxido nitroso (ON), tioles totales (TT), concentración de glutatión (GSH) y concentración de metalotioninas (MTS) fueron medidas mediante métodos espectrofotométricos. Al aplicar el análisis de varianza para metalotioninas, se demostró que existían diferencias significativas entre los valores de concentración de MTS en los grupos estudiados, el análisis *a posteriori* demostró que se formaban dos grupos superpuestos: uno entre los individuos astenozoospermicos, normozoospermicos y oligoastenozoospermicos y el otro, entre los oligoastenozoospermicos y los oligozoospermicos. Al aplicar el análisis de regresión lineal simple, se encontró una relación positiva débil entre las variables motilidad y la concentración de ON en el grupo de los normozoospermicos, lo que sugiere que a medida que aumenta la concentración de ON aumenta la motilidad espermática en los normozoospermicos. Entre la concentración de TT y la concentración espermática en estudiantes normozoospermicos, se encontró asociación estadísticamente significativa; el coeficiente de correlación ( $r$ ) indicó una relación positiva débil entre las variables, lo que sugiere que a medida que aumenta la concentración de TT aumenta la concentración espermática en los normozoospermicos. El coeficiente de correlación ( $r$ ) indicó una relación negativa moderada entre las variables GSH y concentración en el grupo oligozoospermicos, a medida que aumenta la concentración de GSH disminuye la concentración espermática en estudiantes oligozoospermicos. La inclusión de parámetros tales como MTS, TT, GSH y ON en los estudios de infertilidad masculina podrían ser considerados en la evaluación de la infertilidad masculina dada su relación directa con el estrés oxidativo.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Raquel Salazar	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	5 855 836
	<b>e-mail</b>	raquelugove@yahoo.com
	<b>e-mail</b>	
Aníbal Lobo	<b>ROL</b>	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	2 627 040
	<b>e-mail</b>	palobol@cantv.net
	<b>e-mail</b>	
Gilda Millán	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	4 692 369
	<b>e-mail</b>	gildamg@gmail.com
	<b>e-mail</b>	
Henry De Freitas	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	3 660 006
	<b>e-mail</b>	hendef@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2013	03	13
------	----	----

Lenguaje: SPA

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

**Archivo(s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
Tesis-EstradaA.doc	Aplication/Word

**Alcance:**

**Espacial:** (Opcional)

**Temporal:** (Opcional)

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

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciatura

**Área de Estudio:** Bioanálisis

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

Universidad de Oriente,

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

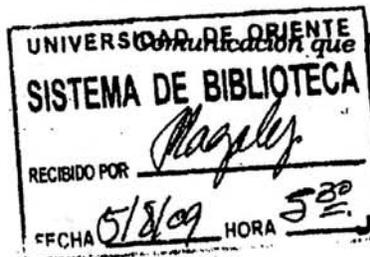
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNPEL**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

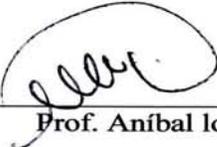
**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Angge Mariel Estrada Petriglia



Profa. Raquel Salazar



Prof. Anibal lobo



Profa. Gilda Millán



Prof. Henry De Freitas