

Instituto Nacional de Endocrinología
Hospital "Comandante Manuel Fajardo"

RELACIÓN ENTRE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO, LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS EN PACIENTES INFÉRTILES

Lic. Giovanna Pereira, Dra. Marlén Gallardo, Dr. Rubén Padrón, Dra. María Victoria Barrios, Lic. Arturo Reyes, Dra. Enma Domínguez, Dr. Ramón Fragas, Téc.. Irma Montalbán y Téc. Blanca Nurques

RESUMEN

Se estudiaron, con previo consentimiento, 32 pacientes en edades entre 20 a 45 años que acudieron consecutivamente a la consulta de infertilidad; como grupo control 9 hombres sanos con espermograma estándar normal; se investigaron los parámetros seminales incluidos fosfatasa ácida y leucocitospermia según recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, indicadores del estrés oxidativo. La media y la mediana calculadas para cada una de las variables estudiadas estuvieron dentro de los límites de normalidad establecidos, solo el valor de *colesterol immune* fue patológico. Existió asociación positiva significativa entre los valores de colesterol inmune y la variable espermograma patológico ($p < 0,05$). Al dicotomizar las variables *colesterol immune*, colesterol total, y triglicéridos en normales y patológicos se obtuvo que 100, 83,3, y 87,5 % de los casos con hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y niveles elevados de autoanticuerpos antiLDL oxidada tenían un espermograma anormal. Los resultados del estudio de regresión logística arrojaron al *colesterol immune* como predictor verdadero de espermograma patológico. Las alteraciones en los niveles de autoanticuerpos anti LDL oxidada, colesterol total y triglicéridos en hombres infértiles son de los indicadores bioquímicos estudiados, los de mayor frecuencia en pacientes con espermograma anormal, y pudieran estar relacionados con el trastorno reproductivo.

DeCS: ESTRÉS OXIDATIVO; LÍPIDOS; LIPOPROTEÍNAS; INFERTILIDAD.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) intervienen en la fusión espermatozoide-ooocito, lo que facilita la reacción acrosómica y la unión al oocito, y ayuda así a su fertilización. Sin embargo; cuando los

niveles de EROs son elevados se han identificados casos de infertilidad masculina, debido al desbalance entre producción de EROs y componentes antioxidantes.¹⁻⁴ La peroxidación lipídica y la acumulación de

peróxido lipídico en la membrana del espermatozoide son iniciados por las EROs, las cuales causan una reducción en la movilidad y viabilidad del espermatozoide. En el eyaculado de hombres fértiles y azoospermicos no se han encontrado niveles detectables de EROs.⁵⁻⁷

También se han estudiado pacientes con hiperlipoproteinemia primaria, en los cuales se ha encontrado una correlación positiva entre niveles elevados de colesterol total y/o triglicéridos y la presencia de espermograma anormal, lo que sugiere que ambos metabolitos provocan efectos adversos en la calidad del semen, especialmente en la viabilidad del espermatozoide.^{8,9}

El propósito de este trabajo fue conocer de forma preliminar los niveles en suero de algunos indicadores de estrés oxidativo y del lipidograma en pacientes con espermograma patológico mediante la determinación de la posible asociación de los niveles de autoanticuerpos antiLDLox (*cholesterol immune*), ácido úrico y albúmina en suero sanguíneo de pacientes infértiles con espermograma patológico (azoospermicos, oligozoospermicos), y de la relación de los niveles de lípidos y lipoproteínas en suero sanguíneo de pacientes infértiles con espermograma patológico.

MÉTODOS

GRUPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo transversal en una muestra de 32 pacientes en edades entre 20 y 45 años con espermograma patológico (azoospermicos y oligozoospermicos) que acudieron consecutivamente a la consulta de infertilidad del Instituto Nacional de Endocrinología (INEN). Como grupo control se utilizaron 9 hombres sanos, con espermograma estándar normal.

ESTUDIO SEMINAL

Se realizó el espermograma luego de 3 a 5 d de abstinencia sexual. La recogida de la muestra se hizo por masturbación, el semen se recogió en un frasco de boca ancha, estéril, con tapa de rosca, de esa forma se evita la pérdida de parte del eyaculado y la muestra fue analizada entre los 30 y 60 min después de obtenida.

En el semen se determinó el volumen del eyaculado, el conteo de espermatozoides por mililitro, el conteo de espermatozoides por eyaculado total, el pH, la movilidad, la viabilidad, la morfología normal, la migración en medio artificial de alta densidad y la bioquímica seminal, según la metodología recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992).

Después de un ayuno de 12 h se extrajeron 10 mL de sangre venosa, recogida en un tubo seco sin anticoagulante. Las muestras así se pusieron en incubadora a 37 °C, para provocar la retracción del coágulo, después de lo cual se centrifugaron a 2 000 rpm en una centrífuga Rotanta, durante 10 min.

Se separó el suero de cada muestra, y se guardó en tubos eppendorf a 4 °C, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

Colesterol total (CT), y triglicéridos (Tg), se determinaron por método enzimático colorimétrico, las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) se determinó después de la precipitación con fosfotungstato/Mg⁺⁺ de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), según las instrucciones del fabricante (HUMAN).

Los valores de c-LDL fueron estimados usando la fórmula de Friedewald. Esta fórmula puede ser utilizada cuando los valores de triglicéridos son menores de 4,5 mmol/L.

La apo A1 y B fueron cuantificadas por un método inmunturbidimétrico del fabricante (HUMAN).

El complejo inmune circulante anti-LDL oxidada (*colesterol inmune*) fue precipitado del suero sanguíneo combinando volúmenes iguales de suero con polietilenglicol de 6000 (PEG) 5 %, la mezcla fue incubada en un baño termostático a 18 °C durante 18 h. El complejo fue sedimentado por centrifugación a 6 000 rpm, durante 30 min. El precipitado fue lavado 3 veces con PEG 2,5 %. El colesterol contenido en el complejo inmune precipitado fue determinado utilizando el método descrito de determinación de colesterol total en el trabajo.

La albúmina y el ácido úrico en suero fueron determinados por el método comercial de la HUMAN.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS.

Se calcularon estadígrafos descriptivos (media, mediana, desviación estándar, valor máximo y mínimo) de las variables cuantitativas, y distribución de frecuencia de las variables cualitativas. Se compararon las variables del lipidograma, albúmina, ácido úrico y el colesterol total de los pacientes con espermograma patológico y sujetos sanos aplicando el test de Wilcoxon

MannWhitney U. Se realizó un análisis multivariado de regresión logística, variable respuesta presencia o no de espermograma patológico.

RESULTADOS

Las características generales del grupo de pacientes estudiados, la edad promedio fue de 31,5 años, para el grupo control de 34,2 años. De los 32 pacientes con espermograma patológico 21 tenían leucocitospermia (según indicadores de la OMS), esto representa 66 % de la muestra estudiada.

En la figura 1 se reflejan los resultados del estudio de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas realizado a los pacientes con espermograma patológico (azoospermicos y oligozoospermicos), todos los parámetros lipídicos estuvieron dentro del rango de la normalidad, tanto en sujetos sanos como en los pacientes infértiles, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las variables estudiadas para una $p < 0,05$, solo los triglicéridos estuvieron más elevados en los pacientes infértiles que en el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

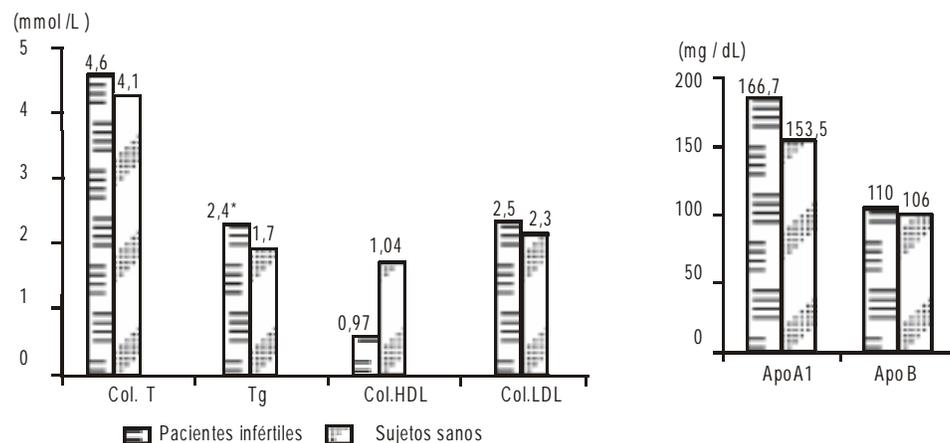


Fig. 1. Niveles de lípidos y lipoproteínas en pacientes infértiles vs. sujetos sanos.

De los parámetros del estrés oxidativo determinados en ambos grupos se encontró que el colesterol inmune en el grupo de pacientes infértiles el valor promedio fue de 15,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, según se muestra en la figura 2, el cual es más de 2 veces superior que el valor obtenido para los sujetos sanos, reflejando un valor patológico relacionado con las alteraciones ateroscleróticas. Se encontró una asociación positiva entre el colesterol inmune y el espermograma patológico, y una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los pacientes infértiles y el grupo control.

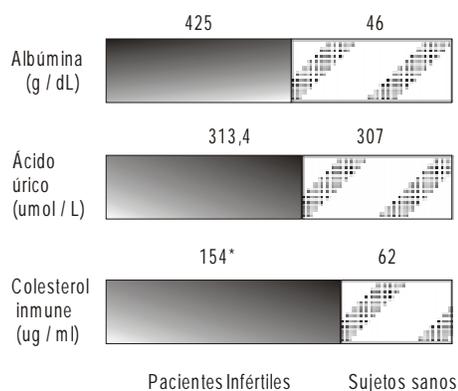


Fig. 2. Niveles de algunos indicadores del estrés oxidativo en pacientes infértiles (espermograma patológico) vs. sujetos sanos.

Al dicotomizar las variables colesterol inmune, colesterol total, y triglicéridos en normales variable y patológicos, se obtuvo que 100 % de los casos con colesterol inmune patológico tenía un espermograma patológico, que 83,2 % de los casos con colesterol total patológico tenían un espermograma patológico, y que 87,5 % de los casos con triglicéridos elevados tenía espermograma patológico (tabla).

El estudio de regresión logística arrojó al colesterol inmune como predictor verdadero de espermograma patológico y por ende de trastornos en la fertilidad masculina.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han incrementado el número de investigaciones básicas, clínicas y epidemiológicas en el campo de los lípidos, y las lipoproteínas relacionadas con la fertilidad humana. Los resultados obtenidos demostraron que pacientes con hiperlipoproteinemia por niveles elevados de colesterol y/o triglicéridos generalmente tienen un espermograma patológico presente, provocando efectos adversos en la calidad del semen, y están en franca correspondencia con los resultados obtenidos por Padrón y otros en 1988. Esto sugiere que en

TABLA. Resultados en porcentaje de las variables colesterol inmune, colesterol total y triglicéridos, dicotomizadas en normales y patológicas

Espermograma	Colesterol inmune patológico		Colesterol total patológico		Triglicéridos patológicos	
	(> 15 mg/mL)	(n= 11)100 %	(> 5,2 mmol/L)	(n= 5)83,3 %	(> 2,3 mmol/L)	(n= 7) 87,5 %
Resultados						
Patológico						
Normal				(n= 1)16,7 %		(n= 1) 12,5 %

este desorden pueden estar involucradas alteraciones sutiles en la función del axón hipotálamo-hipófisis-gonadal que no son evidentes en condiciones basales.

Estos resultados indican que los desórdenes en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas son más frecuentes en pacientes infértiles con daños severos en la espermatogénesis, asociados con una calidad pobre del semen.

En la literatura se ha descrito que los espermatozoides, neutrófilos y macrófagos activados generan especies reactivas de oxígeno que producen la peroxidación de los lípidos. Ante un exceso de EROs se desequilibra el sistema antioxidante del plasma seminal, y debido al estrés oxidativo la

peroxidación lipídica es desmedida, dañando la estructura, integridad y funcionalidad de las membranas. De los parámetros del estrés oxidativo estudiados, los niveles de anticuerpos antiLDL oxidada estuvieron fuera de los límites de la normalidad, existió asociación positiva significativa entre los valores de este parámetro y el triglicérido y la variable espermograma patológico.

Las alteraciones de los niveles de autoanticuerpos antiLDL oxidada, colesterol total, y triglicéridos en hombres infértiles son de los indicadores bioquímicos estudiados, los más frecuentes en pacientes con espermograma anormal y pudieran estar relacionadas con el trastorno reproductivo.

SUMMARY

32 patients aged 20-45 who attended the infertility office consecutively were studied with their previous consent. 9 sound men with normal standard spermogram were included in the control group. The seminal parameters, including acid phosphatase and leucocytospermia, which according to the World Health Organization are indicators of oxidative stress, were investigated. The mean and the median calculated for each of the studied variables were within the normal established limit. Only the value of immune cholesterol was pathological. There was a significant positive association between the values of immune cholesterol and the variable pathological spermogram ($p < 0.05$). On dichotomizing the variables immune cholesterol, total cholesterol and triglycerides into normal and pathological, it was obtained that 100, 83.3 and 87.5 % of the cases with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and elevated levels of anti oxidized LDL autoantibodies had an abnormal spermogram. The results of the logistic regression study considered immune cholesterol as the real predictor of pathological spermogram. The alterations of the levels of anti oxidized LDL autoantibodies, total cholesterol and triglycerides in infertile men are the most frequent in patients with abnormal spermogram among the studied biochemical indicators and they may be connected with the reproductive disorder.

Subject headings: OXIDATIVE STRESS; LIPIDS; LIPOPROTEINS; INFERTILITY, MALE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertility patients. *Fertil Steril* 1992;57(2):409-16.
2. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, LeLannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995;103:17-26.
3. Griveau JF, Renard P, LeLannou D. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Internat J Andrology* 1994;17:300-7.
4. Mazzilli F, Ronconi C, Rossi T, Dondero F, Marchesini M. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril* 1994;62(4):862-8.
5. Whittington K, Ford WC. Relative contribution of leucocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 1999;22:229-35.

6. Zalata A, Hafez T, Comhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 1995;10(6):1444-51.
7. Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, Mclaughlin EA, Hull MGR, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 1999;22:236-42.
8. Mendoza SG. Hypertriglyceridemia and hypoalipoproteinaemia in azoospermic and oligospermic young men. Relationships of endogenous testosterone to triglyceride and high density lipoprotein cholesterol metabolism. *Metabolism* 1981;30:481-3.
9. Padron RS, Mas J, Zamora R, Riverol F, Licea M, Mallea L, *et al.* Lipid and testicular function. *Int Urol Nephrol* 1989;21(5):515-9.

Recibido: 11 de octubre de 2001. Aprobado: 15 de diciembre de 2003.
Lic. *Giovanna Pereira*. Instituto de Endocrinología. Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.
Teléf: 320362, 327275