

Evaluación de la actividad antioxidante de suplementos dietéticos utilizados para mejorar la fertilidad masculina

Assessment of the antioxidant activity of commercial dietary supplements used to improve male fertility

Paloma Bermejo-Bescós, Irene Cuadrado-Berrocal, Juan Carlos Ortega-Cárdenas, Beatriz de las Heras
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la actividad antioxidante de cinco suplementos dietéticos comerciales (AndroMÁS®, Androferti®, Aquilea Fértil®, GestaDha®, Seidiferty®) utilizados para mejorar la fertilidad masculina. **Material y Métodos:** La actividad antioxidante se determinó mediante dos técnicas estandarizadas en la literatura para suplementos dietéticos: ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y el ensayo de captación de radical DPPH (diphenylpicryl-hydrazyl). Se analizaron dos lotes de cada suplemento (n=5/lote). **Resultados:** Los suplementos AndroMÁS y Seidiferty mostraron actividad antioxidante significativa ($p < 0,05$) en el ensayo ORAC con índices ORAC de 0,25 y 0,24 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ suplemento, respectivamente, valores comprendidos en el rango descrito en la literatura para suplementos dietéticos antioxidantes (0,0018-3,18 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ suplemento). AndroMÁS, Androferti y Seidiferty mostraron una significativa actividad captadora de radical DPPH ($p < 0,05$) con valores de inhibición de 97,2 %, 93,0 % y 60,5 %, respectivamente a una concentración de 0,5 mg/ml. **Conclusiones:** Este estudio sugiere que las propiedades antioxidantes mostradas por AndroMÁS y Seidiferty pueden contribuir a la eficacia terapéutica demostrada en infertilidad masculina.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2014; 31; 21-25 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: Infertilidad masculina, actividad antioxidante, ORAC, DPPH, suplementos dietéticos.

SUMMARY

Objective: To evaluate the antioxidant activity of five commercially available dietary supplements (AndroMÁS®, Androferti®, Aquilea Fértil®, GestaDha®, Seidiferty®) used to improve male fertility. **Ma-**

Aceptado 5/9/2014

Correspondencia: Beatriz de las Heras: Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España. Tel: +34913942276 Fax: +34913941726; e-mail: lasheras@ucm.es
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

terial and Methods: Antioxidant activities were determined using two analytical methods standardized in the literature for dietary supplements namely Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) scavenging radical assays. Two batches of each supplement were analyzed. **Results:** AndroMÁS and Seidiferty showed significant antioxidant properties ($p < 0.05$) as measured by the ORAC assay, with ORAC values of 0.25 and 0.24 μmol Trolox/mg supplement, within the range reported in the literature for dietary antioxidant supplements (0.018- 3.18 μmol Trolox equivalent/mg of supplement). The DPPH radical scavenging activity was highest in AndroMÁS, Androferti and Seidiferty (97.2%, 93.0% and 60.5%, respectively) at a concentration of 0.5 mg/ml. **Conclusions:** This study suggests that the antioxidant properties showed by AndroMÁS and Seidiferty could contribute to the therapeutic efficacy on male infertility.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2014; 31; 21-25 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: Male infertility, antioxidant activity, ORAC, DPPH, dietary supplements.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad masculina es un problema multifactorial sin causa identificable en un porcentaje significativo de casos, con un tratamiento complejo. Las alteraciones en la concentración de espermatozoides, así como su movilidad y morfología contribuyen a la patogenia de la infertilidad. En la última década se han identificado diversos factores como la contaminación ambiental o el estilo de vida con impacto negativo sobre la espermatogénesis, y por tanto, con gran repercusión sobre la infertilidad masculina, por su influencia sobre la calidad seminal (1-2).

El estrés oxidativo ha sido identificado como un factor destacado que contribuye a la reducción de la fertilidad masculina, demostrándose que, concentraciones elevadas de radicales libres de oxígeno, inducen procesos de peroxidación en las membranas de los espermatozoides, afectando a parámetros como la movilidad y morfología (3-5). La infertilidad se ha relacionado con un desequilibrio entre la generación de radicales libres de oxígeno y los sistemas antioxidantes naturales. Las recomendaciones habituales para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo incluyen la ingesta de antioxidantes.

Diversos estudios clínicos han evaluado los efectos del tratamiento con suplementos antioxidantes por vía oral sobre la calidad espermática en el varón, así como en los procesos de fertilización *in vitro* y tasas de embarazo obtenidas (6-8). A pesar de que no existe uniformidad en cuanto al diseño de estos ensayos clínicos ni en los suplementos utilizados, que permitan comparar los resultados obtenidos para poder establecer la suplementación óptima en la dieta, las revisiones más recientemente publicadas permiten concluir acerca de resultados positivos sobre el porcentaje de embarazos o de recién nacidos tras la ingesta de suplementos antioxidantes (4, 9-11). Estos estudios han confirmado el efecto beneficioso demostrado por los antioxidantes en trabajos previos

en los que se analizaba su efecto sobre la calidad seminal. El uso de suplementos dietéticos se ha extendido en los tratamientos de fertilidad masculina en la reproducción asistida a pesar de la necesidad emergente de realizar estudios clínicos controlados y randomizados que puedan poner de manifiesto la eficacia clínica de estos suplementos antioxidantes sobre la fertilidad masculina.

En la actualidad, existen comercializados distintos suplementos alimenticios utilizados en Andrología que contienen en su composición agentes antioxidantes reconocidos, principalmente vitaminas y minerales. El objetivo del presente trabajo ha sido la evaluación comparativa de la actividad antioxidante de cinco suplementos alimenticios comerciales: AndroMÁS®, Androferti®, Aquilea Fértil®, Gestadha®, Seidiferty®.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

La disolución de las muestras de los suplementos se llevó a cabo utilizando metanol o etanol en función de su solubilidad, disolventes aceptados en la literatura para estos ensayos (12). Se prepararon diluciones seriadas de cada suplemento a partir de una solución stock (1 mg/ml), inmediatamente antes de la realización de los ensayos. Se ensayaron dos lotes de cada suplemento.

Determinación de la actividad antioxidante

Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El ensayo ORAC se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Davalos et al. (13). Las muestras de los distintos suplementos (rango concentración final 0,005-0,00002 mg) y el Trolox (1-8 μM), compuesto antioxidante de referencia, se incubaron durante 10 minutos a 37° C con fluoresceína (concentración final 70 nM) en un fluorímetro FLUOstar

Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany). La reacción se inició por la adición de [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH] (concentración final 12 mM) en un volumen final de 200 μ L. Se midió la cinética de fluorescencia cada 56 s durante 98-120 min [excitación: 490 nm, emisión: 520 nm]. Se calcularon los valores del área bajo la curva (AUC) para cada suplemento, comparándose con los AUC correspondientes al Trolox. Los resultados obtenidos se expresaron como μ moles de Trolox/mg de muestra.

Ensayo de actividad captadora del radical diphenilpicryl-hidrazyl (DPPH)

Para la determinación de la actividad captadora de radical DPPH se siguió el método descrito por Molyneux (14). Se prepararon diluciones de la muestra a partir de una solución stock de 1 mg/ml (concentración final rango 0,5-0,083 mg) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con DPPH (concentración final 60 μ M). Al final del periodo de incubación se determinó la disminución de la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro de placa Digiscan. La absorbancia de la solución de DPPH pura incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos se consideró como el control, calculándose la actividad captadora del radical de cada muestra, tras la incubación de las muestras objeto de estudio con DPPH. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la generación de radical DPPH respecto a la reacción control (100 % de generación de radical en ausencia de suplemento).

Análisis estadístico

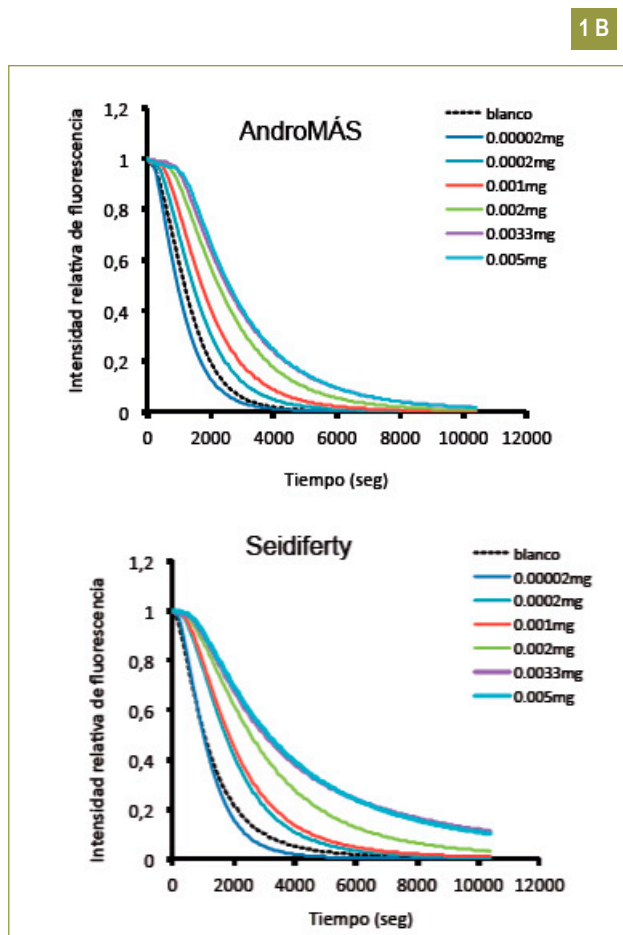
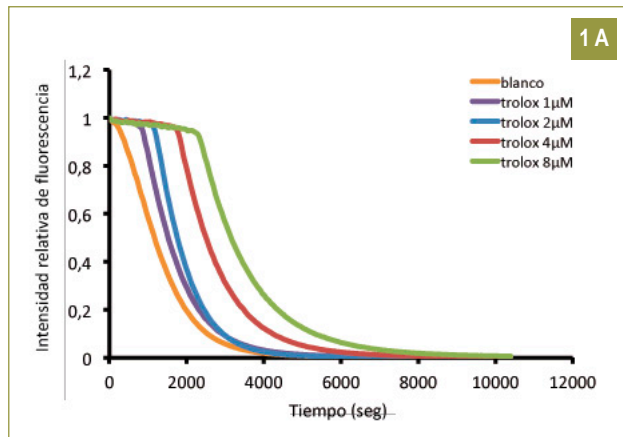
Los resultados obtenidos se expresan como la media \pm error estándar medio (E.S.M.) de los datos obtenidos de dos lotes de cada uno de los preparados estudiados (n = 5 por lote). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SigmaPlot 11.0.

RESULTADOS

El análisis de las curvas de decaimiento de la fluorescencia en el ensayo ORAC con los cinco suplementos ensayados (AndroMÁS®, Androferti®, Aquilea Fértil®, GestaDha®, Seidiferty®), reveló que el preparado Aquilea Fértil no mostraba un comportamiento normal como compuesto antioxidante, por lo que no pudo ser evaluado comparativamente en el estudio. El efecto antioxidante de los preparados se calculó mediante las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, comparándose frente a la curva de Trolox (Fig. 1A). De los otros cuatro suplementos testados, AndroMÁS y Seidiferty presentaron la mayor actividad antioxidante (Fig. 1B).

FIGURA 1

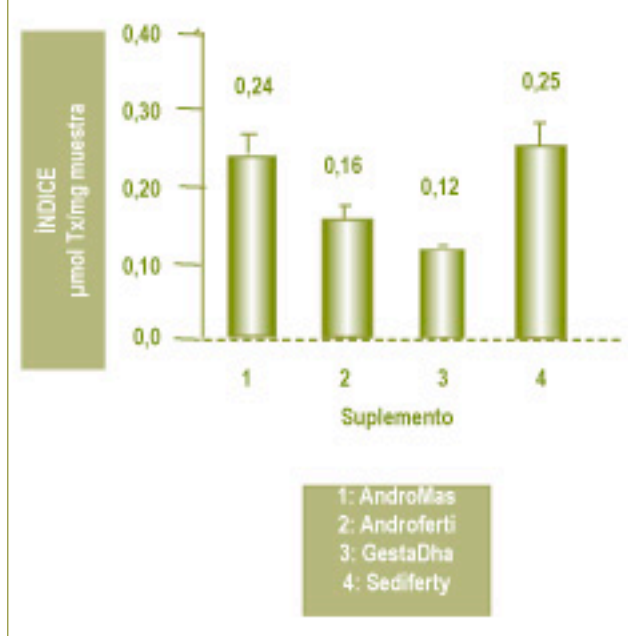
Curva de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por efecto de los radicales peroxilo y relación del área bajo la curva del decaimiento versus concentración en presencia de diferentes concentraciones de Trolox (A) y de los suplementos AndroMÁS y Seidiferty (B). Se muestra un gráfico representativo (n=10).



A partir de la relación entre las pendientes de las curvas descritas en la Fig. 2 con la pendiente de la curva relación área bajo la curva de decaimiento versus concentración de Trolox, se calcularon los índices ORAC para cada uno de los suplementos testados, como se indica en la Fig. 2. Los índices ORAC comparativos de los distintos preparados, permitieron establecer el siguiente orden de actividad de los preparados AndroMÁS ≈ Seidiferty > Androferti > GestaDha presentando AndroMÁS y Seidiferty diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás suplementos ensayados ($p < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los índices ORAC de los dos lotes ensayados de cada suplemento, ni entre los valores ORAC de los dos suplementos más activos AndroMÁS® y Seidiferty®.

FIGURA 2

Comparación de los índices ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg muestra}$) de los suplementos AndroMÁS, Androferti, GestaDha y Seidiferty. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. ($n=10/\text{lote}$)



El ensayo de actividad captadora de radical DPPH mostró, como se aprecia en la Tabla 1, que la incubación de las muestras de los suplementos AndroMÁS, Androferti y Seidiferty con DPPH en tampón fosfato a 37°C , producía una disminución de la absorbancia a 515 nm. Estos resultados indicaban que los suplementos AndroMÁS, Androferti y Seidiferty mostraban actividad antioxidante significativa frente a la reacción control ($p < 0,05$), siendo ésta dependiente de la concentración en el caso de AndroMÁS y Androferti. En este ensayo el orden de actividad mostrado fue

TABLA 1

Actividad antioxidante en términos de captación de radical DPPH (%) de los distintos suplementos ensayados. Los valores se expresan como porcentaje de inhibición de la generación de radical DPPH respecto a la reacción control (100% de generación de radical en ausencia de suplemento). Los valores se expresan como media \pm ESM dos lotes diferentes ($n=10$). * $p < 0,05$ vs control.

| Suplemento | Concentración (mg/ml) | | | |
|------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,083 | 0,125 | 0,25 | 0,5 |
| AndroMÁS | 44,25+5,36* | 64,49+5,39* | 93,40+3,56* | 97,20+3,61* |
| AndroFerti | 26,24+3,74 | 37,64+5,91* | 70,55+5,63* | 93,00+1,36* |
| GestaDha | 3,63+2,37 | 4,58+2,65 | 6,05+2,48 | 17,80+3,85 |
| Seidiferty | 2,50+1,34 | 8,44+2,31 | 25,23+1,38* | 60,50+1,69* |

el siguiente: AndroMÁS > Androferti > Seidiferty, con valores de Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) de 0,170, 0,223 y 0,434 mg/ml, respectivamente. GestaDha no presentó actividad captadora de este radical, mientras que el suplemento Aquilea Fértil no pudo ser ensayado por interferencia con el ensayo. Como era de esperar, el Trolox, utilizado como compuesto antioxidante de referencia, mostró un valor IC_{50} de $1,6 \mu\text{M}$.

DISCUSIÓN

El presente estudio ha evaluado la actividad antioxidante de distintos suplementos comerciales utilizados en Andrología para mejorar la calidad espermática. Aunque se ha descrito la actividad antioxidante de distintos componentes presentes en estos suplementos, como es el caso de la vitamina C, E y vitaminas del grupo B, no existen estudios previos en la literatura en los que se haya evaluado la actividad antioxidante de este tipo de suplementos dietéticos comerciales.

En el estudio se han utilizado dos métodos ampliamente validados en la literatura para la determinación de la actividad antioxidante de suplementos dietéticos. Dado que no se ha descrito la existencia de un único ensayo de actividad antioxidante estandarizado, se eligió un método basado en la transferencia de electrones (ORAC) y otro método basado en la transferencia de un átomo de hidrógeno (DPPH), de acuerdo con las recomendaciones del IUPAC Technical Report (15). Los resultados obtenidos en el ensayo ORAC de generación de radicales peroxilo, que simula las reacciones de antioxidantes con lípidos en sistemas fisiológicos y es aplicable a la evaluación tanto de antioxidantes hidrófilos como hidrófobos, ponen de manifiesto que AndroMÁS y Seidiferty presentan la mayor actividad antioxidante en base a los valores ORAC obtenidos, que se encuentran dentro del rango establecido para suplementos dietéticos en la literatura.

tura (0,018-3,18 μmol Trolox/mg de suplemento). Adicionalmente, el suplemento AndroMÁS también mostró mayor actividad antioxidante en el ensayo de captación del radical DPPH, seguido por Androferti y Seidiferty. Aunque no se han observado diferencias significativas entre estos dos preparados, se confirma la actividad antioxidante de los mismos.

Diversos estudios sugieren que la ingesta de suplementos antioxidantes se asocia con efectos beneficiosos sobre la fertilidad masculina, ya que contribuiría a contrarrestar los efectos dañinos que ejerce el estrés oxidativo sobre la calidad del semen (11, 16). Este estudio ha puesto de manifiesto la actividad antioxidante de los suplementos AndroMÁS y Seidiferty, propiedades que podrían contribuir a la eficacia terapéutica de sobre la infertilidad masculina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Braga D P, Halpern G, R de C, Figueira A, Setti S, Iaconelli A, Jr., and Borges E Jr. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil.Steril.* 2012; 97 (1):53-59.
2. Wogatzky J, Wirleitner B, Stecher A, Vanderzwalmen P, Neyer A, Spitzer D, Schuff M, Schechinger B, and Zech N.H. The combination matters—distinct impact of lifestyle factors on sperm quality: a study on semen analysis of 1683 patients according to MSOME criteria. *Reprod.Biol.Endocrinol* 2012;10:115.
3. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum.Reprod.Update* 2008; 14 (3):243-258.
4. Gharagozloo P, Aitken R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum.Reprod* 2011; 26 (7):1628-1640.
5. Agarwal A, Allamaneni S.S. Free radicals and male reproduction. *J.Indian Med.Assoc.* 2011; 109 (3):184-187.
6. Minguez-Alarcon L, Mendiola J, Lopez-Espin J.J, Sarabia-Cos L, Vivero-Salmeron G, Vioque J, Navarrete-Muñoz E.M, Torres-Cantero A.M. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Hum.Reprod.* 2012; 27 (9):2807-2814.
7. Abad C, Amengual M.J, Gosalvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, Garcia-Peiro A, Prats J. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia* 2013; 45 (3):211-216.
8. Mora-Esteves C, Shin D. Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin.Reprod.Med.* 2013; 31 (4):293-300.
9. Agarwal A, Sekhon L.H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum.Fertil.(Camb.)* 2010; 13 (4):217-225.
10. Showell M.G, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz M.T, Hart R.J. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2001; (1):CD007411.
11. Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, Bach M, Schechinger B, Zech N.Herbert. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 2012; 82 (6):391-398.
12. Prior R.L, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J.Agric.Food Chem.* 2005; 53 (10):4290-4302.
13. Davalos A, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J.Agric.Food Chem.* 2004; 52 (1):48-54.
14. Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004; 26(2):211-219.
15. R Apak, Gorinstein S, Böhm V, Schaich K.M, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2013; 85(5): 957–998.
16. Zareba P, Colaci D.S, Afeiche M, Gaskins A.J, Jorgensen N, Mendiola J, Swan S.H, Chavarro J.E. Semen quality in relation to antioxidant intake in a healthy male population. *Fertil.Steril.* 2013; 100 (6):1572-1579.