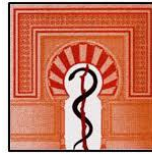




## UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



**Departamento de Medicina y Cirugía Animal  
Biociencias y Ciencias Agroalimentarias**

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL TRANS- RESVERATROL O EL  
UBIQUINOL EN LA FUNCIÓN TESTICULAR DE RATONES CD-1  
SOMETIDOS A UN EJERCICIO DE NATACIÓN FORZADA**

**ANTIOXIDANT EFFECT OF TRANSRESVERATROL OR UBIQUINOL  
ON THE TESTICULAR FUNCTION OF CD-1 MICE SUBJECTED TO A  
FORCED SWIMMING EXERCISE**

**Directoras:**

Inmaculada Rodríguez Artiles y Diana Vaamonde Martín

**Autora:** Antonia Lucía Sánchez de Medina Baena

**Córdoba enero 2021**

TITULO: *EFEECTO ANTIOXIDANTE DEL TRANS-RESVERATROL O EL  
UBIQUINOL EN LA FUNCION TESTICULAR DE RATONES CD-1  
SOMETIDOS A UN EJERCICIO DE NATACION FORZADA*

AUTOR: *Antonia Lucía Sánchez de Medina Baena*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/  
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS:  
EFECTO ANTIOXIDANTE DEL TRANS- RESVERATROL O EL  
UBIQUINOL EN LA FUNCIÓN TESTICULAR DE RATONES CD-1  
SOMETIDOS A UN EJERCICIO DE NATACIÓN FORZADA**

**DOCTORANDO/A: Antonia Lucía Sánchez de Medina Baena**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTORES/ES DE LA TESIS**

La presente Tesis Doctoral forma parte de la línea de investigación del grupo AGR-192 centrada en el estudio y valoración del efecto de un ejercicio moderado prolongado en el tiempo sobre la función testicular en ratones CD-1. Las primeras aportaciones realizadas nos permitieron estandarizar el modelo de ejercicio, así como, valorar el efecto de algunos antioxidantes en la calidad de los espermatozoides epididimarios. El modelo de ejercicio seleccionado, natación forzada de 3 minutos diarios durante 50 días, ha demostrado ser bien aceptado por los ratones CD-1, e inducir algunas alteraciones en la calidad de los espermatozoides. Por otro lado, los resultados indicaron que el trans-resveratrol y la N-acetilcisteína pueden revertir dichas alteraciones. Con el fin de profundizar en esta línea y ampliar la investigación con el empleo de otro antioxidante, el ubiquinol, que no ha

sido probado en modelos de ejercicio, es por lo que se diseña este trabajo de investigación, que incluye, entre otros, la valoración del efecto de las especies reactivas de oxígeno, que pudieran estar causando el incremento de las alteraciones observadas en los espermatozoides epididimarios.

Hasta la fecha de este informe parte de los resultados de la presente Tesis se han presentado como poster en un congreso nacional y publicado en una revista de impacto (artículo que se adjunta); y, en estos momentos, estamos aguardando la confirmación de aceptación de una segunda publicación.

En cuanto a la doctoranda, opinamos que ha realizado satisfactoriamente su plan de formación en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias, realizando las actividades obligatorias propuestas, así como otras optativas, compatibilizándolo con su actividad profesional. Nuestra valoración global del trabajo que la doctoranda ha realizado es muy positiva, manteniendo siempre una actitud entusiasta, gran capacidad de estudio, trabajo y tesón en el seguimiento y consecución de sus tareas y objetivos, necesarios para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Por último, consideramos como directoras de la presente Tesis Doctoral que la investigación llevada a cabo presenta objetivos concretos, específicos y claros, que se abordan con un diseño experimental adecuado que aportan unos resultados de interés que dan continuidad a nuestra línea de investigación o pudieran abrir otras, en otras especies animales de elevado valor zootécnico o incluso en el hombre que practica ejercicio físico, para preservar o mejorar su salud, y que además tienen interés en preservar su fertilidad. Por todo lo

expuesto, y para que conste, autorizamos la presentación y defensa de la presente Tesis Doctoral.

A 15 de diciembre de 2020

Firma de las directoras

**RODRIGUEZ  
ARTILES  
MARIA  
INMACULADA  
- 43641621H**

Firmado digitalmente por  
RODRIGUEZ ARTILES MARIA  
INMACULADA - 43641621H  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=IDCES-43641621H,  
givenName=MARIA INMACULADA,  
sn=RODRIGUEZ ARTILES MARIA  
INMACULADA - 43641621H  
Fecha: 2020.12.23 15:34:31 +01'00'



**Fdo: Inmaculada Rodríguez Artiles Fdo.: Diana Vaamonde Martín**



## **AGRADECIMIENTOS**

Tras muchos años de trabajo y sacrificio, por fin me veo escribiendo estas palabras, sinceramente hubo días en los que pensé que jamás llegaría este momento, pero está claro que con mucha voluntad y esfuerzo todo puede conseguirse.

Son muchísimas las personas a las que tengo que agradecer poder estar aquí ahora mismo escribiendo estas palabras, espero no olvidar a ninguna.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras Diana e Inmaculada, gracias por confiar en mí, por pensar que podría llegar hasta el final pese a las adversidades, gracias por guiarme, por enseñarme, por orientarme.

Como no, al pilar y al sentido de mi vida, mis hijos, Nicolás y Carlos, ellos han sido mi fuerza, mi motor durante estos difíciles años, tenía que demostraros que las cosas una vez que se empiezan hay que terminarlas, cueste lo que cueste. Gracias por soportar mi mal carácter los días en los que las cosas no salían bien, gracias por perdonarme muchas tardes de juego perdidas, gracias por no echarme en cara muchas vacaciones todo el tiempo trabajando, seguro que algún día entenderéis todo. También quisiera agradecer a mi marido, sin él nunca podría haber podido terminar mi tesis, gracias por hacer de padre y madre en muchos

momentos, por apoyarme en todas las decisiones, las buenas y las malas y por cuidar tan bien de nuestros hijos.

Otro de los grandes pilares de mi vida, y a los que debo agradecer muchas cosas son mis padres. Gracias por permitirme estudiar mi carrera, la que adoro y que ejerzo con gran devoción, gracias por apoyarme en todo, gracias por empujarme a terminar mi tesis, sin vosotros tampoco hubiera podido permitirme terminarla, gracias por ayudarme con los niños, con las comidas, con la casa, en fin, mil gracias por permitirme ser lo que soy hoy. Gracias también a mis hermanos, Vero y Lean, por escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles, por ser mis hermanos, mis amigos y mis confidentes a lo largo de toda mi vida, vuestros buenos consejos también me han permitido llegar donde ahora estoy. Gracias a mi tía Librada, mi segunda madre, que decir de ella si me ha cuidado desde niña y lo sigue haciendo a día de hoy, gracias por todo, por tu ayuda, por tu dedicación, gracias por cuidar de mi familia y hacernos sentir en tu casa como si estuviéramos en la nuestra. Gracias también al resto de mis tíos y a mis primos, por preocuparse, por ayudarme, gracias especialmente a mi prima Paqui, por ayudarme con la traducción y con todo lo que le he pedido sin pedir nada a cambio. Gracias a los que ya no están con nosotros, pero me han ayudado mucho en mi vida, los extraño enormemente en estos momentos: “mami”, abuelo Paco, abuela Rafaela, abuelo Leandro, tita Rosario, tito Rafael, espero que allá donde os encontréis, os sintáis muy orgullosos de mí, ¡cómo me gustaría poder celebrar este momento con vosotros! Gracias a mi suegra, una pequeña pero gran persona, gracias por cuidarme estos años de casada como a



una hija, por hacerme la comida muchos días, por ayudarme con los niños. Gracias a mi suegro, el que ya no está con nosotros, pero que tantos días nos ha alegrado con sus gracias y tonterías.

Gracias a mis compañeros del hospital, muchos de ellos mi paño de lágrimas en momentos duros y de agobio. Gracias a Aritz y Julio, por hacerme sentir bien, por aconsejarme y por cuidarme como a una hermana; gracias a Eli, un gran apoyo en mi trabajo y en mi vida, gracias por escucharme y ayudarme en infinidad de cosas, gracias a Antonio por tus sabias charlas y tu apoyo, a David por confiar en mí y en el equipo. Gracias al equipo de anestesia, que me han acogido en todo momento tan bien en su grupo, gracias a Sete, por enseñarme, por aguantarme, por tantos momentos compartidos; gracias a Esther, mi compañera de alegrías y penas en el trabajo, gracias por tu ayuda incondicional, gracias también al resto del equipo: a María del Mar, Rocío, Rafa, José María, Cristina, Indalecio, he aprendido mucho de cada uno de vosotros. Gracias a Manolo Novales, por enseñarme, por cuidarme y por hacerme sentir como a una hija, sabes que eres y siempre serás mi referente al que admiro por encima de todo. Gracias a Ana Muñoz, otro gran referente en mi vida, gracias por tus consejos, por tu ayuda desinteresada, por escucharme sea el momento que sea, por confiar en mí. Gracias a Anita, por emocionarte, por tu apoyo, por tu empatía, por todos los momentos compartidos; gracias a mi gente de UPA entre los que tengo grandes amigas. Gracias a Mónica, mi gran jefa, porque siempre me diste el tiempo libre que necesitaba. Gracias a mis compañeros del estudio: Balta

y Alicia, por la gran ayuda que me habéis prestado y que ha hecho posible obtener los resultados.

En definitiva, gracias a todos los que me habéis acompañado, apoyado y aguantado durante estos años de mi vida.

Agradecimientos especiales:

Gracias al Dr. José Peña Amaro, profesor del Departamento de Ciencias Morfológicas y Sociosanitarias de la Facultad de Medicina de la UCO, por ayudarme en la interpretación de las preparaciones histológicas; a Antonio Agüera, PAS del Departamento, por prepararme tan bien las muestras y tenerme todo listo cuando tenía que ir a interpretarlas, he trabajado encantada con vosotros; al Dr. Ricardo Vaamonde, por su incondicional ayuda en la interpretación de la histomorfometría.

Gracias al Dr. Guillermo López LLuch, profesor en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, por cedernos el trans-resveratrol, por tu ayuda y por tus consejos en la interpretación de los resultados.

Mil gracias al Dr. Juanma Serrano Caballero, profesor del Departamento de Farmacología, Toxicología Medicina Legal Forense de la UCO y al Dr. Antonio Molina Alcalá, profesor del Departamento de Genética de la UCO, por ayudarme con la estadística, por vuestra paciencia y por todo el tiempo dedicado.

Y sobre todo gracias a la empresa Kaneka, por suministrarnos desinteresadamente el ubiquinol y el excipiente empleados en este estudio, y por el asesoramiento y apoyo bibliográfico prestado.

El estudio ha sido realizado gracias a los fondos del grupo Reproducción Animal AGR-192, perteneciente al Plan Andaluz de Investigación Desarrollo e Innovación de la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad, de la Junta de Andalucía.

“Los sueños parecen al principio imposibles, luego  
improbables, y luego, cuando nos comprometemos, se  
vuelven inevitables”.

*Mahatma Gandhi*



A mis hijos Nicolás y Carlos



---

***ÍNDICE***







## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT .....	9
3. INTRODUCCIÓN .....	13
4. OBJETIVOS.....	21
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	25
5.1. FUNCION TESTICULAR, CALIDAD SEMINAL, INFERTLIDAD MASCULINA Y FACTORES RELACIONADOS ....	25
5.2. RADICALES LIBRES (RL) Y ESTRÉS OXIDATIVO (EO) .....	27
5.2.1 Estrés oxidativo y efectos sobre la función testicular ....	30
5.2.2 Principales fuentes de ERO en el eyaculado .....	31
5.2.3 Sistema antioxidante del testículo .....	34
5.2.4 Funciones fisiológicas de las ERO sobre la función testicular .....	41
5.2.5 Efectos patológicos del incremento de ERO en testículo	43
5.3 EJERCICIO FÍSICO Y FERTILIDAD EN HOMBRE .....	47
5.3.1. Generalidades .....	47

5.3.2. Efecto del ejercicio en la espermatogénesis .....	49
5.3.3 Valoración parámetros reproductivos en atletas .....	54
5.4. EJERCICIO FÍSICO Y FERTILIDAD EN ROEDORES ...	57
5.5. ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES EXÓGENOS Y REPRODUCCIÓN. ....	60
5.5.1 Trans- resveratrol .....	61
5.5.2 Coenzima Q10 y ubiquinol.....	67
5.5.3 Ácido ascórbico (vitamina C).....	71
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
6.1 ANIMALES .....	77
6.2. PROGRAMA DE EJERCICIO.....	79
6.3 ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES .....	80
6.4. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS .....	82
6.5. VALORACIÓN MORFOLÓGICA Y VITALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES .....	83
6.6. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS Y MEDICIONES CELULARES.....	85
6.6.1 Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos .....	86
6.7 ESTUDIO SUBJETIVO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS Y DE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	91
6.8. ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	93

6.8.1 Peroxidación lipídica .....	93
6.8.2 Enzimas antioxidantes .....	94
6.8.3. La actividad antioxidante total (TAS) .....	95
6.8.4 Niveles de Coenzima Q <sub>9</sub> y Q <sub>10</sub> .....	95
6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	96
7. RESULTADOS .....	99
7.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO .....	100
7.2 ANÁLISIS DE LA VITALIDAD.....	103
7.3 ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DEL TESTÍCULO Y MEDICIONES CELULARES	104
7.3.1 Área del epitelio germinativo ( $\mu^2$ ), porcentaje de la luz y porcentaje del epitelio germinativo .....	104
7.3.2 Área ( $\mu^2$ ), aspecto, área/box ( $\mu^2$ ), diámetro mínimo ( $\mu$ ), circularidad ( $\mu$ ), longitud ( $\mu$ ), anchura ( $\mu$ ) y perímetro <sup>2</sup> ( $\mu$ ) de los túbulos seminíferos .....	105
7.3.3. Área ( $\mu^2$ ), aspecto y diámetro mínimo ( $\mu$ ) de los núcleos .....	105
7.4 VALORACIÓN SUBJETIVA DE LA ESPERMATOGÉNESIS .....	108
7.4.1 Valoración histológica del tejido testicular .....	108
7.4.2. Apoptosis celular en el testículo.....	109
7.5 VALORACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	109

7.5.1 Valoración de la peroxidación lipídica en testículo .....	109
7.5.2 Valoración de enzimas antioxidantes .....	110
7.5.3 Valoración de la actividad antioxidante total (TAS)....	113
7.5.4 Valoración de niveles de Coenzima Q9, Q10 y la ratio Q9/Q10 en testículo.....	113
8. DISCUSIÓN .....	118
8.1 HALLAZGOS.....	118
8.2 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	118
8.3 PARÁMETROS ESPERMÁTICOS .....	122
8.4 ESPERMATOGÉNESIS .....	126
9. CONCLUSIONES .....	134
BIBLIOGRAFÍA .....	138
ÍNDICE DE TABLAS .....	164
ÍNDICE DE FIGURAS .....	168
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	174

---

***RESUMEN***





## **1. RESUMEN**

Desde hace varias décadas se ha venido estudiando el efecto beneficioso que el ejercicio aporta para la salud. Esto junto con el incremento de problemas de fertilidad en atletas de élite, han hecho que se desarrollen numerosos estudios centrados en valorar como afecta el ejercicio a la función testicular. Se ha demostrado que dependiendo de la intensidad y duración del ejercicio, puede provocar efectos beneficiosos que incrementan la calidad espermática, aunque también puede inducir alteraciones, con disminución de la misma, sobre todo cuando la intensidad y duración del ejercicio son elevadas, al provocar un estado de estrés oxidativo por incremento de las especies reactivas de oxígeno. Para contrarrestar este daño, se ha valorado el efecto la suplementación con diferentes antioxidantes exógenos administrados de forma oral con la dieta. La mayoría de los estudios que valoran el efecto del ejercicio sobre la espermatogénesis y la fertilidad en el macho, emplean modelos de alta intensidad y duración. Con el fin de estudiar cómo el ejercicio moderado prolongado afecta a la función testicular del ratón, se ha planteado en este estudio un modelo de ejercicio consistente en un programa de natación forzada de 3 minutos diarios, en tanques de agua a temperatura controlada, durante 50 días. Como antioxidantes se han empleado el trans-resveratrol, previamente usado por nuestro grupo a una dosis menor de la utilizada en este trabajo y el ubiquinol, no utilizado previamente en modelos de ejercicio. Ambos antioxidantes se han administrado por vía oral. Se han utilizado 75 ratones CD-1, machos, de 65 días de edad que fueron distribuidos de forma aleatoria en cada uno



de los siguientes grupos: grupo control (GC), grupo que no practicaba ejercicio ni recibía antioxidantes; grupo ejercicio (EJERC), grupo que practicaba ejercicio pero no recibía antioxidantes; grupo trans-resveratrol (EJ-Resv), grupo que practicaba ejercicio y recibía 100mg/Kg de trans-resveratrol; grupo ubiquinol (EJ-Ubiq), grupo que practicaba ejercicio y recibía 200mg/Kg de un compuesto elaborado por la empresa Kaneka que facilita la absorción del ubiquinol y que presenta además del ubiquinol un excipiente compuesto de 73,93 % de goma arábica, 20,44% de dextrina y 4,63% de vitamina C, y grupo excipiente (EJ-Excp), grupo que practicaba ejercicio y recibía el excipiente correspondiente a 200 mg /Kg del compuesto de Kaneka. Tras los 50 días de ejercicio de natación forzada, los animales fueron sacrificados, se extrajeron los epidídimos y testículos para el estudio de morfología y vitalidad espermática, valoración de estrés oxidativo (peroxidación lipídica, actividad antioxidante total, niveles de Q<sub>9</sub>, Q<sub>10</sub> y enzimas antioxidantes) y valoración tanto de la espermatogénesis como de la histomorfometría testicular. El modelo de ejercicio planteado alteró la morfología de los espermatozoides epididimarios, así como el diámetro, el área y el aspecto de los núcleos de las células del epitelio germinativo, además mostró una tendencia a valores menores de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, malondyaldehído y del ratio de coenzima Q<sub>9</sub>/Q<sub>10</sub>. La suplementación oral diaria con los dos antioxidantes y el excipiente mejoraron la vitalidad de los espermatozoides epididimarios y protegieron de los daños nocivos producidos por el ejercicio impuesto sobre la morfología y el diámetro de los núcleos de las células del epitelio, siendo

el ubiquinol el que ejerció un mejor efecto protector frente a la morfología de los espermatozoides del epidídimo y el trans-resveratrol el que mejor efecto hizo sobre la reducción del diámetro de los núcleos de las espermatogonias y sobre la presencia de células inmaduras en la luz de los túbulos.



---

***ABSTRACT***





## **2. ABSTRACT**

The beneficial effect of exercise on health has been studied for several decades. This, together with the increase in fertility problems in elite athletes, has led to numerous studies focused on assessing how exercise affects testicular function. Depending on the intensity and duration of exercise, there can be beneficial effects that increase sperm quality, yet exercise can also induce alterations, decreasing sperm quality, especially when the intensity and duration of exercise is high, by causing a state of oxidative stress due to an increase in reactive oxygen species. To counteract this damage, the effect of supplementation with different exogenous antioxidants administered orally with the diet has been evaluated. Most of the studies that assess the effect of exercise on spermatogenesis and fertility in the male, use models of high intensity and duration. In order to study how prolonged moderate exercise affects the testicular function of the mouse, an exercise model has been proposed in this study consisting of a forced swimming program of 3 minutes per day, in water tanks at controlled temperature, for 50 days. As antioxidants, trans-resveratrol, previously used by our group at a greater dose than the used in this study, and ubiquinol, not previously used in exercise models, have been used. Both antioxidants have been administered orally. Seventy-five 65-day-old CD-1 male mice were used, being randomly distributed to each of the following groups: control group (CG), group that did not exercise or receive antioxidants; exercise group (EJERC), group that exercised but did not receive antioxidants;

trans-resveratrol group (EJ-Resv), group that exercised and received 100mg / Kg of trans-resveratrol; ubiquinol group (EJ-Ubiq), group that exercised and received 200mg / Kg of a compound elaborated by Kaneka company that facilitates the absorption of ubiquinol and that presents, in addition to ubiquinol, an excipient composed of 73.93% gum arabic, 20 , 44% dextrin and 4.63% vitamin C, and excipient group (EJ-Excp), group that exercised and received the excipient corresponding to 200 mg / Kg of the Kaneka compound. After 50 days of forced swimming exercise, the animals were sacrificed, epididymis and testes were extracted for the study of sperm morphology and vitality, assessment of oxidative stress (lipid peroxidation, total antioxidant activity, levels of Q9, Q10 and antioxidant enzymes) and assessment of both spermatogenesis and testicular histomorphometry. The proposed exercise model altered the morphology of the epididymal spermatozoa, as well as the diameter, area and appearance of the nuclei of the cells of the germinative epithelium; there was also a tendency to lower values of the enzymes glutathione peroxidase, glutathione reductase, malondialdehyde and the ratio of coenzyme Q9 / Q10. Daily oral supplementation with the two antioxidants and the excipient improved the vitality of the epididymal sperm and protected from the harmful damage caused by exercise imposed on the morphology and diameter of the nuclei of the epithelial cells; ubiquinol was the antioxidant providing the best protective effect against morphology damage and trans-resveratrol was the most effective in reducing the diameter of the nuclei of the spermatogonia and on the presence of immature cells in the lumen of the tubules.

---

## ***INTRODUCCIÓN***







### 3. INTRODUCCIÓN

La realización de ejercicio es una práctica cada vez más común en la sociedad actual. La valoración de cómo la actividad física afecta a la salud ha tomado gran importancia en las últimas décadas. Se ha demostrado que el ejercicio practicado de forma moderada y continua aporta numerosos beneficios a la salud, reduciendo la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Newton y Galvao, 2008; Agarwal y cols., 2012). La relación que existe entre ejercicio y fertilidad es también un tema de estudio en auge, debido a las altas tasas de problemas reproductivos encontrados en los atletas (Arce y cols., 1993, Jensen y cols., 1995; Gebreegziabher y cols., 2004; Vaamonde y cols., 2009; Wise y cols., 2011; Kipandula y Lampiao, 2015). Cuando revisamos los estudios publicados en esta línea observamos que los resultados encontrados son diversos. De un lado, en modelos de roedores, se ha observado que un ejercicio moderado, reduce los daños de inflamación y estrés oxidativo que acontecen con el envejecimiento en testículo (Zhao y cols., 2013), así como también produce un incremento de la capacidad antioxidante total del organismo (Kalantari y cols., 2017). En el hombre también se ha demostrado que el ejercicio moderado, tiene un efecto beneficioso en la fertilidad, mejorando parámetros del seminograma como cantidad de esperma, concentración, motilidad y morfología (Vaamonde y cols., 2012; Gaskins, y cols., 2015). De otro lado, cuando el ejercicio se practica de forma aguda o intensa y continua puede conducir a un estado de estrés oxidativo debido a que el incremento en

el consumo de oxígeno incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), moléculas que se forman del metabolismo celular, provocando un desequilibrio de la homeostasis prooxidante-antioxidante intracelular (Kawamura y Muraoka, 2018). Las ERO son sustancias muy inestables y reactivas que pueden dañar a distintas clases de moléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares presentes en las células, siendo la peroxidación de los lípidos uno de los daños más comúnmente asociados al incremento de las ERO. Los espermatozoides son células muy propensas a sufrir daño oxidativo debido a que tienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana y por la baja concentración de enzimas antioxidantes presentes en su escaso citoplasma, lo que limita su capacidad de eliminar radicales y la capacidad de reparar su ADN (Lenzi y cols., 1996). Aunque pequeñas cantidades de ERO son necesarias para que los espermatozoides adquieran su capacidad fertilizante (capacitación, reacción del acrosoma y fusión del ovocito) (de Lamirande y Gagnon, 1993 a, b; Aitken, 1997; Griveau y Le Lannou, 1997); cuando estas exceden la capacidad antioxidante propia del testículo se induce un daño que puede causar alteraciones de la función testicular (Álvarez y cols., 1987; Aitken, 1995; Aziz y cols., 2004; Aitken, 2006; Agarwal y cols., 2008; Tremellen, 2008; Saki y cols., 2009, 2010; Jana y cols., 2010; Rodríguez y cols., 2016). Son escasos los estudios que valoran como el ejercicio, que practica la mayor parte de población, moderado y continuo, afecta a la fertilidad. Algunos estudios con programas de ejercicio moderados han observado alteraciones de seminograma afectándose

incluso la fertilidad (Saki y cols., 2009, 2010; Rodríguez y cols., 2016) pudiendo ser la causa, al igual que en los casos de ejercicio intenso, de un desequilibrio en la homeostasis prooxidante-antioxidante.

Para combatir el estatus de estrés oxidativo, durante años se ha valorado el incremento de la capacidad antioxidante del organismo, administrando antioxidantes exógenos. Por ello, son cada vez más las investigaciones que estudian el efecto que tiene la suplementación de la dieta con antioxidantes, tanto a nivel reproductivo como a otros niveles (Agarwal y cols., 2003; Tremellen, 2008). Su uso en modelos de ejercicio y fertilidad también han sido valorado (Jana y cols., 2014; Minaii y cols., 2014; Vijayprasad y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2016; Kalantari y cols., 2017; Moayeri y cols., 2018).

El trans-resveratrol es un estilbenoide, ampliamente consumido en alimentos como la uva roja y el vino. Actúa reduciendo la peroxidación lipídica, oxidación y nitración proteica (Olas y Wachowicz, 2005), mejorando el funcionamiento de las mitocondrias. Presenta un amplio rango de funciones biológicas demostradas en estudios previos, como antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, antitumoral, cardioprotectiva y neuroprotectiva (Fremont, 2000; Wensel y cols., 2005). A nivel reproductivo, su efecto es controvertido, así se ha usado en modelos de animales donde se ha visto que eleva la concentración de gonadotropinas y testosterona en sangre, incrementando la producción de espermatozoides del epidídimo (Juan y cols., 2005) y revirtiendo los daños testiculares producidos por diversos agentes oxidantes (Yuluğ y

cols., 2013) y por el estrés (Bitgul y cols., 2013); de otro lado se ha visto que a altas dosis el trans-resveratrol presenta un efecto pro-oxidante incrementando marcadores de estrés oxidativo y provocando alteraciones del seminograma, como la concentración de espermatozoides y la motilidad (Ranawat y cols., 2013). En modelos de ejercicio ha sido usado previamente, observándose que revierte los efectos deletéreos que el ejercicio provoca sobre la morfología espermática en ratones CD-1 sometidos a tres minutos de natación forzada durante cincuenta días (Rodríguez y cols., 2016) y protege del daño oxidativo producido por el ejercicio intenso (Guo y cols., 2019).

El ubiquinol (QH), forma reducida de la coenzima Q10 (CoQ10), es una sustancia liposoluble, similar a las vitaminas. Está presente en la mayoría de los tejidos del organismo y tiene dos funciones principales; bioenergética mejorando la actividad de la mitocondria en la síntesis de ATP, y antioxidante. Como antioxidante actúa a nivel de la mitocondria y membranas lipídicas, donde ejerce las funciones de transportador redox (Bentinger y cols., 2007); elimina los radicales libres, y previene la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica en las membranas celulares, ayudando además a la regeneración de otros antioxidantes como el tocoferol y el ascorbato (Crane y cols., 2001); también disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias y del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (Fouad y cols., 2011). Su actividad como antioxidante se está estudiando en diferentes campos, existiendo numerosos estudios que han demostrado su capacidad para disminuir los efectos deletéreos que

las ERO producen en distintos tejidos (Litarru, 2007), entre ellos el testicular (Ognjanovic y cols., 2010; Fouad y cols., 2011; Nadjarzadeh, 2014). Pese a su baja solubilidad, se ha demostrado que la administración exógena oral de ubiquinol produce un incremento en los niveles de CoQ10 y ubiquinol en plasma seminal y células espermáticas (Balercia y cols., 2009, Safarinejad y cols., 2009, 2012). Usado como suplemento oral en la dieta en pacientes con problemas de fertilidad mejora algunos parámetros del seminograma (Safarinejad y cols., 2009, 2012). No obstante, su efectividad respecto a los parámetros reproductivos no ha sido probada en sujetos sometidos a ejercicio, ni en modelos animales ni en el hombre.

Para facilitar la capacidad de absorción del ubiquinol, se han usado diferentes compuestos entre ellos el ácido ascórbico. El ácido ascórbico también conocido como Vit C, es una vitamina hidrosoluble, esencial para el correcto funcionamiento del cuerpo. Durante muchos años se ha relacionado su déficit con problemas de fertilidad, demostrándose que es esencial para el correcto desarrollo de la espermatogénesis debido en parte a su capacidad de reducir el  $\alpha$  tocoferol y mantener este antioxidante en un estado activo (Aitken y Roman, 2008), protege la integridad de la membrana (Vijayprasad y cols., 2014) y en roedores y humanos, añadido como suplemento en la dieta, estimula la producción de espermatozoides y secreción de testosterona (Sönmez y cols., 2005; Okon y Utuk, 2016) mejorando algunos parámetros del seminograma (Akmal, y cols., 2006).

Partimos de la hipótesis de que un programa de ejercicio moderado continuo provocará un incremento en las especies reactivas de oxígeno provocando daños sobre la función testicular, y que dichos daños podrán ser revertidos con la suplementación oral en la dieta de antioxidantes exógenos (ubiquinol o trans- resveratrol).

---

## ***OBJETIVOS***







## 4. OBJETIVOS

Son escasos los estudios que han valorado como el ejercicio practicado de forma moderada y continua puede afectar a nivel reproductivo al macho, por eso nos planteamos el trabajo con los siguientes objetivos:

1. Confirmar que un programa de natación forzada de 3 minutos diarios durante 50 días induce alteraciones similares a las observadas en un estudio previo realizado por nuestro grupo, sobre la morfología de los espermatozoides de la cola del epidídimo, sobre la histomorfometría de la pared del túbulo seminífero y sobre la apoptosis celular de ratones CD-1, induciendo un incremento en el porcentaje de morfoanomalías de los espermatozoides, un incremento del diámetro de los núcleos de la espermatogonias y un incremento de la apoptosis celular.
2. Valorar el efecto de un programa de natación forzada de tres minutos diarios durante 50 días, sobre la vitalidad de los espermatozoides epididimarios de ratones CD-1
3. Valorar el efecto de un programa de natación forzada de tres minutos diarios durante 50 días, sobre las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, los niveles de Coenzima Q9 y Q10, los niveles de malondialdehido y la actividad antioxidante total del testículo, en ratones CD-1
4. Valorar el efecto de dos antioxidantes, ubiquinol o trans-resveratrol, sobre la morfología, vitalidad, espermatogénesis, histomorfometría, núcleos de la pared del túbulo seminífero, actividad antioxidante total del testículo, niveles de malondialdehido, niveles de Coenzima Q9 y Q10 y enzimas antioxidantes en el testículo: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y

catalasa, en ratones CD-1 sometidos a un programa de 3 minutos de natación diaria durante 50 días, en ratones CD-1

## *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*





## 5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

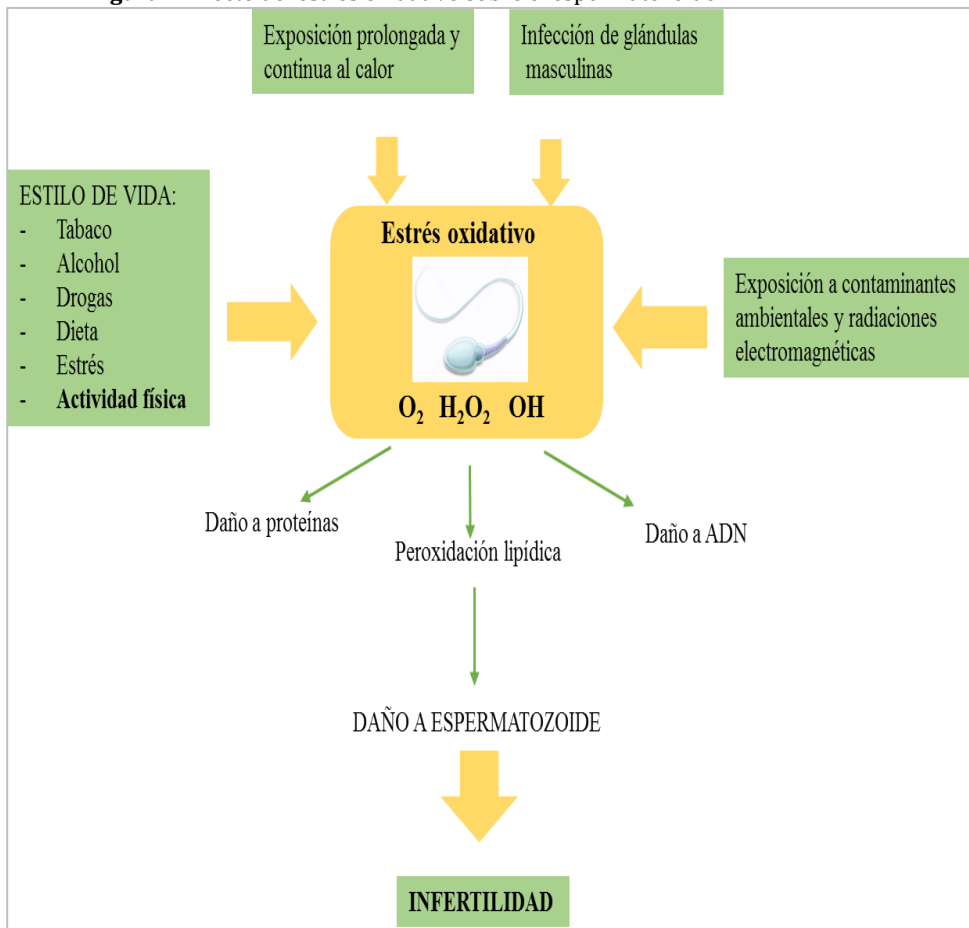
### 5.1. FUNCION TESTICULAR, CALIDAD SEMINAL, INFERTLIDAD MASCULINA Y FACTORES RELACIONADOS

En el hombre se define el concepto de infertilidad como la incapacidad de una pareja para concebir un hijo durante más de un año de relaciones sexuales sin protección. El factor masculino suele ser la causa en un 40 % de los casos. Entre los factores que pueden afectar a la calidad seminal se encuentran: la exposición prolongada y continua al calor y al aumento de la temperatura del escroto (Sharpe, 2000; Ivell, 2007); exposición a contaminantes ambientales con efecto sobre el sistema endocrino (Sharpe, 2000; Magnusdottir y cols., 2005) y a radiaciones electromagnéticas (Bayari, 2017). También podemos encontrar factores relacionados con el estilo de vida entre los que se encuentran, el hábito tabáquico, consumo de drogas, ingesta de alcohol, dieta, estrés, obesidad y actividad física (Kumar y cols., 2009). El efecto de alguno de estos factores se traduce en un descenso de la cantidad de espermatozoides, su motilidad o alteración de su morfología, que pueden alterar la fertilidad (Fig 1).

Desde hace unos años la evidencia sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales libres de oxígeno muy reactivos, juegan un papel importante en problemas de fertilidad masculina en un 30-80 % de los casos, cuando se provoca un estatus de estrés oxidativo,

es decir, un desequilibrio entre la producción de ERO y los mecanismos inherentes del organismo para eliminarlos. Entre las causas que provocan un incremento de niveles de ERO y una disminución de las enzimas antioxidantes encargadas de eliminar estos radicales, se encuentran, la realización de actividad física de una manera aguda y prolongada o de una forma intensa.

**Figura 1.** Efecto del estrés oxidativo sobre el espermatozoide



## 5.2. RADICALES LIBRES (RL) Y ESTRÉS OXIDATIVO (EO)

Los radicales libres se definen como moléculas que disponen de un electrón sin emparejar, condición que les confiere inestabilidad y reactividad (Papa y Skulachev, 1997). Son agentes oxidantes originados como subproductos del metabolismo del oxígeno (ERO) o del nitrógeno (ERN). Estos incluyen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), ion hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el radical peroxilo ( $RO_2^{\cdot}$ ) y subclases de radicales derivados del nitrógeno que incluyen óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) y ácido peroxinitroso ( $ONOOH^{\cdot}$ ). Existen otras moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no son radicales libres pero que actúan fisiológicamente como tal, tienen una vida media más larga, pasan a través de la membrana y no están cargadas eléctricamente (Papa y Skulachev, 1997).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), en inglés ROS, y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) están implicadas en la patofisiología de varias condiciones como envejecimiento, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares e infertilidad (McCord y cols., 1993; Multhaup y cols., 1997; Agarwal y cols., 2014). Para solventar esta condición, todos los organismos han desarrollado un sofisticado sistema antioxidante que los protege del daño y muerte celular que causan los radicales libres (Halliwell, 1996).

Hablamos de estrés oxidativo (EO) cuando se produce un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad inherente que presenta el organismo para eliminar dichos radicales. Así pues, puede



originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, por una deficiencia de agentes antioxidantes o por ambos factores a la vez (Chance y Sies, 1979).

Los radicales libres se forman en grandes cantidades como producto de procesos bioquímicos y en ocasiones de los neutrófilos activados, además los puede generar el organismo en respuesta a agentes externos como radiaciones electromagnéticas, entre otras (Betteridge, 2000).

Algunas ERO son altamente reactivas y poseen una vida media muy corta, como los radicales hidroxilos, que actúan en el lugar donde se forman. Otros, como el peróxido de hidrógeno son menos reactivos, pero con vida media más larga, lo que les permite hacer daño en zonas más lejanas (Papa y Skulachev, 1997).

Las ERO pueden afectar a diferentes clases de moléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares. Esto significa que, las membranas de las células, núcleos y mitocondrias, proteínas citoplasmáticas y carbohidratos estructurales, ARN, ADN son susceptibles de verse afectados (Pryor y cols., 2006). Un ejemplo importante es la peroxidación lipídica de las membranas, que se define como la degradación oxidativa de los lípidos. En la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados debido a que contienen múltiples enlaces dobles entre los que se encuentran los grupos metileno (CH-2) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. La peroxidación lipídica puede tener efectos sobre la función celular, así una

peroxidación extensa en las membranas de las células puede conllevar cambios en la fluidez, incremento en la permeabilidad, disminución del potencial de membrana y ocasionalmente ruptura (Sanocka y Kurpisz, 2004).

Como mecanismo antioxidante el organismo cuenta con sistemas enzimáticos y no enzimáticos encargados de depurar los radicales libres y evitar el daño que éstos puedan provocar en los tejidos.

Entre los antioxidantes bio-sintetizados se encuentran:

- Antioxidantes enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes en los mamíferos son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), necesitando esta última de otras enzimas como la glutatión reductasa (GRd), glutatión S-transferasa y  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa para reciclar o eliminar el glutatión.
- Antioxidantes no enzimáticos: como glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Coenzima Q) y melatonina.

Si bien ambos grupos son bio-sintetizados por el organismo, también pueden ser adquiridos a través de la dieta. Sin embargo, el aporte que supone la dieta de estos antioxidantes no es muy significativa, pues estos experimentan una degradación/biotransformación a lo largo del tracto gastrointestinal.

En cuanto a los antioxidantes que ingresan a través de la dieta están:

- Vitaminas-antioxidantes: como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y betacaroteno.
- Carotenoides como luteína, zeaxantina, licopeno
- Polifenoles, en sus categorías flavonoides y no-flavonoides.
- Otros, como glucosinolatos y ciertos compuestos como el zinc.

#### 5.2.1 Estrés oxidativo y efectos sobre la función testicular

Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de su membrana, la baja concentración de enzimas antioxidantes de su citoplasma (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y a la pequeña cantidad de volumen citoplasmático que poseen, lo que limita su capacidad de eliminar radicales y de reparar su ADN (Lenzi y cols., 1996). Tanto la esteroidogénesis como la espermatogénesis pueden ser alteradas por el estrés oxidativo ya que tanto las células de Leydig como las Células de Sertoli son susceptibles de sufrir peroxidación lipídica de sus membranas con la consecuente alteración de su función (Aitken, 1995) (Apartado 5.3.2.3).

### 5.2.2 Principales fuentes de ERO en el eyaculado

Las ERO encontradas en plasma seminal pueden ser producidas de forma endógena. por los leucocitos y por los espermatozoides (Aitken y Clarkson, 1987) o por fuentes exógenas: radiaciones, toxinas, tabaco, consumo de alcohol, y ejercicio (Lavranos y cols., 2012)

#### 5.2.2.1 Fuentes endógenas

##### A) Espermatozoides:

Los espermatozoides inmaduros, inmóviles o morfológicamente anormales y los normales, pero con un mal funcionamiento pueden producir grandes cantidades de ERO. Así, Aziz y cols., en 2004 encontraban una correlación positiva entre los niveles de ERO en esperma y la proporción de espermatozoides con anomalías en cabeza, acrosoma, pieza intermedia, gota citoplasmática y defectos en la cola.

La generación de ERO en el espermatozoide puede ocurrir por dos vías: la vía nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa a nivel de la membrana plasmática del esperma o por reacción nicotinamida adenina dinucleótido-dependiente oxido reductasa a nivel de la mitocondria, pareciendo ser esta última la principal fuente de ERO. De las principales ERO producidos por el espermatozoide se encuentra el anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Zini y cols., 1993).

Además, la espermatogénesis es un proceso activo en el cual se producen un número elevado de espermatozoides por segundo que

implica un consumo elevado de oxígeno por las mitocondrias del epitelio germinal, y por tanto la producción también de numerosas ERO (Guerriero y cols., 2014).

#### B) Leucocitos

La segunda fuente de producción de ERO son los leucocitos, que producen mucha mayor cantidad que los espermatozoides. Estos leucocitos incluyen leucocitos polimorfonucleares y macrófagos (Saleh, y cols., 2003). Cuando los leucocitos se activan por un estímulo, ya sea una infección o una inflamación, estos producen gran cantidad de ERO e incremento del sistema NADPH hexosa monofosfato, que es la vía que usa el espermatozoide como fuente de electrones para la generación de ERO. Esta vía consiste en dos reacciones de oxidación reversibles, seguidas de reacciones de inter-conversión reversibles entre azúcares-fosfato (Bagchi y cols., 2000; Saleh y cols., 2002; Albano, 2006; Liu y cols., 2009; Lavranos y cols., 2012).

#### 5.2.2.2 Fuentes exógenas

##### A) Radiaciones:

Estudios tanto in vivo como in vitro han demostrado que las radiaciones electromagnéticas, emitidas por aparatos electrónicos como radios y microondas, producen un incremento en los ERO, alterando las membranas y ADN del espermatozoide (Agarwal y cols., 2008; de Luliis y cols., 2009). Estas ondas afectan negativamente el flujo de electrones

de la membrana de las células, alterando la función normal de las células y organelos (Lavranos y cols., 2012)

B) Toxinas:

Distintas toxinas utilizadas en la industria como cadmio, cromo, manganeso y mercurio, entre otros, pueden acumularse en cuerpo y producir un incremento de ERO (Bagchi y cols., 2000; Liu y cols., 2009).

C) Tabaco:

Los cigarrillos contienen gran cantidad de compuestos químicos entre ellos alcaloides, moléculas inorgánicas y nitrosaminas. Sustancias que causan un desequilibrio entre ERO y los antioxidantes del esperma (Lavranos y cols., 2012), además se ha demostrado que el tabaco incrementa la cantidad de leucocitos y los niveles de ERO (Saleh y cols., 2002).

D) Alcohol:

El consumo de alcohol es un promotor de producción de ERO e interfiere en la capacidad antioxidante del organismo, debido a que el acetaldehído producido tras el metabolismo del metanol interactúa con proteínas y lípidos. Así, se han encontrado marcadores de peroxidación lipídica en hígado y suero en pacientes con alcoholismo y también en roedores (Albano, 2006).

E) Ejercicio: Apartado 5.3

### 5.2.3 Sistema antioxidante del testículo

Pese al intenso metabolismo celular que se produce durante la espermatogénesis, el testículo cuenta con una vascularización pobre (Free y cols., 1976) y, por tanto, una tensión baja de oxígeno, siendo la competencia por el oxígeno elevada. Esta baja tensión de oxígeno le confiere un mecanismo de defensa frente a los daños producidos por las ERO. Además, para prevenir los daños producidos por las ERO, los testículos han desarrollado un sofisticado sistema antioxidante que está formado por componentes enzimáticos y no enzimáticos:

#### 5.2.3.1 Factores no enzimáticos

Incluye moléculas capaces de neutralizar o eliminar ERO, ERN y sus intermediarios.

##### A) Zinc:

Es un factor antioxidante que además de ser parte constituyente de algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y protector de grupos sufridillo, también se cree que mejora la peroxidación de lípidos al desplazar metales como hierro y cobre de lugares catalíticos (Bray, 1990). Es tal su importancia antioxidante, que se ha observado que en ratas alimentadas con déficits de zinc una disminución del potencial antioxidante y un aumento de la peroxidación lipídica en testículo (Nair y cols., 2005).

## B) Vitamina E:

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol es un potente antioxidante lipofílico cuya principal función es reaccionar con radicales intermediarios en la peroxidación lipídica y con los peróxidos (Tappel, 1962); inhibe, por tanto, la formación de radicales libres y la peroxidación lipídica en microsomas y mitocondrias testiculares (Lucesoli y cols., 1999; Gavazza y cols., 2006;) protegiendo así la espermatogénesis del estrés oxidativo y mejorando el potencial reproductivo (Sahinturk y cols., 2007; Agdam y cols., 2017) Está presente en grandes cantidades en las células de Sertoli, y espermatoцитos; y en menor cantidad en espermátidas redondas (Yoganathan, 1989). Varios autores han demostrado su capacidad protectora y antioxidante en individuos estresados (Brady y cols., 1979) así como en individuos sometidos a distintos agentes prooxidantes como cromo, arsénico (Aruldhas y cols., 2005), cadmio (Acharya y cols., 2008), malatión (Uzum y cols., 2009), metales pesados (Al- Attar, 2011) y atrazina (Rezaide Agdam y cols., 2017).

## C) Vitamina C:

La vitamina C o ácido ascórbico es una sustancia hidrosoluble, cuya concentración en el plasma seminal es aproximadamente 10 veces mayor que en sangre. Entre sus propiedades químicas sobresale su fuerte poder reductor, es decir, la facilidad con que se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico, lo que le confiere una función antioxidante. Juega un papel importante en la reducción del estrés oxidativo en plasma seminal. Déficits tanto de vitamina C como de



vitamina E producen un estado de estrés oxidativo lo que conlleva alteraciones en la espermatogénesis y en la producción de testosterona (Sönmez y cols., 2005). De otro lado, la suplementación con ascorbato a animales sanos estimula la producción de testosterona (Sönmez y cols., 2005). Además de estos efectos, también contrarresta los daños producidos por diversos agentes prooxidantes como arsénico (Chang y cols., 2007), aroclor (Senthil Kumar y cols., 2004), cadmio (Sen Gupta y cols., 2004) y alcohol (Maneesh y cols., 2005).

#### D) Melatonina:

La melatonina es un importante factor de protección del testículo frente al estrés oxidativo, así se ha observado un significativo efecto estimulante tras la pinealectomía sobre el daño oxidativo registrado en testículos (Mogulkoc y cols., 2006). Tiene 2 características diferentes que lo diferencian del resto de antioxidantes. De un lado, sufre la oxidación de dos electrones cuando actúa como antioxidante y, de otro lado, es hidrófilo y liposoluble, pudiendo, por tanto, atravesar fácilmente la barrera hemato-testicular, para proteger el epitelio germinal del daño oxidativo. Se ha demostrado su importancia en el estrés oxidativo al verse disminuida en pacientes con problemas de varicocele, leucospermia y azoospermia no obstructiva, entre otros, condiciones asociadas todas ellas al estrés del tracto reproductivo (Awad y cols., 2006). Son varios los estudios que han valorado su efecto antioxidante frente a distintos agentes oxidantes como el diazinon (Sarabia y cols., 2011) y el arsenito de sodio (Bustos-Obregón y cols., 2013).

#### E) Citocromo C:

Otra de las moléculas que se ha demostrado que juega un papel importante en la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en testículo es una isoforma específica de citocromo C de los testículos. Esta isoforma, además, es un potente activador de la apoptosis, actúa, aportando protección adicional al testículo, por su capacidad de eliminar células germinales dañadas (Liu y cols.,2006).

#### F) Glutación:

El glutación es el tiol intracelular más abundante. Tiene propiedades antioxidantes mediante la reconstrucción de los grupos tiol en proteínas que pueden eliminarse durante un periodo de estrés oxidativo. El glutación también protege las membranas celulares de la oxidación de los lípidos y evita la formación de oxígeno libre. Un déficit de glutación conduce a la inestabilidad de la pieza intermedia de los espermatozoides, lo que resulta en un trastorno de la motilidad (Lenzi y cols., 1994). La suplementación con glutación en hombres infértiles con varicocele unilateral o inflamación del sistema urogenital conduce a una mejora significativa en los parámetros del eyaculado (Irvine, 1996).

#### G) Ubiquinol:

El ubiquinol, forma reducida de la coenzima Q10, es un potente antioxidante endógeno de tejidos en organismos aerobios (Ernster y Forsmark-Andrée, 1993). Presenta dos actividades principales, de un lado bioenergética ya que es un componente de la cadena de transporte de electrones y de otra antioxidante. Como antioxidante actúa a nivel de

las membranas lipídicas y lipoproteínas (Niki, 1997), elimina radicales libres y previene la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica en las membranas celulares, ayudando además a la regeneración de otros antioxidantes como el tocoferol y el ascorbato (Crane y cols.,2001). Ambas funciones del CoQ10, bioenergética y antioxidante, sugieren su implicación en procesos de infertilidad masculina. De un lado es conocida la gran cantidad de mitocondrias del espermatozoide necesarias para que adquiera su motilidad y de otro lado la protección de membranas del daño oxidativo podría jugar un papel importante en la preservación de integridad del espermatozoide (Mancini y Balercia, 2011). Algunos autores han demostrado que la concentración de CoQ10 en plasma seminal muestra correlación directa con parámetros seminales como motilidad y cantidad de espermatozoide, encontrado alteraciones en niveles de CoQ10 en condiciones asociadas con infertilidad como oligozoospermia, astenozoospermia y varicocele. (Mancini y cols., 1994; Balercia y cols., 2002; Mancini y Balercia, 2011; Gvozdjaková y cols., 2013). Otros como, Eroglu y cols., en 2014 encontraban una correlación de los niveles de CoQ10 en plasma seminal y morfología del espermatozoide, pero no en la concentración y motilidad en pacientes con infertilidad idiopática. En modelos de roedores el ubiquinol ha sido usado para valorar su efecto protector sobre la toxicidad testicular producida por exposición a campos magnéticos (Ramadan y cols., 2002) y a agentes oxidantes como el cadmio (Ognjanović y cols., 2010).

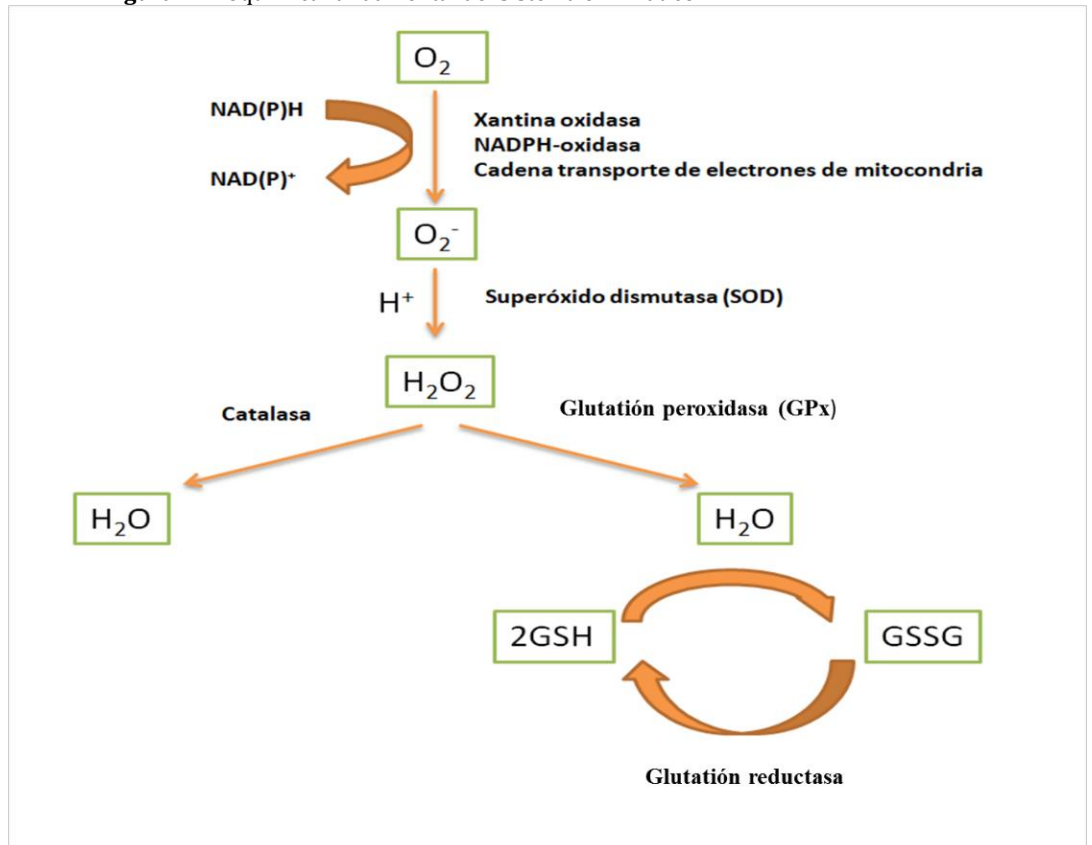
### 5.2.3.2 Factores enzimáticos

Todas las enzimas vistas en el apartado (5.2) se expresan en el testículo: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) (Zini y Schlegel, 1996, 1997; Maiorino y cols., 2003). La SOD es una metalonoproteína que tiene una gran importancia en el mecanismo de defensa del testículo. Dependiendo del ion de metal de transición encontrado en su sitio activo, las SOD pueden clasificarse en uno de tres tipos: SOD de cobre / zinc (Cu / Zn), SOD de manganeso (Mn) y SOD de hierro (Fe).

Debido a la importancia en el mecanismo de defensa antioxidante, los testículos contienen no solo la forma convencional citosólica (Cu/Zn) y mitocondrial (Fe/Mn) de la SOD si no también una forma inusual extracelular (SOD-Ex) que es producida por las células de Sertoli y células germinales (Mruk y cols., 2002). Las SOD transforman el anión superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y una molécula de oxígeno ( $O_2$ ) (McCord y Fridovich, 1988; Fridovich, 1996). El peróxido de hidrógeno generado es convertido en  $H_2O$  por la catalasa (CAT) proteína localizada principalmente en peroxisomas y en la propia membrana mitocondrial, y por la GPx familia de las selenoenzimas. La glutatión S-transferasa engloba una larga y compleja familia de proteínas que catalizan la conjugación de la forma reducida de glutatión en su forma sulfidrilo (GSH) a sustratos xenobióticos con el propósito de detoxificación. De otro lado la GRd es una enzima que cataliza la

reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual será utilizado por la GPx para la reducción del peróxido de hidrógeno (Fig 2).

**Figura 2.** Bioquímica fundamental del sistema enzimático



#### 5.2.4 Funciones fisiológicas de las ERO sobre la función testicular

Pese a sus efectos dañinos, las especies reactivas de oxígeno están involucradas en el control de la función fisiológica espermática, participando en mecanismos de transducción de señales (de Lamirande y Gagnon, 1993 a, b; Aitken y Fisher, 1994; Griveau y cols., 1994; Aitken, 1995; Griveau y Le Lannou, 1997). Así los espermatozoides necesitan pequeñas cantidades de ERO para el proceso de capacitación (Aitken, 1989; de Lamirande y Gagnon, 1993 a, b) durante la reacción del acrosoma (Griveau y cols., 1995), hiperactivación y fusión del esperma al ovocito, necesarias para asegurar la fertilización.

##### 5.2.4.1 Capacitación

Los espermatozoides viajan a través del cérvix, el útero, la unión útero-tubárica y el oviducto hasta llegar al ampulla, donde aún tienen que atravesar el cumulus ooforus y la zona pelúcida del oocito para lograr la fecundación. Durante este trayecto, ocurre la capacitación espermática. Al mismo tiempo, hay una selección de los espermatozoides por parte de tracto genital femenino. En definitiva, se puede definir la capacitación espermática como una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos por los cuales el espermatozoide termina su maduración y adquiere la capacidad para llevar a cabo los procesos necesarios para fecundar al óvulo, tales como la hiperactivación y la reacción acrosómica. Durante el proceso de capacitación se producen cantidades pequeñas y controladas de ERO que no dañan la función del espermatozoide observándose que

lo que hacen es, promover las vías de transducción de señales asociadas a la capacitación. Así se ha demostrado que las ERO contribuyen a la modulación de la fosforilación de la proteína tirosina, proteína requerida para que los espermatozoides logren la capacitación (O'Flaherty y cols., 2006).

La reacción del acrosoma consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica de externa (Alhamar, 2019). Estudios "in vitro" han sugerido que pequeñas cantidades de  $H_2O_2$  activan la adenilciclase a producir AMPc, lo que conlleva la fosforilación de la proteína tirosina dependiente de la quinasa A (Rivlin y cols., 2004).

La fase de hiperactivación también es necesaria para la correcta fertilización del ovocito. El proceso de hiperactivación es considerado como una parte de la capacitación. Esta se produce cuando el espermatozoide alcanza el istmo del oviducto. En este momento inicia un movimiento asimétrico, amplio y acelerado del flagelo, que le ayuda a liberarse de las criptas del oviducto para avanzar a través del lumen y alcanzar el útero. El papel de las ERO en el inicio de la hiperactivación se ha demostrado en estudios in vitro observándose que, los espermatozoides necesitan generar pequeñas cantidades de  $O_2^-$  para mantener la hiperactivación y proceder a la capacitación (de Lamirande y Gagnon, 1993 b).

#### 5.2.4.2 Fusión del espermatozoide al ovocito

Para una correcta fertilización, el espermatozoide debe penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito. Para ello se necesitan grandes cantidades de PUFAs, ya que juegan un papel importante en la fluidez de la membrana del espermatozoide. En estudios realizados en la especie humana se ha observado que las ERO incrementan la fluidez de membrana y la ratio de fusión espermatozoide-ovocito que ocurren durante la fase de cascada de capacitación y reacción del acrosoma espermatozoide a través de la inhibición de la desactivación de la fosfolipasa A2, lo que le permite unirse a los fosfolípidos de la membrana aumentando su fluidez (Agarwal, y cols., 2014).

#### 5.2.5 Efectos patológicos del incremento de ERO en testículo

Como vimos anteriormente en este mismo apartado, todos los componentes de las células (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares) pueden verse afectados por un exceso de ERO. El daño que las ERO producen sobre las células depende no solo de la naturaleza y cantidad presente, sino también del momento y duración de exposición a ERO, y de factores extracelulares como la temperatura, tensión de oxígeno y composición del ambiente que lo rodea como iones, proteínas, y antioxidantes (Aitken, 1995; Tremellen, 2008; Zribi y cols., 2011). Entre los efectos patológicos reconocidos se encuentran:

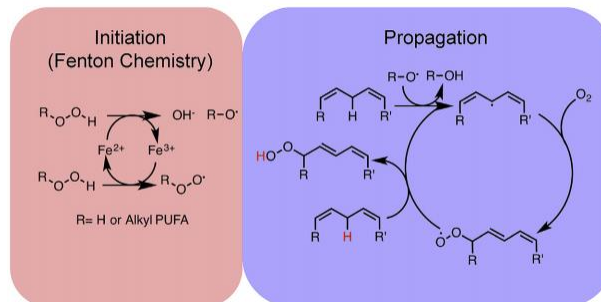


### 5.2.5.1 Peroxidación lipídica (PL)

La peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas del espermatozoide es un proceso de oxidación de los lípidos, que modifica la fluidez y altera la permeabilidad de estas, pudiendo conducir a la célula a un proceso de muerte celular. La membrana del espermatozoide es muy rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Éstos le confieren la fluidez necesaria para participar en el proceso de fusión con el ovocito. Los PUFAs de la membrana son susceptibles de sufrir peroxidación porque contienen múltiples enlaces dobles, entre los que se encuentran los grupos metileno (CH<sub>2</sub>) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. Uno de los principales productos de la peroxidación es el malondialdehído, que es usado para valorar el daño peroxidativo en diversas células incluidas el espermatozoide (Aitken, 1995). La peroxidación lipídica ocurre fundamentalmente en dos fases: iniciación y propagación. La iniciación es el paso en el cual se forman los radicales de ácidos grasos, los mayores iniciadores en las células son las especies reactivas de oxígeno, como el hidróxilo (OH<sup>-</sup>) y el hidroperóxilo (HOO<sup>-</sup>), los cuales se combinan con un átomo de hidrógeno para formar agua y un radical de ácido graso. Estos radicales formados no son muy estables y reaccionan con moléculas de oxígeno formándose un ácido graso peroxil radical que tampoco es estable y que reacciona con otros ácidos grasos libres dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lipídico o peróxido cíclico si reacciona con el mismo. El ciclo

continúa ya que el nuevo radical de ácido graso formado se comporta de la misma forma (Aitken, 1995) (Fig 3).

**Figura 3.** Esquema de las fases de la peroxidación lipídica (tomada de Gaschler and Stockwell, 2017)



### 5.2.5.2. Daño del ADN

Se ha demostrado que la cromatina del espermatozoide es vulnerable al daño de estrés oxidativo, provocando una modificación en las bases y una fragmentación de las cadenas (Zribi y cols., 2011). Durante el proceso de la espermiogénesis la cromatina sufre una serie de modificaciones en la cual las histonas son remplazadas por protaminas. Las cadenas ADN son condensadas por protaminas formando la unidad de empaquetado básica de la cromatina. Esta unidad es compactada aún más por puentes disulfuro intra e intermoleculares. Esta forma de compactación y organización del ADN protege a la cromatina del daño oxidativo haciéndolo muy resistente (Schulte y cols., 2010). Pese a esto, en algunos casos en los cuales hay una pobre compactación de la cromatina o existe

una incompleta protaminación de la cromatina del esperma, el ADN es más vulnerable al estrés oxidativo produciendo lugares de base libres, deleciones, mutaciones, roturas del ADN y reorganización de la cromatina (Schulte y cols., 2010). Se han detectado roturas simples y de doble cadena. Las roturas simples son efecto directo del daño oxidativo en el ADN del esperma, mientras que las de doble cadena podrían surgir de la exposición a los productos de la peroxidación lipídica (Badouard y cols., 2008) siendo estos el motivo de la ruptura (Twigg y cols., 1998). Son tanto el anión superóxido ( $O_2^-$ ) como los radicales hidroxilos ( $OH^-$ ) son los causantes de las deleciones cromosómicas y cambios en la cromatina (Aitken y Krausz, 2001).

#### 5.2.5.3 Apoptosis

Otro problema asociado con el incremento de las ERO en el testículo es la alteración de la apoptosis. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico en el cual la célula sufre una serie de cambios morfológicos y biomecánicos que le causan la muerte de forma controlada. (Sinha Hikim y Swerdloff, 1999). En adultos la apoptosis juega un papel importante en la eliminación de espermatogonias premeióticas durante la espermatogénesis, previniendo la sobreproducción de células germinales desde los túbulos seminíferos en respuesta a las ERO (Tremellen, 2008). Durante este proceso los espermatozoides expresan varios marcadores de apoptosis como el Fas, PS, Bcl-Xl y p53 (Agarwal y cols., 2014). En el hombre se ha

observado un mayor porcentaje de Fas positivo en hombres con parámetros seminales alterados (Agarwal y cols., 2003) y se ha observado una correlación positiva entre la presencia de ERO y el incremento de apoptosis. Altas cantidades de ERO alteran la capa interna y externa de la mitocondria, tras lo cual se libera citocromo C de la mitocondria que activa las caspasas e inducen la apoptosis (Moustafa y cols., 2004). Un incremento de la apoptosis en las células de los túbulos seminíferos induce la presencia de espermatozoides apoptóticos, con daños en el ADN, en el eyaculado y por tanto una disminución de la fertilidad (Han-Ming y cols., 2002).

### 5.3 EJERCICIO FÍSICO Y FERTILIDAD EN HOMBRE

#### 5.3.1. Generalidades

La realización de ejercicio físico de forma regular es una práctica cada vez más frecuente en la sociedad actual. El ser humano ha ido tomando consciencia de los numerosos beneficios que aporta. De un lado nos ayuda a mejorar el aspecto físico y de otro nos mejora la salud, ya que se ha demostrado que disminuye la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares (Gielen y cols., 2015), diabetes (Galassetti y Riddell, 2013), Alzheimer (Cass, 2017), Parkinson (Paillard y cols., 2015), retrasa el envejecimiento (Zhao y cols., 2013) y previene y mejora la calidad de vida de pacientes tratados para distintos tipos de cáncer (Segal y cols., 2017).

Entre los efectos beneficiosos que el ejercicio moderado produce en la salud, se encuentran; a nivel cardiovascular: reducción de la frecuencia cardiaca, incremento del tono parasimpático, mejora de la función del endotelio cardiovascular, incremento de la vasculogénesis y múltiples cambios metabólicos que resultan en una mejor tolerancia a la isquemia y a las lesiones por reperfusión (Gielen y cols., 2001). En pacientes con enfermedades neurodegenerativas disminuyen la función física y cognitiva y en pacientes con Alzheimer, reducen síntomas depresivos e incluso la mortalidad en pacientes con demencia (Larson y cols., 2006).

Pese a esto y debido a los problemas de fertilidad que acontecen en deportistas de élite, se han realizado numerosos estudios que han valorado la relación entre actividad física y fertilidad tanto en el hombre como en la mujer. En el hombre, de un lado se ha observado un efecto beneficioso, al mejorar la calidad espermática en pacientes que realizan una actividad física ya que mejora niveles de testosterona, reduce los mediadores inflamatorios y mejora la respuesta antioxidante natural del organismo (Vaamonde y cols., 2012; Gaskins y cols., 2015).

Por otro lado, también son numerosos los estudios que han hallado efectos negativos del ejercicio sobre la fertilidad, observándose que cuando se practica de forma intensa o no controlada puede provocar un estado de estrés oxidativo y alteraciones del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, que conllevan a alteraciones en el seminograma y por tanto afectan a la fertilidad (Arce y cols., 1993, Jensen y cols., 1995;

Gebreegziabher y cols., 2004; Wise y cols., 2011; Kipandula y Lampiao, 2015; Vaamonde y cols., 2018)

### 5.3.2. Efecto del ejercicio en la espermatogénesis

Además de alteraciones congénitas, la espermatogénesis puede verse alterada por otros factores como estrés por calor, estrés oxidativo, alteraciones endocrinas, alteraciones de la nutrición y efecto de drogas o irradiación (Józków y Rossato, 2017). Existen varios parámetros que relacionan la práctica de actividad física con la alteración de la espermatogénesis.

#### 5.3.2.1 Incremento de temperatura escrotal

Para que la función de los testículos se desarrolle correctamente la temperatura optima del testículo debe de estar 2°C por debajo de la temperatura corporal (Durairajanayagam y cols., 2015). Así la elevación de la temperatura escrotal produce alteraciones en la espermatogénesis (Dewasmes y cols., 1991) al provocar apoptosis celular, daño en el ADN, paro en la espermatogénesis, disminución de los niveles de inhibina e incremento en la producción de ERO (Józków y Rossato, 2017). Los espermatozoides del epidídimo presentan alteración de la motilidad y la viabilidad, y la función de las células de Sertoli y de Leydig se ven alteradas bajo estas condiciones (Durairajanayagam y cols., 2015). En deportes como ciclismo, hípica, motociclismo y automovilismo podemos

presuponer un incremento en la temperatura escrotal, sin encontrarse correlación entre la duración del ejercicio y la temperatura escrotal (Jung y cols., 2008). Por otro lado, estudios realizados en hombres que pasan mucho tiempo sentados o usan ropa interior muy ajustada han concluido que, se produce un descenso de los espermatozoides, pero que no tiene un impacto sustancial sobre la fertilidad (Stoy y cols., 2004), cuestionándose con resultados como estos, la hipótesis de que las altas temperaturas escrotales, causan alteraciones en la espermatogénesis (Jung y Schuppe, 2007).

#### 5.3.2.2 Alteraciones hormonales

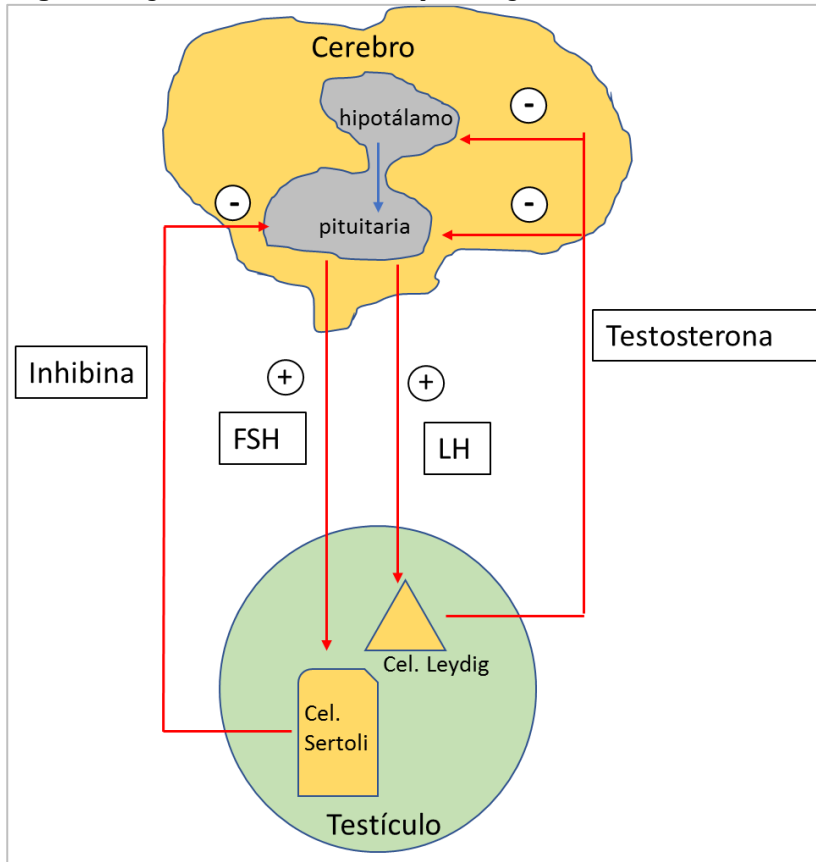
La respuesta endocrina frente al ejercicio está relacionada con varios factores como tipo, duración e intensidad de la actividad física. Es conocido que el ejercicio agudo, a menudo, conduce a un incremento en los niveles de testosterona (Sgro y cols., 2014). Por el contrario, cuando este se realiza de forma crónica, mal ejecutado o intenso, puede inducir una marcada disminución de los niveles de estos. En este sentido, son varios los autores que han observado, en deportistas de élite, que la producción y secreción de testosterona se disminuye con la práctica de ejercicio, principalmente cuando es realizado de forma intensa (Hackney y cols., 1998; Hackney y cols., 2008; Safarinejad, 2009).

La testosterona es el principal esteroide en el hombre. La mayor parte de testosterona circulante proviene de la producción por parte de las células de Leydig del testículo. Aunque dentro del hombre la glándula

suprarrenal también produce pequeñas cantidades de la hormona. La regulación de la producción testicular se produce a través de un sistema de retroalimentación negativa que afecta a la hipófisis anterior, al hipotálamo y a los testículos; denominado eje hipotalámico-hipofisario gonadal (Islam y Trainer, 1998). El hipotálamo libera de forma pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina GnRH. La GnRH estimula la hipófisis anterior que produce hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). A nivel de los testículos la LH y la FSH interactúan con sus receptores (LH; Células de Leydig, FSH; Células de Sertoli). Las células de Sertoli, bajo estimulación de la FSH proveen la matriz de soporte a las células germinales, segrega factores de crecimiento necesarios para la espermatogénesis y produce dos hormonas no esteroideas responsables del feedback entre las gónadas y la unidad hipotálamo-hipófisis (activina e inhibina). La FSH estimula la producción de inhibina, la cual, a su vez, suprime la secreción de FSH sin alterar los niveles de LH. La LH estimula la secreción de testosterona desde las células de Leydig. Para el correcto funcionamiento de la espermatogénesis son necesarias elevadas concentraciones de testosterona. De otro lado, la testosterona regula su concentración en plasma, al actuar sobre el hipotálamo-hipófisis, inhibiendo la secreción de LH (Islam y Trainer, 1998) (Fig 4).



**Figura 4.** Regulación hormonal de la espermatogénesis



La testosterona es una hormona esencial en el hombre, tanto en la pubertad como en la fase adulta (Cano Sokolff y cols., 2016). Está ampliamente demostrado, que la actividad física incrementa de forma aguda los niveles de testosterona total libre (Di Luigi y cols., 2012, Vingren y cols., 2010). Sin embargo, los estudios a medio y largo plazo sobre los niveles de testosterona son menos claros. Se ha demostrado que los niveles de testosterona dependen del tiempo, duración e intensidad del ejercicio. En los estudios realizados en deportistas de élite

se ha demostrado que el entrenamiento de resistencia produce cambios en la pulsatilidad de la LH y sensibilidad de la pituitaria a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), observándose en atletas de resistencia, jugadores de fútbol y ciclistas aficionados, un descenso de testosterona en comparación con los controles (Arce y cols., 1993; de Souza y cols., 1994; Hackney y cols., 1998; Maimoun y cols., 2003; Wheeler y cols., 1984). Hipotéticamente se ha descrito que la secreción de andrógenos en atletas podría estar reducida por la supresión en la liberación de gonadotropinas y a los efectos directos/indirectos del aumento de la hormona liberadora de corticotropina, corticotropina, cortisol, catecolaminas o prolactina (Józków y Medrás, 2012).

#### 5.3.2.3 Estrés oxidativo

La realización de ejercicio puede provocar un desequilibrio entre la cantidad de ERO producida y los antioxidantes inherentes del organismo generando un estatus de estrés oxidativo. Como vimos anteriormente los espermatozoides debido a la abundante cantidad de PUFAs de su membrana son especialmente vulnerables al daño de ERO. También las células de Leydig y las de Sertoli pueden verse afectadas por un estado de EO, viéndose alterada por tanto de forma directa e indirecta la espermatogénesis (Manna y cols. 2004; Jana y cols., 2008). Desde que en 1978 Dillard y cols. evidenciaran un incremento en la peroxidación lipídica tras un ejercicio agudo aeróbico, son numerosos los estudios que han valorado biomarcadores de estrés oxidativo en diferentes modelos

de ejercicio. Así de un lado se ha demostrado que los niveles marcadores de estrés oxidativo se incrementaban, en corredores de larga distancia, triatletas y atletas de élite (Kostaroupoulos y cols., 2006, Knez y cols., 2007, Tartibian y cols., 2012). De otro lado, se ha observado que cuando el ejercicio es moderado se produce una respuesta adaptativa del organismo incrementándose la cantidad de enzimas antioxidantes (Gomez- Cabrera y cols., 2008).

#### 5.3.2.4 Trauma

El trauma testicular es una lesión que puede ocurrir en hombres que participan en ciertas disciplinas, pese a esto el efecto del micro trauma sobre la función testicular no ha sido valorada, siendo los ciclistas y jinetes los posibles afectados. Lo único que se ha valorado en ciclistas de montaña que no tenían historias de anteriores incidentes es que revelaban anomalías ecográficas en un 94% de los casos (Frauscher y cols., 2001).

#### 5.3.3 Valoración parámetros reproductivos en atletas

La realización de un análisis de esperma es una de las herramientas más comúnmente usadas para valorar capacidad reproductiva y de forma indirecta la fertilidad, pese a que, es una herramienta pobre que está sujeta a grandes variaciones debida a factores estacionales y de abstinencia que pueden afectar a los resultados (Aulesa y cols., 2007).

Durante varias décadas, el análisis de esperma ha sido estudiado en diversos modelos de deporte (Olive, 2010). Así, según la intensidad, duración y tipo de ejercicio los resultados son variables. Cuando el ejercicio se practica de forma moderada supone mejora en parámetros seminales como la concentración, volumen, motilidad y morfología de los espermatozoides y disminución de respuesta inflamatoria y estrés oxidativo. Vaamonde y cols. en 2012, observaron mejoras en el seminograma con mejor motilidad y menor número de morfoanomalías espermáticas en individuos que realizaban actividad física, frente a individuos sedentarios; más tarde Gaskins y cols., (2015) y Hajizadeh Maleki y cols., (2017) corroboraban dicho efecto beneficioso. Gaskin (2013) en un estudio realizado también sobre una población sana, valoraba la diferencia en parámetros seminales de hombres que realizaban una actividad física moderada y vigorosa frente a hombres que veían mucho la televisión, concluyendo que, una mayor concentración de espermatozoides y mayor volumen de esperma estaba correlacionado positivamente con la práctica de ejercicio y negativamente con la cantidad de horas de televisión que veían. Hajizadeh Maleki, 2017 comparaba el efecto de tres modalidades diferentes de ejercicio, a diferentes niveles de intensidad, destacando que, en los tres casos, la práctica de ejercicio producía una disminución de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo a nivel reproductivo, así como una mejora de la calidad seminal y mayor integridad del ADN espermático.

Son varias las evidencias que demuestran que, dicho efecto beneficioso pudiera ser debido a, la disminución de mediadores inflamatorios que se producen con la práctica de un ejercicio moderado-controlado (Tartibian y cols., 2011, 2015; Abd El-Kader y cols., 2013; Hajizadeh Maleki y cols., 2017) y/o a la mejoría sobre el estado de estrés oxidativo también observado en diferentes tejidos y células (Ennezat y cols., 2001; Edwards y cols., 2004; Linke y cols., 2005).

Sin embargo, cuando el ejercicio se practica a un nivel más alto de intensidad (por ejemplo, en triatletas, maratonianos o ciclistas) los resultados son diferentes, observándose alteraciones de la función testicular. Así en maratonianos se han descrito alteraciones subclínicas en la densidad, motilidad y morfología espermática (Arce y cols., 1993, Jensen y cols., 1995), estando estas asociadas al nivel de entrenamiento (de Souza y cols., 1994, 1997); en ciclistas de resistencia, se han observado, desequilibrios en de estado de estrés oxidativo (Maleki y cols., 2014), así como descenso en los valores normales de morfología, concentración y motilidad espermática (Gebreegziabher y cols., 2004; Wise y cols., 2011; Kipandula y Lampiao, 2015); y en triatletas de élite se han descrito incremento en los niveles de fragmentación del ADN, en la cantidad de células redondeadas y en el porcentaje de morfoanomalías (Vaamonde y cols., 2009; Vaamonde y cols., 2018).

Existe la teoría de que ejercicio intenso a largo plazo puede en ocasiones no provocar alteraciones del seminograma ya que el propio sistema inmune y las enzimas antioxidantes han sido capaces de

producir una respuesta adaptativa, disminuyendo el efecto negativo mencionado (Homaee y cols., 2014).

#### 5.4. EJERCICIO FÍSICO Y FERTILIDAD EN ROEDORES

Dado que en ocasiones es difícil la investigación en seres humanos, gran parte de los estudios se realizan sobre modelos animales, en concreto sobre roedores. Algunas de las cepas (como en el caso de la CD-1) presentan características anatómicas y fisiológicas que les confieren propiedades adecuadas para ser usados en la investigación referente al cáncer, nuevos fármacos, y toxicidad. El ratón CD-1 adquiere la pubertad tanto en los machos como las hembras entre las 6 y 8 semanas, y el proceso de diferenciación de una espermatogonia en espermatozoide (espermatogénesis), tiene una duración de 43 días (Murta y cols., 2014), lo que hace que sea buen candidato para este tipo estudios.

La natación forzada y la carrera en cinta rodante son dos de los modelos más empleados en roedores (Wang y cols., 2010). La natación forzada en tanques de agua a temperatura controlada es uno de los métodos más utilizados, ya que permite valorar la función testicular evitando el efecto que el incremento de temperatura por roce pudiera tener sobre la misma, al mantener el agua entre  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura (Manna y cols., 2003 a, b, 2004; Jana y cols., 2008).

La valoración de como el ejercicio afecta a la función testicular en roedores viene siendo estudiada desde hace años. Cuando leemos la

literatura nos encontramos que existe mucha disparidad tanto en los protocolos empleados como en los resultados encontrados por los distintos autores. En este sentido, se han descrito efectos beneficiosos y efectos perniciosos con la realización de ejercicio. En cuanto a los beneficios que aporta se ha observado que, con modelos de ejercicio moderado (natación 15 minutos diaria), se incrementaban los niveles de testosterona y se reducían los marcadores de estrés oxidativo e inflamación asociados al envejecimiento (Zhao y cols., 2013). También en modelos moderados crónicos (carrera durante 14 meses), se observaba que, el ejercicio protegía a los testículos contra los efectos adversos del envejecimiento, al conseguir una adaptación del organismo a los cambios oxidativos ocasionados con la edad (Chigurupati y cols., 2008). En contraposición con estos resultados, otros autores han observado efectos negativos. En 2003, Mingoti y cols. fueron los primeros en valorar como un ejercicio moderado de natación forzada de 3 minutos diarios durante 15 días, producía una disminución del número de espermátidas. Empleando el mismo modelo, pero incrementando el número de días (50 días), otros autores apreciaban cambios en la motilidad, fertilidad y porcentaje de espermatozoides con formas anormales (Saki y cols., 2009, 2010; Rodríguez y cols., 2016). Con programas de ejercicio de mayor intensidad, son varios los autores que han descrito un estatus de estrés oxidativo testicular, junto con alteraciones de la espermatogénesis y por tanto alteraciones de parámetros del seminograma como: concentración, motilidad, morfología y vitalidad (Manna y cols., 2003, 2004 a, b; Jana y cols., 2008;

Minaii y cols., 2014; Moayeri y cols., 2018; Guo y cols., 2019). Manna y cols., (2003) observaban que un programa de natación de 3 horas, 5 días a la semana durante 4 semanas, producía alteraciones en la espermatogénesis, con alteración de la concentración y motilidad, al provocar una disminución de las enzimas antioxidantes del testículo y de los niveles de testosterona, junto con un incremento de la peroxidación lipídica de las membranas (Manna y cols., 2003; 2004 a, b). Jana y cols. en el año 2008 con una disminución de la intensidad a 1 hora, pero prolongando a 6 los días de la semana y a 8 el número de semanas observaban que, se producían alteraciones en los niveles de testosterona, en la espermatogénesis y en parámetros seminales como la morfología espermática y la concentración. Posteriormente otros autores como Minaii y cols., (2014) y Moyaeri y cols., (2017) con un programa de ejercicio similar al empleado por Jana reflejaban resultados similares con alteración del estatus oxidativo del testículo y alteración de parámetros seminales como la vitalidad, la motilidad y la morfología.

Con lo referido en los apartados anteriores, tanto en el hombre como en roedores, el ejercicio, pese a que la intensidad de este sea media moderada, en muchos de los casos resulta pernicioso para los parámetros espermáticos relacionados con la fertilidad (Saki y cols., 2009, 2010; Rodríguez y cols., 2016). Según la revisión bibliográfica realizada para este estudio, aun no se ha encontrado un patrón único que demuestre que el ejercicio sea beneficioso para la actividad sexual del



macho. Esto en gran parte es debido a, la gran variabilidad de tipos de entrenamientos, intensidades y duración que existen para todas las disciplinas.

## 5.5. ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES EXÓGENOS Y REPRODUCCIÓN.

Para mejorar la capacidad antioxidante inherente del organismo se ha estudiado la suplementación con antioxidantes exógenos a varios niveles, incluido el reproductivo. Son numerosos los estudios tanto en vivo como in vitro que han valorado el uso de sustancias con efecto antioxidante como tratamiento de infertilidad encontrándose resultados muy diversos (Safarinejad y cols., 2009, 2012; Cakiroglu y cols., 2014); esta diversidad de resultados se debe en parte a la falta de homogenización de los estudios y de los sujetos seleccionados.

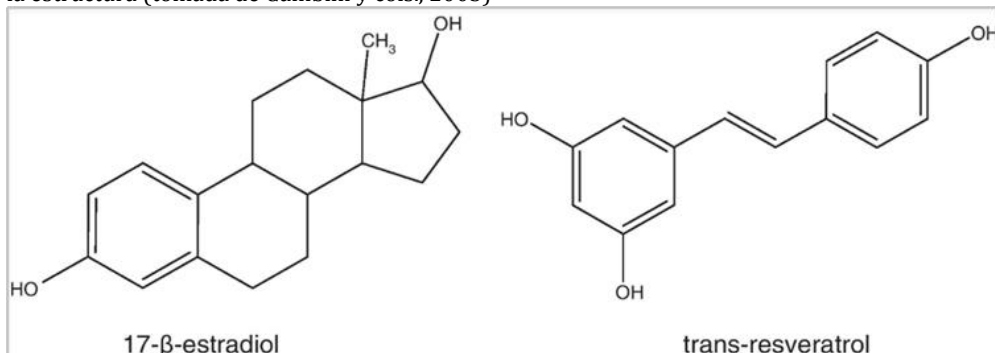
También se han valorado como suplemento en la dieta en sujetos sometidos a ejercicio para valorar si disminuyen los efectos perniciosos que el ejercicio produce sobre la función testicular. En este sentido, en modelos de ratones se ha empleado la melatonina, la vitamina C, la vitamina E, la N acetil cisteína y el resveratrol (Minaii y cols., 2014; Vijayprasad y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2016; Moayeri y cols., 2018).

### 5.5.1 Trans- resveratrol

El resveratrol es un polifenol, que ha sido clasificado como una fitoalexina debido a que se sintetiza en espermatofitas en respuesta a ciertos tipos de estrés, infecciones bacterianas y fúngicas, radiación ultravioleta o exposición a ozono. Está presente en alimentos como uva, arándanos, vino tinto y cacahuets, entre otros (Gao y cols., 2002). Los isómeros cis- y trans- coexisten en los alimentos naturales y plantas, sin embargo, la forma mayoritaria y más estable parece ser el isómero trans-. La cis-isomerización puede ocurrir cuando la isoforma trans- es expuesta a la luz solar (Chen y cols., 2007) o artificial o radiación ultravioleta (Camont y cols., 2009) a 254nm de longitud de onda o 366nm (Blache y cols., 1997).

Tiene una estructura química que muestra bastantes similitudes con estrógenos sintéticos como el dietilestilbestrol y con el 17- $\beta$ -estradiol (Fig 5), razón por la cual se han llevado a cabo varios estudios con la finalidad de probar su capacidad para actuar como un fitoestrógeno (Gehm y cols., 1997; Turner y cols., 1999).

**Figura 5.** Estructura química del trans-resveratrol y el 17  $\beta$  estradiol. Obsérvese su similitud en la estructura (tomada de Gambini y cols., 2005)

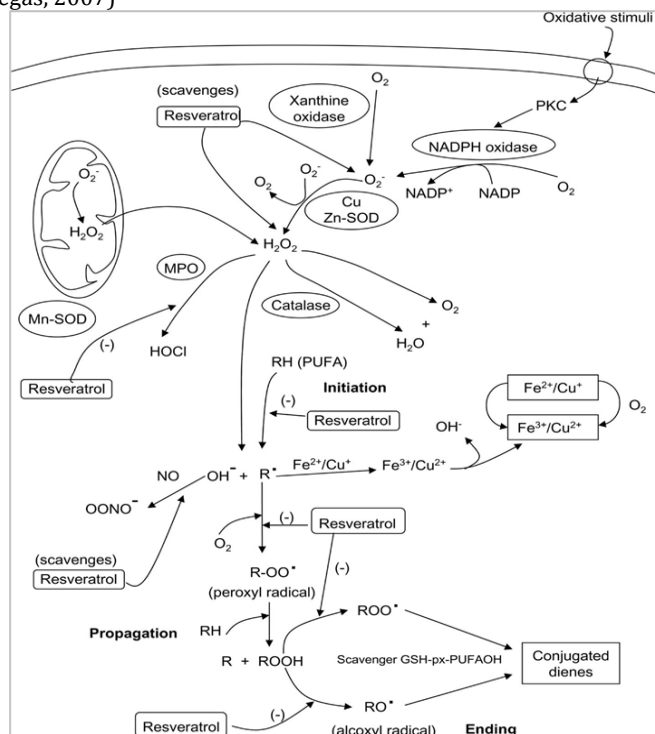


Además, como otros muchos polifenoles, el resveratrol puede sufrir un proceso de autooxidación, lo cual conlleva la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Fig 6). Su actividad antioxidante ha sido determinada en mitocondrias cerebrales aisladas, las cuales, al ser incubadas con estradiol, muestran una inhibición de la respiración mitocondrial. Además, inhibe la actividad del complejo III por competición con la coenzima Q; este hecho es interesante ya que determina su actividad antioxidante en la mitocondria, lo cual no solo se produce por su actividad en la captación de electrones desapareados ( $O_2^{\cdot-}$  y  $OH^{\cdot}$ ), sino, además, por actuar sobre un complejo que produce radicales libres. Como parte de su función antioxidante, también inhibe la peroxidación lipídica inducida por los productos de la reacción de Fenton (Zini y cols., 1997).

Otra de las actividades observadas más recientemente, es la de activación de las sirtuinas. Las sirtuinas son proteínas desacetilasas que

regulan el metabolismo, las respuestas al estrés y los procesos de envejecimiento, y se ha sugerido que median el efecto que prolonga la vida útil de una dieta baja en calorías (Shoba y cols., 2009) Así, la activación de la sirtuinas puede imitar efectos de extensión de la vida y aliviar enfermedades metabólicas (Gertz y cols., 2012). En cuanto al papel de las sirtuinas a nivel testicular se ha estudiado que juegan un papel importante en la regulación del metabolismo testicular (Rato y cols., 2016). Además de esta función, desde hace unos años se ha evidenciado su relevancia, especialmente de la SIRT 1, sobre el mantenimiento de la espermatogénesis. Así se ha demostrado su papel vital en la fertilidad observándose que animales carentes de SIRT 1 eran infértiles y exhibían una disfunción del eje hipotalámico gonadal. (Kolthur- Kolthur-Seetharam y cols., 2009). Todo este eje está controlado por varias hormonas y factores, entre ellos las sirtuinas, está demostrado que las sirtuinas afectan a la espermatogénesis primariamente al interrumpir el eje hipotálamo-pituitario. La SIRT 1 se expresa ampliamente en el hipotálamo (Cakir y cols., 2009) y su inactivación reduce la expresión de GnRH por el hipotálamo.

**Figura 6.** Puntos de acción del trans-resveratrol en los procesos de oxidación (tomado de Alacrón de Lastra y Villegas, 2007)



Las propiedades *in vitro* del trans-resveratrol han sido ampliamente estudiadas y contrastadas, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio y antialérgico. En cuanto a sus propiedades *in vivo* su actividad no está tan clara; existen numerosos estudios que encuentran beneficios sobre el sistema cardiovascular, enfermedades como la diabetes y sobre la longevidad; sin embargo, otros autores no encuentran una equivalencia de los estudios *in vitro* a *in vivo*. Esta discrepancia es debida a la biodisponibilidad que tiene el trans-resveratrol. Tras un

consumo oral se ha comprobado que la absorción es muy buena, pero las vías metabólicas dejan solo una pequeña fracción de resveratrol libre en sangre, por lo que la disponibilidad en los tejidos diana es muy baja y no se llegan a las concentraciones empleadas en los estudios *in vitro*. Así pues, aunque los estudios *in vitro* indican que se trata de una molécula biológicamente activa con propiedades saludables, los estudios realizados *in vivo* hasta el momento no pueden confirmar parte de estos resultados, lo cual puede atribuirse a su baja biodisponibilidad (Alarcón de Lastra and Villegas, 2007).

#### 5.5.1.1 Efectos del trans-resveratrol sobre la reproducción

En cuanto a sus efectos sobre la reproducción, se ha demostrado que protege particularmente a los espermatoцитos contra la peroxidación lipídica, incrementa el número de espermatozoides y mejora la motilidad (Shin y cols., 2008). Además, incrementa la producción de esperma al estimular el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en ratas (Juan y cols., 2005), disminuye la apoptosis en células germinales en ratones y ratas (Revel y cols., 2001), mejora la azoospermia inducida por 2,5 hexanodiona y promueve la espermatogénesis en ratas (Jiang y cols., 2008), minimiza los daños histológicos causados en testículos como consecuencia del estrés oxidativo que se produce con la inmovilización crónica (Bitgul y cols., 2013) y agentes oxidantes (Yuluğ y cols., 2013), disminuye las alteraciones tóxicas en testículo y epidídimo causadas por el cisplatino (Reddy y cols., 2016), reduce las alteraciones producidas

por varicocele inducido en ratas prepúberes en etapa adulta (Mendes y cols., 2016), y presenta cierta protección sobre las anomalías encontradas en espermatozoides de individuos con problemas de fertilidad debido a la obesidad (Cui y cols., 2016). También se ha usado en humana en medios de dilución en procesos de crío preservación para evitar o disminuir los daños en ADN y preservar la integridad del espermatozoides (Branco y cols., 2010).

Pese a esto, también se ha demostrado efectos negativos sobre la reproducción. Se ha observado que dosis de 8 y 20 mg/Kg/ administradas dos veces al día intraperitonealmente, hacen que el resveratrol actúe como pro-oxidante y consecuentemente provoque un incremento de la peroxidación lipídica con el consiguiente descenso de la cantidad de espermatozoides y la motilidad; una disminución de los niveles de enzimas antioxidantes; y una alteración de la histomorfología testicular, con pérdida significativa de células de Leydig (Ranawat y cols., 2013).

#### 5.5.1.2 Efectos del trans-resveratrol sobre reproducción en individuos sometidos a ejercicio

El trans-resveratrol ha sido empleado en modelos de ejercicio con la finalidad de valorar si previene o evita los daños producidos por el ejercicio sobre la función testicular. En un modelo animal, nuestro grupo valoraba el efecto de 200 mg/Kg de trans-resveratrol sobre la morfología espermática e histomorfometría de túbulos seminíferos en ratones

sometidos a un programa de ejercicio de 3 minutos diarios de natación forzada, durante 50 días, encontrando que, el trans-resveratrol protegía del daño sobre la morfología espermática que el ejercicio producía, así como disminuía la apoptosis (Rodríguez y cols., 2016). Con posterioridad otros autores también han observado que el resveratrol mejoraba la disfunción reproductiva causada por el ejercicio intenso al aumentar la secreción de testosterona, la capacidad antioxidante y al mejorar la vía de transducción de la señal de la espermatogénesis (Guo y cols., 2019).

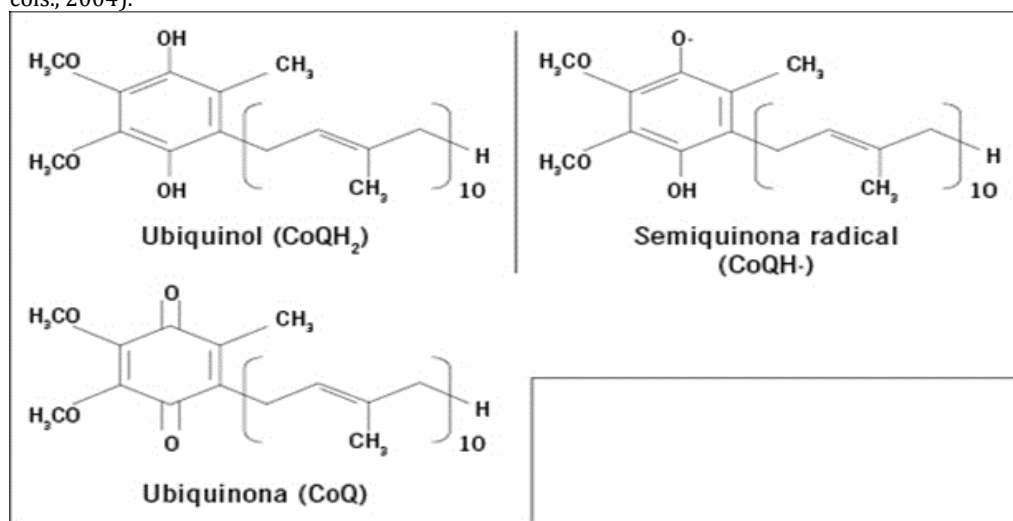
#### 5.5.2 Coenzima Q10 y ubiquinol

La coenzima Q10 (CoQ10) es una quinona, que se encuentra en multitud de organismos vivos como levaduras, plantas y animales. Hay tres estados redox de la CoQ10, totalmente oxidado (ubiquinona), semiquinona (ubisemiquinona) y totalmente reducida (ubiquinol) (Fig 7) Presenta dos actividades principales, de un lado bioenergética ya que es un componente de la cadena de transporte de electrones, participando en la respiración celular aeróbica, generando energía en forma de ATP y de otra antioxidante. La actividad antioxidante aparece solo con la forma reducida (ubiquinol), cuya concentración en el organismo es aproximadamente el 90% del total de CoQ10. Como antioxidante actúa a nivel de las membranas lipídicas y lipoproteínas (Kagan y cols., 1996), elimina radicales libres y previene la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica en las membranas celulares, ayudando además a la



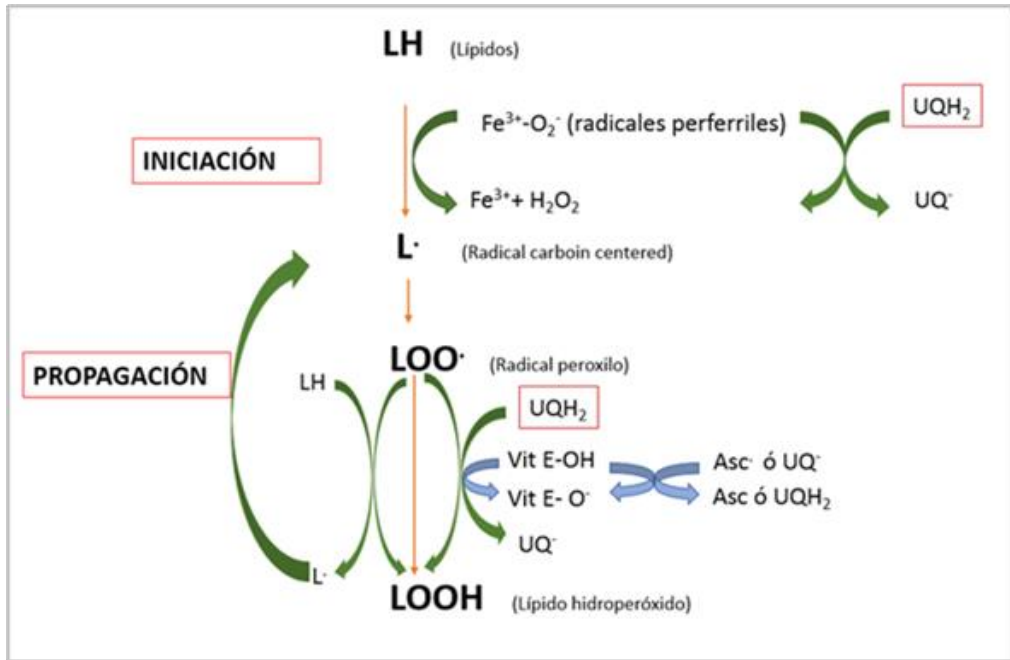
regeneración de otros antioxidantes como el tocoferol y el ascorbato (Crane y cols., 2001) (Fig 8).

**Figura 7.** Estructura química del ubiquinol, ubiquinona y semiquinona (tomado de Turunen y cols., 2004).



Su función como antioxidante no solo la realiza de forma individual sino también de manera cooperativa y sinérgica con otros antioxidantes. La interacción mejor conocida desde hace años es entre la coenzima y la vitamina C y E (Niki, 1997).

**Figura 8.** Lugares de acción del ubiquinol, vitamina E y ascorbato, en el proceso de peroxidación lipídica (modificado de Tururen y cols., 2004)



### 5.5.2.1 Efectos de la coenzima Q10 sobre la reproducción

Ambas funciones del Q10, bioenergética y antioxidante, sugieren su implicación en procesos de infertilidad masculina. De un lado, es del todo conocida la gran cantidad de mitocondrias presentes en el espermatozoide, las cuales, son necesarias para que adquiera su motilidad y de otro lado, la protección de membranas del daño oxidativo

podría jugar un papel importante en la preservación de integridad del esperma (Mancini y Balercia, 2011).

Es sabido que existen niveles de CoQ10 en plasma seminal y células espermáticas, donde probablemente ejerza funciones metabólicas y antioxidantes. Algunos autores han demostrado que la concentración de CoQ10 en plasma seminal muestra correlación directa con parámetros seminales como motilidad y concentración, encontrándose alteraciones en niveles de CoQ10 en condiciones asociadas con infertilidad como oligozoospermia, astenozoospermia y varicocele. (Mancini y cols., 1994; Balercia y cols., 2002; Mancini y Balercia, 2011; Gvozdjaková y cols., 2013).

En humana se han realizado estudios in vivo, para valorar cómo el ubiquinol usado como suplemento en la dieta, afecta a parámetros espermáticos de individuos con diferentes problemas de fertilidad, observándose resultados contradictorios debido posiblemente a la falta de homogenización en cuanto a dosis e individuos seleccionados. En lo que respecta a la concentración de espermatozoides algunos estudios han observado mejorías en pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática, a diferentes dosis (300mg y 200mg durante 26 semanas) (Safarinejad y cols., 2009, 2012), mientras que otros no han detectado cambios con dosis de 200 mg y 100 mg (Balercia y cols., 2009, Nadjarzadeh y cols., 2011, 2014, Carikoglu y cols., 2014). En cuanto a la motilidad y la morfología de los espermatozoides los resultados obtenidos también han sido controvertidos (Balercia y cols., 2004;

Balercia y cols., 2009; Safarinejad y cols., 2009, 2012; Nadjarzadeh y cols., 2011; Cakiroglu y cols., 2014).

En modelos de roedores el ubiquinol ha sido usado para valorar su efecto protector sobre la toxicidad testicular producida por exposición a campos magnéticos (Ramadan y cols., 2002) y a agentes oxidantes como el cadmio (Ognjanović y cols., 2010).

#### 5.5.2.2. Efectos de la coenzima Q10 sobre la reproducción en individuos sometidos a ejercicio

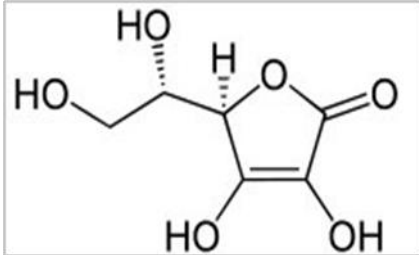
En nuestro conocimiento no hay ningún estudio, publicado hasta la fecha, ni en modelo animal ni humano, que haya valorado el efecto de la suplementación con ubiquinol sobre la fertilidad de individuos sometidos a ejercicio.

#### 5.5.3 Ácido ascórbico (vitamina C)

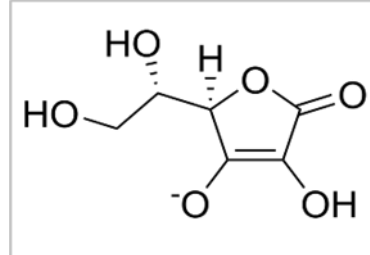
El ácido ascórbico (Fig 9), también conocido como Vitamina C, es una vitamina esencial y un importante antioxidante hidrosoluble, que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. El ascorbato ( $AH^-$ ) (Fig 10), forma químicamente estable, es un gran agente reductor debido a sus dos hidroxilos ( $OH^-$ ) ionizables, capaces de eliminar de los tejidos los ERO. El ácido ascórbico también posee la capacidad de regenerar la vitamina E, y de esta manera la mantiene en un estado activo contribuyendo a la

acción antioxidante. Protege de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad, conjugándose con compuestos hidrofóbicos.

**Figura 9.** Ácido ascórbico (Vitamina C)



**Figura 10.** Ascorbato



#### 5.5.3.1 Efecto del ácido ascórbico sobre la reproducción

El ácido ascórbico, es un antioxidante, presente en plasma seminal y también en pequeñas pero detectables concentraciones en células espermáticas, así sus niveles en plasma seminal son 10 veces mayores a los encontrados en sangre (Jacob y cols., 1992). Juega un importante papel en el correcto desarrollo de la espermatogénesis, así como en la protección del testículo del daño oxidativo (Sönmez y cols., 2005; Aitken y Roman, 2008) de un lado por su efecto antioxidante y de otro porque incrementa los niveles de testosterona en sangre (Okon y Utuk, 2016; Sönmez y cols., 2005). Como antioxidante, la vitamina C neutraliza radicales hidroxilos, superóxidos y peróxidos de hidrógeno y previene la peroxidación lipídica. En ratones sanos, a dosis equivalente a la empleada en humana, se ha visto que reduce la peroxidación lipídica (Sönmez y cols., 2005) e incrementa la cantidad de esperma y la proporción de espermatozoides con morfología normal (Mishra y

Acharya, 2004). En humana, los niveles de ácido ascórbico en plasma seminal están positivamente correlacionados con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (Thiele y cols., 1995) y negativamente correlacionados con la fragmentación de ADN (Song y cols., 2006). A concentraciones menores de 1000  $\mu\text{mol/L}$ , la vitamina C es antioxidante y a concentraciones mayores actúa como agente prooxidante (Lanzafame y cols., 2009). Se ha visto que, el tratamiento con un gramo diario de vitamina C, mejora la calidad de esperma en humanos, incrementando la cantidad de esperma la concentración y motilidad (Eskenazi y cols., 2005), no estando bien establecidos los periodos de duración de tratamientos. Además, se ha visto en diferentes modelos de animales, que reduce los efectos deletéreos que algunas sustancias tóxicas y venenos producen sobre la fertilidad (Salem y cols., 2001; Das y cols., 2002; Ahkorede y cols., 2020).

#### 5.5.3.2 Efectos del ácido ascórbico sobre la reproducción en individuos sometidos a ejercicio

El efecto beneficioso de la suplementación oral con ácido ascórbico en la dieta si ha sido estudiada en modelos animales de ejercicio. Samanta y cols., (2006) administrando diariamente 25 mg/Kg de vitamina C a ratones sometidos a natación forzada (3 horas diarias, 5 días a la semana, durante 6 semanas), observaban un efecto protector sobre la función testicular. Posteriormente otros estudios corroboraban su efecto beneficioso sobre modelos de ejercicio al mejorar la

concentración y motilidad espermática a dosis de 20-30 mg/Kg/día  
(Vijayprasad y cols., 2014).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*







## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 ANIMALES

Para el estudio se usaron 75 ratones macho, de la cepa CD-1, de 65 días de edad y 40gr de peso, procedentes de los laboratorios Janvier Labs” Rodent Research Model and Associated Services” (Francia).

Los animales se alojaron en el animalario del Servicio Centralizado de animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba en jaulas individuales y se mantuvieron en un ambiente controlado de  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 55% de humedad y un ciclo de luz/oscuridad 12/12 (Fig 11). Se alimentaron con pienso estándar comercializado por PANLAB S.L y agua *ad libitum*. Antes del inicio, se respetó un periodo de 5 días de aclimatación. El experimento fue aprobado por el Comité Bioético de la Universidad de Córdoba.

Los animales se distribuyeron al azar en 5 grupos homogéneos de 15 ratones (n=15):

- Grupo control (CG): grupo control en reposo
- Grupo ejercicio (EJERC): grupo de ejercicio de natación sin antioxidantes
- Grupo ejercicio + Trans-resveratrol (EJ-Resv): grupo ejercicio de natación con administración de trans-reveratrol.

- Grupo ejercicio + Ubiquinol (EJ-Ubiq): grupo de ejercicio de natación con administración de ubiquinol.
- Grupo ejercicio + Excipiente (EJ-Excp): grupo de ejercicio de natación con administración de excipiente.

Diariamente los animales se revisaron clínicamente de manera individual para valorar cualquier problema que pudiera surgir durante el estudio que los hiciera tornarse no aptos para el experimento.

**Figura 11.** Fotografía de tres de los grupos sometidos a estudio. Los animales estaban alojados en cajas individuales



## 6.2. PROGRAMA DE EJERCICIO

Los animales de los grupos EJERC, EJ-Resv, EJ-Ubiq y EJ-Excp, se sometieron durante 50 días a una sesión diaria de ejercicio intenso de 3 minutos de natación forzada (Saki y cols., 2009, 2010; Vaamonde y cols., 2012; Rodríguez y cols., 2016) en piscinas circulares de 60 cm de diámetro y 80 cm de profundidad con agua a temperatura controlada de entre 33-35°C (Fig 12). El orden de los animales era distinto cada día y se hacía de forma aleatoria con el fin de minimizar el estrés por manipulación y entrenamiento. Al final de cada sesión los animales se secaron con toallas y se devolvieron a sus jaulas. Los animales del grupo CG, que no realizaban ejercicio, se manipularon al igual que el resto simulando el secado con toalla.

**Figura 12.** Ratón sometido a una sesión diaria de natación en tanque de agua templada.



### 6.3 ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes se administraron mezclados con pienso en tortas de 1 gramo. Los equipos empleados para la elaboración de las tortas pertenecen a la Unidad de Banco de Muestras del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI). Para la elaboración de estas en primer lugar se molió el pienso con un molinillo de laboratorio con un tamiz de 1mm. Este se mezcló con una cantidad de agua destilada en una proporción 1:1, en la cual previamente se había disuelto la cantidad proporcional de antioxidante correspondiente. Las dosis seleccionadas fueron: 200 mg/Kg de trans-resveratrol (Caiman Chemical Company), 200 mg/Kg de ubiquinol + excipiente compuesto por 73.93% de goma arábica, 20.44% dextrina y 4.63% de vitamina C del Laboratorio Kaneka y la cantidad proporcional de excipiente correspondiente a 200mg de ubiquinol del laboratorio Kaneka. Tras mezclar durante 5 minutos para homogenizar la masa ésta se metió en moldes de poliespán de 1 cm de diámetro y 2,5 de profundidad. Una vez en los moldes, éstas se congelaron a -80°C durante 24 horas y posteriormente se liofilizaron durante 24 horas más en un liofilizador EZ-Dry, modelo AZ-20, (FTS Systems, Stone Ridge, Nueva York) conectado a una bomba de vacío marca Telstar tipo 110/80 VDE0530/72 26/96 (Teslta, Tarrasa, España), existente en la Unidad de Banco de Muestras del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI). Tras esto se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron a -21°C hasta su posterior uso. La elaboración

de las tortas de trans-resveratrol se realizó en un cuarto oscuro con luz roja tenue para evitar la isomerización de la molécula. Además, se elaboraron tortas placebo de la misma manera sin añadir ningún antioxidante para los grupos CG y EJERC.

De cada lote de tortas se tomaron 20 unidades elegidas de forma aleatoria para analizar el contenido de antioxidante en cada lote. Las tortas de trans-resveratrol y ubiquinol se analizaron en el SCAI de la Universidad de Córdoba mediante método de extracción por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detección por DAP (Detector de diodo Array) (Rodríguez-Bernaldo col., 2009) para las tortas de trans-resveratrol, y las de ubiquinol se analizaron mediante extracción de la fracción lipídica del pienso (con hexano) y separación mediante HPLC con detector electroquímico (López-Domínguez y cols., 2013).

Las tortas se administraban junto con el pienso tras la finalización del ejercicio (Fig 13). En el caso del trans-resveratrol, éstas se administraron por la tarde con el inicio del ciclo de oscuridad para evitar que se isomerizara el producto con la luz.

**Figura 13.** Administración de antioxidantes diarios a uno de los animales



#### 6.4. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Veinticuatro horas tras la finalización del experimento los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical (Howell y cols., 2003) y posterior decapitación. Una vez sacrificados se abrió el abdomen por laparotomía en línea media para la obtención de epidídimos y testículos. Los epidídimos se diseccionaron y despojaron de la grasa circundante y se procedió a abrir la cola con ayuda de una aguja de 22 gauge para vaciar el contenido espermático sobre en un portaobjetos de cristal (Sztein y cols., 2000). Los testículos se extrajeron y se identificaron individualmente y se conservaron en alcohol de 80º durante 24 horas para posteriormente conservarlos en fijador de Bouin por un máximo de 48 horas. Transcurrido dicho tiempo en el laboratorio del Departamento de Ciencia Morfológicas de la Facultad de Medicina de

la UCO, se procedió a realizar la inclusión en parafina y los cortes a 4 micras, que se tiñeron para su posterior análisis histológico con la tinción de hematoxilina- eosina.

## 6.5. VALORACIÓN MORFOLÓGICA Y VITALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES

La morfología y la vitalidad son dos parámetros que se incluyen en el seminograma básico, correlacionados con la fertilidad del macho. El incremento en el número de espermatozoides anormales es indicativo de alteraciones durante el proceso de la espermatogénesis (anomalías mayores) o durante el proceso de transporte de los espermatozoides por el sistema de conductos del testículo y epidídimo (anomalías menores). La vitalidad espermática indica la proporción de espermatozoides vivos en el eyaculado y también es indicativo de alteraciones durante el proceso de espermatogénesis y del tránsito epididimario.

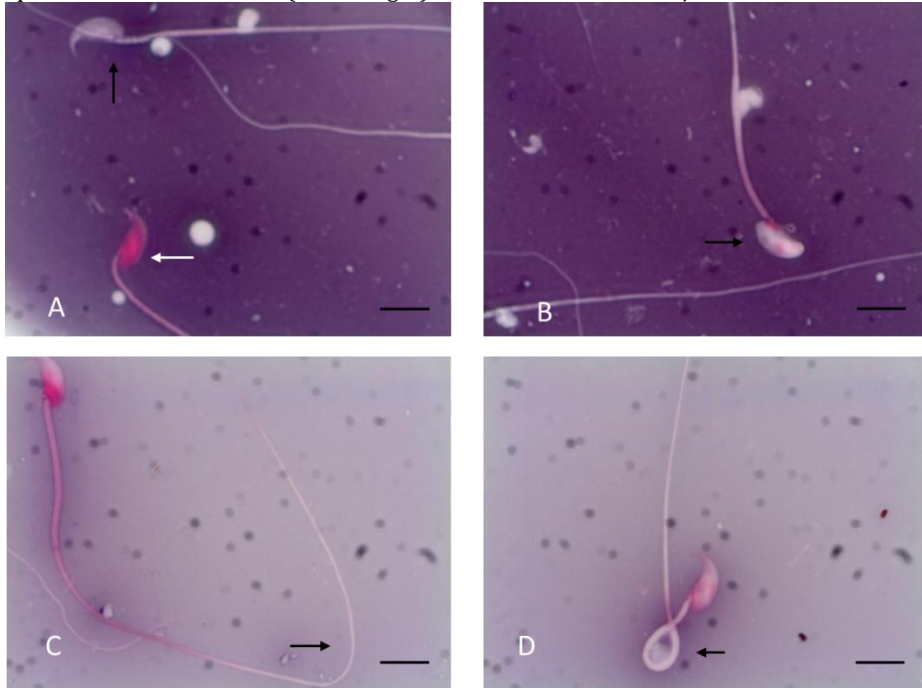
Para la valoración morfológica y de la vitalidad de los espermatozoides, se realizó una tinción con eosina-nigrosina (Vital Screen™, FertiPro®) (Fig 14). La tinción se preparó de la siguiente forma por cada animal: en un tubo eppendorf se mezclaron de forma previa los dos colorantes (20 µl de eosina y 30 µl de nigrosina) y se atemperó introduciéndolo en el baño maría a 35°C durante un minuto, para posteriormente introducir las dos colas del epidídimo previamente abiertas en el eppendorf. Tras esto, se colocaron de nuevo al baño maría durante otro minuto tras homogeneizar la solución con una micropipeta.



Pasado este tiempo, se obtuvo una alícuota de la mezcla, que se colocó sobre uno de los extremos del portaobjetos de cristal y se realizó una extensión. Se realizaron dos extensiones por cada animal.

Se valoraron 100 espermatozoides por cada portaobjetos, por tanto, 200 espermatozoides por ratón (Kvist y Björndahl, 2002) mediante microscopía óptica (Olympus BH-2) a 100x bajo aceite de inmersión. Se observó y anotó el número de espermatozoides normales y anormales, tomando como referencia el tipo de anomalía hallada en cabeza (cabeza doble, grande, delgada, forma de martillo o inserción abaxial), pieza intermedia (doblada, engrosada, delgada o con gota citoplasmática) y cola (cola en gancho, en lazo o doble) siguiendo la clasificación de Wyrobek y Bruce (1975). Las anomalías de los espermatozoides se clasificaron como mayores, las que afectaban a la cabeza o a la pieza intermedia del espermatozoide y menores las que afectaban a la cola. Además, en esos 200 espermatozoides analizados por ratón, también se valoró y anotó la vitalidad de estos, diferenciando los vivos (en los que no había penetrado el colorante), de los muertos (en los que sí había penetrado el colorante). Tanto la morfología como la vitalidad se realizaron por el mismo operador para disminuir la posible variabilidad entre operadores. Los datos obtenidos se recogieron en tablas de Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico.

**Figura 14.** Valoración de morfología y vitalidad espermática mediante la técnica de eosina-nigrosina. A) espermatozoides normales (flechas blanca y negra); B) espermatozoide con cabeza anormal (flecha negra); C) espermatozoide con cola anormal (flecha negra) D) espermatozoide con pieza intermedia anormal (flecha negra). Barra de escala indica 8µm



## 6.6. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS Y MEDICIONES CELULARES

Para el estudio histomorfométrico se empleó un microscopio Nikon Eclipse de 100X, equipado con una cámara digital Sony y el correspondiente software formato tif-RGB de 24 bits para la captura y tratamiento de imágenes digitales, previa calibración con un micrómetro

homologado Leitz a 5, 10 y 20X, perteneciente al Departamento de Ciencias Morfológicas y Sociosanitarias de la Facultad de Medicina de la U.C.O. Las imágenes capturadas se enviaron y archivaron en un banco de imágenes etiquetadas con las referencias de cada una de las muestras que constituyen los diferentes lotes de estudio experimental y sus correspondientes patrones. Posteriormente, las imágenes se cargaron en el archivo para su análisis morfométrico con el programa Image ProPlus (IPWin 4) de Media Cybernetics versión 6.1 (Rockville, MD, USA).

#### 6.6.1 Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos

El objetivo de ese análisis fue valorar el de tamaño de los túbulos seminíferos que puede ser indicador de atrofia o hipertrofia testicular, determinando además alteraciones del volumen de las células que integran el epitelio del túbulo seminífero que puede ser consecuencia de cambios en la espermatogénesis/espermiogénesis.

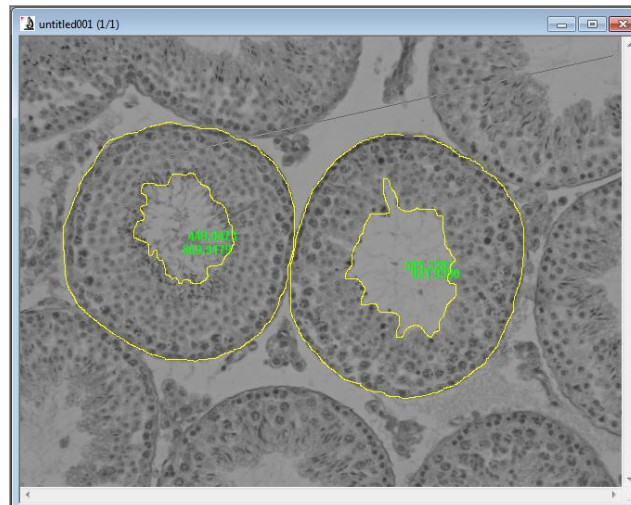
Se analizó una media de 10 túbulos por ratón de cada uno de los cinco grupos estudiados. Para estas valoraciones partimos de las imágenes tomadas con el objetivo de 10X de las preparaciones teñidas con hematoxilina eosina evitando repetir estructuras u objetos ya seleccionados y fotografiados.

El análisis histomorfométrico de los túbulos seminíferos consistió en el análisis de los siguientes parámetros:

### 6.6.1.1 Área del epitelio germinativo ( $\mu^2$ ), porcentaje de epitelio germinativo y porcentaje de la luz de los túbulos seminíferos

Para calcular dichos parámetros, se trazaron los contornos tanto externo como de la luz de los túbulos seminíferos (Fig 15). El área del epitelio se obtuvo de calcular la diferencia del contorno externo del túbulo menos el contorno de la luz interno, el porcentaje del epitelio germinativo se calculó empleando la siguiente fórmula (área del epitelio/contorno del túbulo x 100) y el porcentaje de la luz se calculó utilizando la siguiente fórmula (contorno de la luz/contorno del túbulo x 100). Los resultados de estos tres parámetros se exportaron a una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

**Figura 15.** Delimitación de los contornos externos y de la luz sobre las imágenes a 10X, para la determinación del área de epitelio, porcentaje de epitelio y porcentaje de luz de los túbulos seminíferos.



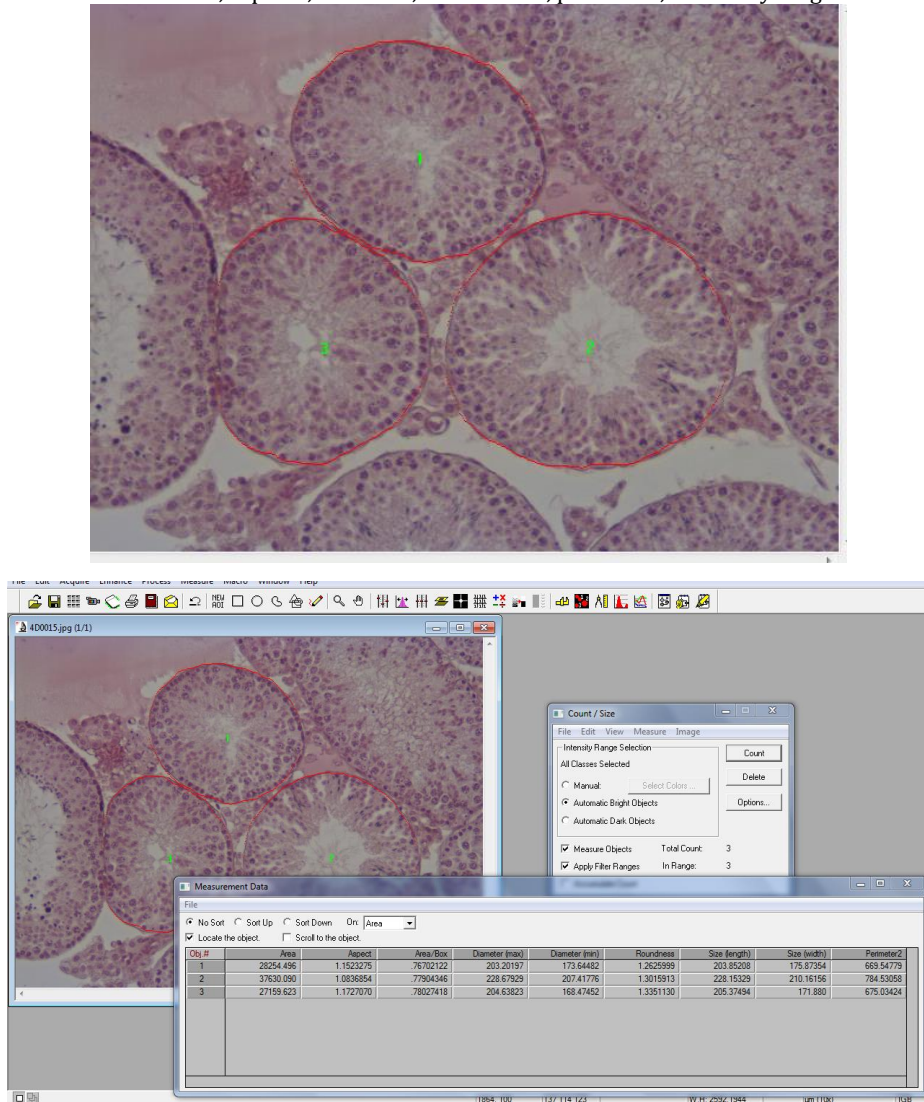
6.6.1.2. Área ( $\mu^2$ ), aspecto, área/box ( $\mu^2$ ), diámetro mínimo ( $\mu$ ), circularidad ( $\mu$ ), longitud ( $\mu$ ), anchura ( $\mu$ ), y perímetro2 ( $\mu$ )

Se realizó el trazado del contorno externo de los túbulos seminíferos completos en cada campo microscópico (Fig 16), una vez tomada la medición y con la utilización del programa Image ProPlus (IPWin 4) en dicho programa valoramos los siguientes parámetros:

- Área: área del objeto, sin incluir espacios o agujeros.
- Aspecto: relación entre el eje mayor y el eje menor de la elipse, en nuestro caso túbulo seminífero.
- Área/box: relación entre el área del objeto y el espacio que lo delimita.
- Diámetro mínimo: es el diámetro que menos varía dependiendo de los cortes y que pasa por el centro de gravedad.
- Circularidad: determina la rugosidad del contorno del túbulo seminífero, para su cálculo se necesita previamente la determinación del perímetro2 y del área y se ajusta a la fórmula:  $(\text{perímetro2})^2 / 4\pi \times \text{área}$ .
- Longitud: mide el valor de la longitud a lo largo del eje mayor del túbulo sin pasar por el centroide.
- Anchura: mide el valor del eje menor del túbulo.
- Perímetro2: mide la longitud de la línea del contorno externo del túbulo.

Posteriormente todos estos datos se exportaron a una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

**Figura 16.** Delimitación de los contornos de los túbulos seminíferos sobre las imágenes de 10X para determinar el área, aspecto, diámetro, circularidad, perímetro, anchura y longitud.



### 6.6.1.3. Mediciones celulares de la pared de los túbulos

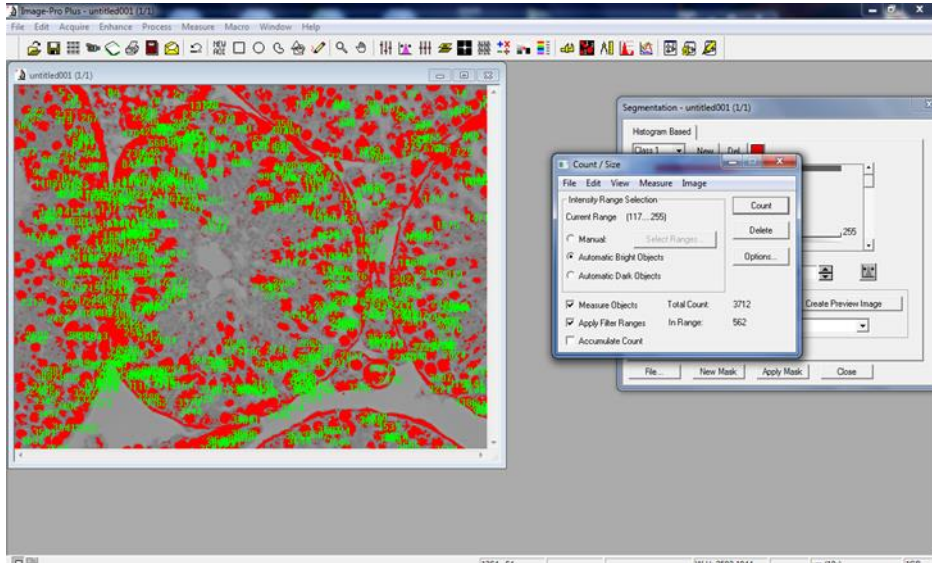
#### seminíferos

Utilizando las mismas preparaciones histológicas empleadas en el análisis histomorfométrico de los túbulos seminíferos, se cuantificó el área, aspecto y diámetro en una media de 10 túbulos por ratón. Estos parámetros se valoraron con el objetivo de 20X en muestras teñidas con hematoxilina eosina. La imagen con formato tif de 24 bits se convirtió en imagen 8 bits en blanco/negro. Con la herramienta de segmentación manual del programa Image Pro Plus (IPWin 4) se establecieron los rangos previos (niveles de grises) (Fig 17) en los que la segmentación se va a realizar, para separar estructuras nucleares de las que no lo son, teniendo en cuenta la intensidad de su color o densidad hacia el negro, (valor 0) siendo las estructuras altamente teñidas las que se corresponden con la cromatina del núcleo, mientras que aquellas que tienden al blanco corresponden a estructuras menos densas (citoplasma celular, espacio intersticial, luz de vasos, edema, vacuolas, etc.).

- Área, aspecto y diámetro de los núcleos.

Dichos parámetros se analizaron para determinar si los núcleos de las células que integran el epitelio germinativo presentaban signos de procesos degenerativos que pudieran estar indicando un daño oxidativo. Para ello se utilizaron las preparaciones 20X en muestras teñidas con hematoxilina eosina y se seleccionaron en el programa Image ProPlus (IPWin4) para posteriormente pasarlo a una hoja de Excel y realizar el análisis estadístico.

**Figura 17.** Proceso de segmentación sobre preparación de 20X, previamente convertida a blanco/negro, para determinación del área, aspecto y diámetro de los núcleos de las células de la pared del túbulo seminífero.



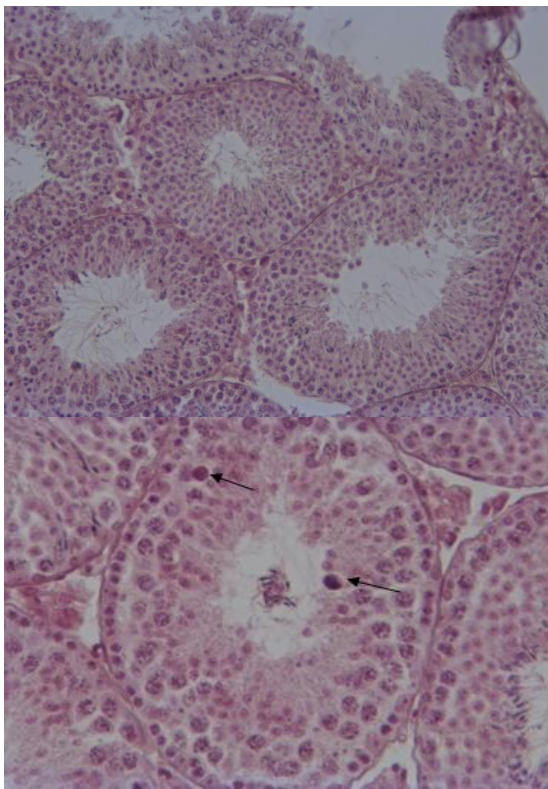
## 6.7 ESTUDIO SUBJETIVO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS Y DE LA ESPERMATOGÉNESIS

El estudio de la espermatogénesis, así como la valoración de alteraciones en los túbulos seminíferos, se realizó de forma subjetiva siguiendo las indicaciones de un experto histopatólogo el Prof. Dr. José Peña Amaro del Departamento de Ciencias Morfológicas y Sociosanitarias de la Facultad de Medicina de la U.C.O., sobre las preparaciones de 20X previamente teñidas con hematoxilina eosina (Fig 18). En este sentido se valoró presencia de edema, arquitectura de la

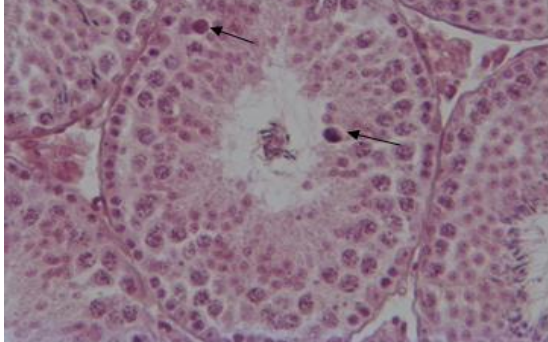


pared, presencia de células inmaduras en luz del túbulo seminífero y apoptosis celular.

Se consideró que existía apoptosis cuando se apreciaba condensación de la cromatina, vacuolización del citoplasma y rugosidad de la membrana celular (Fig 19). Los datos fueron apuntados en los diferentes grupos para su posterior análisis estadístico. También se recogieron los datos de los animales que presentaron células inmaduras en la luz de los túbulos.



**Figura 18.** Microfotografía a 10X de corte transversales de túbulos seminíferos normales.



**Figura 19.** Microfotografía a 20X de corte transversal de túbulo seminífero. Las flechas marcan el detalle de fenómenos de apoptosis celular.

## 6.8. ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Para valorar y cuantificar el estrés oxidativo se midió la peroxidación lipídica de las membranas celulares, como indicador de daño oxidativo de los lípidos mediado por las especies reactivas de oxígeno y se cuantificó las enzimas antioxidantes involucradas en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno, así como los niveles de uno de los principales antioxidantes del testículo, como es el Coenzima Q. Estos datos fueron determinados en Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD-CSIC), Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, por el Prof. Dr. Guillermo López Lluch.

### 6.8.1 Peroxidación lipídica

Para la determinación de peroxidación lipídica se determinaron niveles de malondialdehído (MDA) testicular. El malondialdehído es uno de los principales productos derivados de la peroxidación de los lípidos de las membranas. Incrementos de los niveles de éste se asocian con aumento de la peroxidación. Este se determinó con la reacción del MDA con dos moléculas de 1-metil-2-phenilindole a 45°C, como describió previamente (Gérad-Monniem y cols. 1998). Los niveles de MDA se expresan como nmol por mg de proteína.

### 6.8.2 Enzimas antioxidantes

Los cambios en la cantidad de enzimas antioxidantes también se han usado en numerosos artículos para valorar el estrés oxidativo en testículo de ratón. En nuestro estudio hemos usado los niveles de enzimas antioxidantes del testículo como: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd).

- Catalasa: la actividad de la catalasa se midió usando la de la función peroxidativa de la catalasa con el kit comercial de catalasa (Cayman Chemicals 707002). La función peroxidativa está basada en la conversión de alcoholes alifáticos en aldehidos, en presencia de una concentración optima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por esta razón, usando metanol como alcohol alifático y midiendo la cantidad de formaldehido generado se determina la actividad de la catalasa.
- Superóxido dismutasa (SOD): la actividad de la SOD se midió con el kit comercial (Sigma 19160) que determina la cantidad de WST-1 formazan generada. Este componente se genera como consecuencia de la oxidación de WST-1 por el anión superóxido. Así, un incremento en la SOD debería mostrar un descenso de formación de WST-1 formazan.
- Glutatión peroxidasa (GPx): la actividad GPx fue medida un ensayo enzimático acoplado previamente descrito (Tung y cols., 2015). El ensayo midió la tasa de oxidación de NBADPH a 340 nm utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

- Glutación reductasa (GRd): la actividad de la GRd se determinó midiendo la oxidación del de NADPH a 340 nm como fue descrito previamente (Carlberg y Mannervik, 1985).

### 6.8.3. La actividad antioxidante total (TAS)

La actividad antioxidante total nos determina la capacidad de un tejido para prevenir la oxidación. En nuestro estudio se determinó monitorizando la capacidad de los antioxidantes para inhibir la oxidación ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). La capacidad del antioxidante en la muestra para prevenir la oxidación de ABTS fue comparada con la del Trolox (6- Hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcromano- ácido 2- carboxílico), permitiendo el cálculo de la capacidad antioxidante.

### 6.8.4 Niveles de Coenzima Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub>

Un indicador de generación de especies reactivas de oxígeno en tejidos es la determinación de la ratio Coenzima Q<sub>9</sub>/Q<sub>10</sub>. Así la cantidad de especies reactivas de oxígeno presentes en dicho tejido es directamente proporcional a dicho ratio.

Los niveles de Coenzima Q<sub>9</sub> and CoQ<sub>10</sub> se determinaron como indican Rodríguez-Bies y cols., (2015) por extracción de lípidos desde un homogeneizado con hexano y separados con HPLC según Fernández-Ayala y cols. (2005). Los niveles se indican como pmol/mg proteína. La

ratio Coenzima Q<sub>9</sub>/Q<sub>10</sub> se calculó mediante la división de los datos obtenidos para cada parámetro.

Los resultados obtenidos se pasaron a una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

## 6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI (StatPoint Technologies Inc, 2009), con la ayuda de los profesores de la UCO, Juan Manuel Serrano Caballero y Antonio Molina. Los datos se expresan como las medias  $\pm$  desviación estándar (DS). Para valorar las diferencias entre grupos en datos expresados como porcentajes se realizó una prueba de chi cuadrado y para los valores expresados como medias, en primer lugar, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para ver el patrón de distribución que seguían. A los datos que presentaban un patrón de distribución normal, se les realizó un análisis de la varianza ANOVA y a los que no, se les realizó una prueba de Kruskal Wallis. De otro lado para ver si existían diferencias entre grupos, se realizaron una prueba de Friedman para variables no normales y una prueba de Tuckey para variables normales. Se consideró significativo cuando el valor de “p” presentaba un valor menor a 0,05.

## *RESULTADOS*





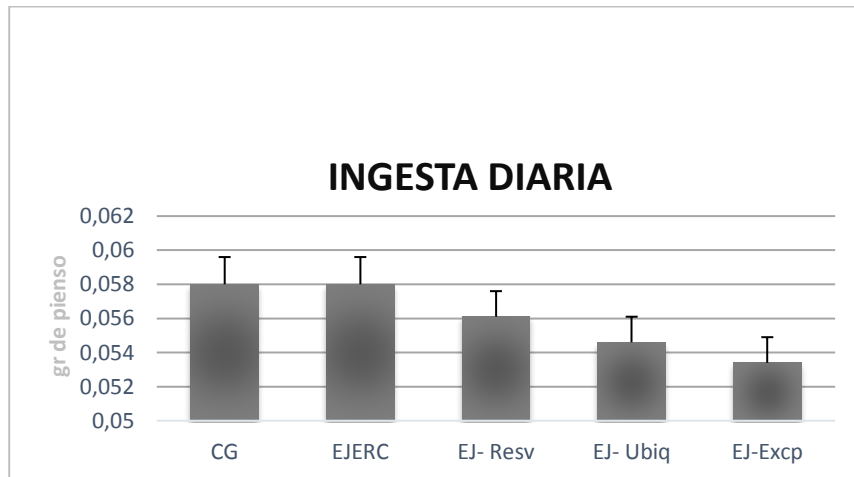
## 7. RESULTADOS

Todos los animales que comenzaron el estudio lo terminaron en buenas condiciones de salud, como se evidencia por la ganancia de peso (Tabla 1) y la ausencia de manifestaciones de mal adaptación o problemas de salud, como alteraciones del apetito o de su actitud (Fig 20).

**Tabla 1.** Ganancia de peso tras los 50 días del estudio. No se observaron diferencias significativas entre grupos.

	<b>GC (n=15)</b>	<b>EJERC (n=15)</b>	<b>EJ-Resv (n=15)</b>	<b>EJ-Ubiq (n=15)</b>	<b>EJ-Excp (n=15)</b>
<b>Ganancia de peso (gr)</b>	0,45±1,75	1,35±1,80	0,68±1,44	1,08±0,92	1,34±1,37

**Figura 20.** Ingesta diaria de pienso en los distintos grupos de estudio, datos expresados como medias ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas entre grupos.





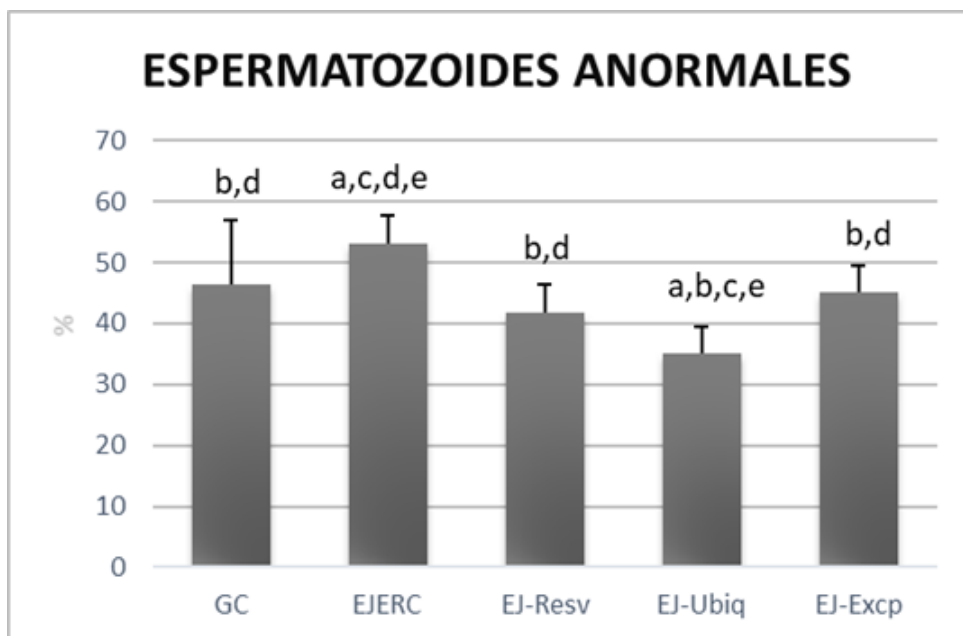
## 7.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con morfo-anomalías, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ), siendo el grupo EJERC el que mayor porcentaje presentó y mostrando diferencias significativas con respecto a el GC. Los grupos de tratamiento y excipiente presentaron un menor porcentaje de formas anormales que el grupo EJERC ( $p < 0,05$ ) siendo el grupo EJ-Ubiq el que, entre todos los grupos de tratamiento antioxidante, presentó el menor porcentaje de anomalías ( $p < 0,05$ ) (Fig 21).

Al tener en cuenta la clasificación de anomalías como mayores (afectan a cabeza y pieza intermedia) y menores (afectan a la cola), se observó que los grupos GC y EJERC, son los que presentaron un porcentaje significativamente mayor de anomalías mayores, hallándose éstas disminuidas de forma significativa en los grupos tratados con antioxidantes; el grupo EJ-UBIQ mostró el menor porcentaje de estas ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las anomalías menores, no se encontraron diferencias entre grupos (Tabla 2). Cuando valoramos por separado los distintos segmentos del espermatozoide observamos que, las anomalías de pieza intermedia y cola fueron estadísticamente mayores en el grupo EJERC que en GC, disminuyendo las de pieza intermedia en los tres grupos de tratamiento de forma significativa y las de cola solo en el grupo EJ-Resv (Tabla 3). Respecto a las anomalías de cabeza, aunque no se observaron diferencias entre GC y grupo EJERC como resultado del ejercicio, todos los antioxidantes provocaron una mejora significativa

(Tabla 3). El grupo EJERC mostró un mayor porcentaje de anomalías múltiples, porcentaje que fue menor en los grupos de ubiquinol y trans-resveratrol, pero no en el grupo de excipiente (Tabla 3).

**Figura 21.** Representación del porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).



<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup> diferencias significativas con grupo EJ- Resv, <sup>d</sup> diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup> diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

**Tabla 2.** Porcentaje de anomalías mayores y menores observadas en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

GRUPO	%Anomalías mayores	% Anomalías menores
GC	26,06 $\pm$ 8,87 <sup>cd</sup>	16,2 $\pm$ 7,13
EJERC	27,6 $\pm$ 5,63 <sup>cde</sup>	19,43 $\pm$ 6,18
EJ-Resv	19,2 $\pm$ 6,76 <sup>abd</sup>	17,5 $\pm$ 4,99
EJ-Ubiq	12,73 $\pm$ 3,62 <sup>abce</sup>	18,3 $\pm$ 5,37
EJ-Excp	19,86 $\pm$ 8,15 <sup>bd</sup>	19,13 $\pm$ 5,79

<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

**Tabla 3.** Porcentaje de anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola observado en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

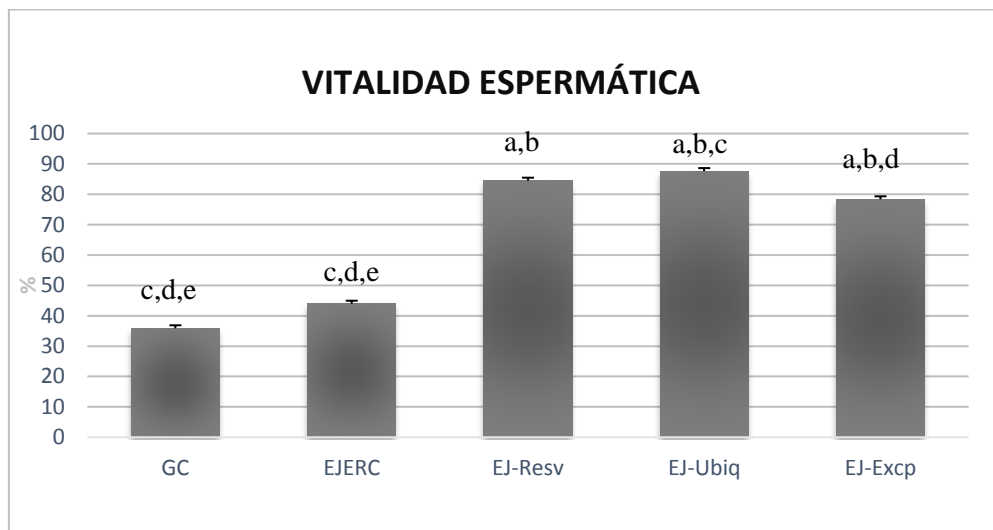
GRUPO	% Anomalías de cabeza	% Anomalías PI	% Anomalías de cola	% Anomalías múltiples
GC	3.16 $\pm$ 1.90 <sup>cde</sup>	22.9 $\pm$ 8.99 <sup>bd</sup>	16.2 $\pm$ 7.13 <sup>bde</sup>	4.2 $\pm$ 2.29 <sup>be</sup>
EJERC	2.46 $\pm$ 1.12 <sup>cde</sup>	25.2 $\pm$ 5.73 <sup>acde</sup>	19.43 $\pm$ 5.42 <sup>ac</sup>	5.93 $\pm$ 3.2 <sup>acd</sup>
EJ-Resv	0.26 $\pm$ 0.79 <sup>ab</sup>	18.93 $\pm$ 6.93 <sup>bd</sup>	17.53 $\pm$ 4.99 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 2.57 <sup>b</sup>
EJ-Ubiq	0.4 $\pm$ 0.63 <sup>ab</sup>	12.33 $\pm$ 3.48 <sup>abce</sup>	18.3 $\pm$ 5.37 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 1.98 <sup>be</sup>
EJ-Excp	0.56 $\pm$ 0.65 <sup>ab</sup>	19.3 $\pm$ 8.11 <sup>bd</sup>	19.13 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>	6.06 $\pm$ 2.52 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

## 7.2 ANÁLISIS DE LA VITALIDAD

El menor porcentaje de espermatozoides vivos se observó en los grupos GC y EJERC con  $35,87 \pm 3,21$  y  $43,97 \pm 4,27$ , respectivamente. El porcentaje de espermatozoides vivos aumentó de forma muy significativa ( $p < 0,05$ ) en todos los grupos de tratamiento, principalmente en el de ubiquinol (Fig 22).

**Figura 22.** Porcentaje de vitalidad observado en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).



<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

## 7.3 ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DEL TESTÍCULO Y MEDICIONES CELULARES

### 7.3.1 Área del epitelio germinativo ( $\mu^2$ ), porcentaje de la luz y porcentaje del epitelio germinativo

El área y el porcentaje de epitelio del grupo ejercicio fue discretamente mayor al GC, pero no de forma significativa. El grupo tratado con trans-resveratrol fue el que menor área de epitelio mostró, hallándose diferencias significativas con los grupos CG y EJERC ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Mediciones obtenidas del área, porcentaje de epitelio y porcentaje de luz de los distintos grupos estudiados. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

LUCES	Área de epitelio	% de epitelio	% de luz
GC	42046,21 $\pm$ 5582,40 <sup>c, e</sup>	79,12 $\pm$ 4,95 <sup>e</sup>	20,87 $\pm$ 4,95 <sup>e</sup>
EJERC	43705,57 $\pm$ 3237,42 <sup>c, e</sup>	80,54 $\pm$ 4,46 <sup>e</sup>	19,45 $\pm$ 4,46 <sup>e</sup>
EJ-Resv	38502,77 $\pm$ 4476,33 <sup>a, b, d</sup>	78,63 $\pm$ 3,78	21,87 $\pm$ 4,12 <sup>e</sup>
EJ-Ubiq	42655,87 $\pm$ 3785,51 <sup>c, e</sup>	80,29 $\pm$ 3,03 <sup>e</sup>	19,70 $\pm$ 3,03 <sup>e</sup>
EJ-Excp	40375,25 $\pm$ 4709,89 <sup>a, b, d</sup>	75,63 $\pm$ 4,24 <sup>a, b, d</sup>	24,43 $\pm$ 4,24 <sup>a, b, c, d</sup>

<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

7.3.2 Área ( $\mu^2$ ), aspecto, área/box ( $\mu^2$ ), diámetro mínimo ( $\mu$ ), circularidad ( $\mu$ ), longitud ( $\mu$ ), anchura ( $\mu$ ) y perímetro2 ( $\mu$ ) de los túbulos seminíferos

Se observó un incremento en los parámetros de área, diámetro mínimo, anchura, longitud y perímetro de los túbulos seminíferos, en el grupo EJERC comparado con el GC, aunque no alcanzó significación estadística. El grupo EJ-Resv presentó una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo EJERC ( $p < 0,05$ ) en los parámetros de área, longitud y anchura (Tabla 5).

7.3.3. Área ( $\mu^2$ ), aspecto y diámetro mínimo ( $\mu$ ) de los núcleos

Tanto el área como el área, el aspecto y el diámetro mínimo de los núcleos de los túbulos seminíferos se vieron incrementados en el grupo EJERC con respecto al GC. Por su parte, se observó una reducción significativa en aspecto y diámetro mínimo en todos los grupos de tratamiento (Tabla 6) (Fig 23).

**Tabla 5.** Mediciones obtenidas del área, aspecto, área/box, diámetro mínimo, circularidad, longitud, anchura y perímetro de los túbulos seminíferos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

Túbulos	Área ( $\mu^2$ )	Aspecto	Área/Box ( $\mu^2$ )	Diámetro mínimo ( $\mu$ )	Circularidad ( $\mu$ )	Longitud ( $\mu$ )	Anchura ( $\mu$ )	Perímetro ( $\mu$ )
<b>GC</b>	42046,2 $\pm$ 5542,80	1,21 $\pm$ 0,50	0,76 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	204,93 $\pm$ 16,05	2,01 $\pm$ 2,91 <sup>b, c</sup>	255,66 $\pm$ 13,87	327,99 $\pm$ 45,61	754,82 $\pm$ 78,20
<b>EJERC</b>	43705,57 $\pm$ 3237,42 <sup>c, e</sup>	1,10 $\pm$ 0,28	0,76 $\pm$ 0,01	209,36 $\pm$ 13,24	1,2 $\pm$ 0,33 <sup>a, c, d, e</sup>	259,06 $\pm$ 11,18 <sub>d</sub>	349,01 $\pm$ 51,97 <sub>c</sub>	796,16 $\pm$ 44,81
<b>EJ-Resv</b>	38502,76 $\pm$ 4476,33 <sup>b, d</sup>	1,18 $\pm$ 0,49	0,77 $\pm$ 0,01	197,60 $\pm$ 16,85 <sub>d</sub>	1,28 $\pm$ 0,04 <sup>a, b, c,</sup> <sub>e, f</sub>	239,32 $\pm$ 15,72 <sub>b</sub>	202,63 $\pm$ 15,13 <sub>b</sub>	788,57 $\pm$ 41,81
<b>EJ-Ubiq</b>	42655,87 $\pm$ 3785,51 <sup>c</sup>	1,15 $\pm$ 0,58 <sub>a</sub>	0,77 $\pm$ 0,01	210,79 $\pm$ 10,17 <sub>c</sub>	1,2 $\pm$ 0,04 <sup>b, d</sup>	249,35 $\pm$ 13,98	344,87 $\pm$ 49,79	799,66 $\pm$ 41,68
<b>EJ-Excp</b>	40375,24 $\pm$ 4709,89 <sup>b</sup>	1,16 $\pm$ 0,32 <sub>a</sub>	0,77 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	205,36 $\pm$ 15,41	1,23 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	233,18 $\pm$ 58,46 <sub>b</sub>	212,53 $\pm$ 13,84	796,17 $\pm$ 57,75

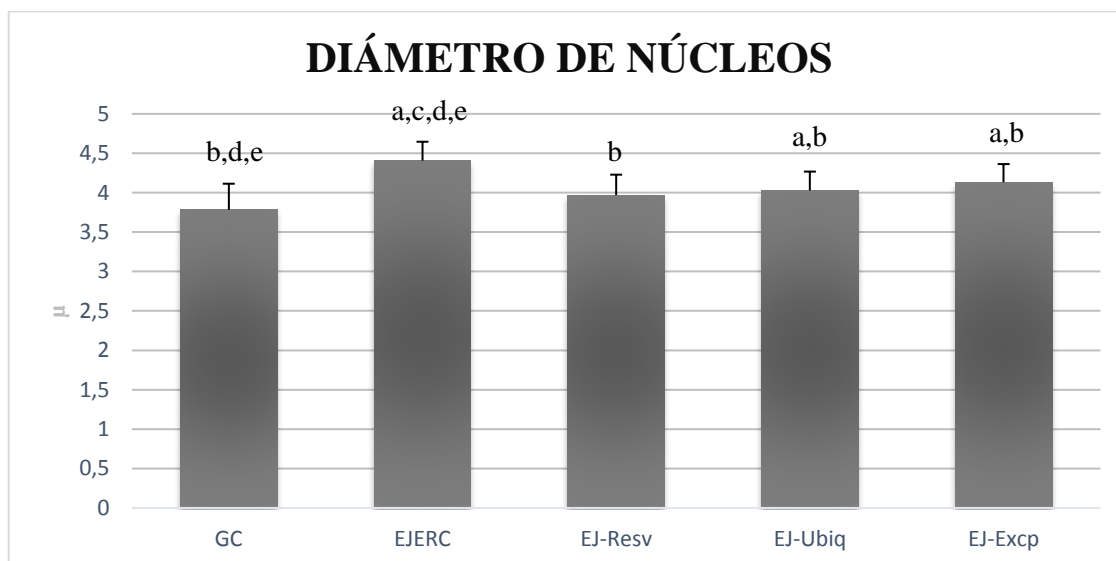
a diferencias significativas con el GC, b diferencias significativas con el grupo EX, c diferencias significativas con grupo EX-Resv, d diferencias significativas con grupo EX-Ubq, e diferencias significativas con grupo EX-Excp.

**Tabla 6.** Mediciones obtenidas del área, aspecto y diámetro mínimo de los núcleos de la pared de los túbulos seminíferos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

NÚCLEOS	Área	Aspecto	Diámetro
GC	27,30 $\pm$ 2,53 <sup>b, c, d, e</sup>	1,69 $\pm$ 0,33 <sup>b, c</sup>	3,78 $\pm$ 0,33 <sup>b, d, e</sup>
EJERC	31,87 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	2,58 $\pm$ 0,54 <sup>a, c, d, e</sup>	4,40 $\pm$ 0,24 <sup>a, c, d, e</sup>
EJ-Resv	33,17 $\pm$ 3,42 <sup>a</sup>	1,77 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	3,96 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>
EJ-Ubiq	30,69 $\pm$ 2,87 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	4,03 $\pm$ 0,24 <sup>a, b</sup>
EJ-Excp	32,49 $\pm$ 2,97 <sup>a</sup>	1,73 $\pm$ 0,08 <sup>a, b</sup>	4,13 $\pm$ 0,23 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>diferencias significativas con el GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con el grupo EX, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EX-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EX-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EX-Excp.

**Figura 23.** Representación gráfica del diámetro obtenido de los núcleos de la pared de los túbulos seminíferos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).



<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.



## 7.4 VALORACIÓN SUBJETIVA DE LA ESPERMATOGÉNESIS

### 7.4.1 Valoración histológica del tejido testicular

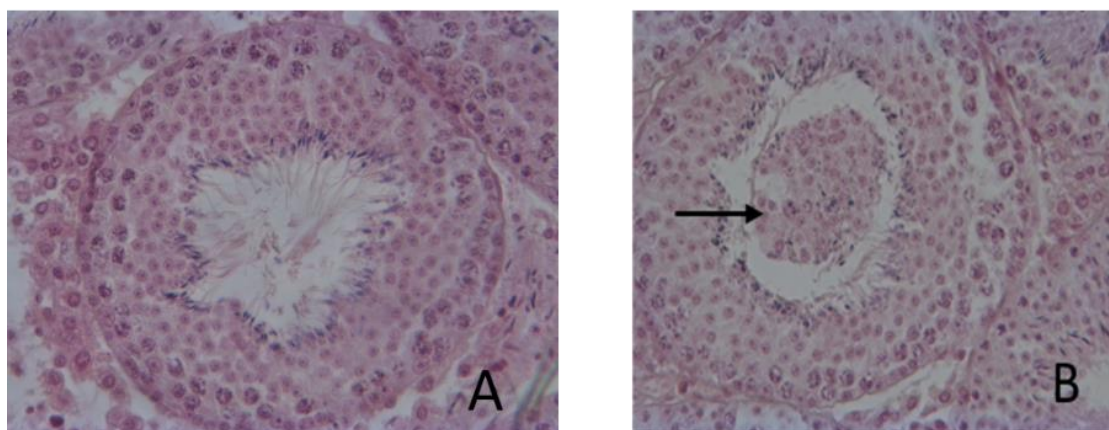
En todos los grupos se observó una histología testicular normal, con presencia de todos los estadios de transformación de espermatogonias a espermátidas en la pared de los túbulos seminíferos. No se encontraron diferencias entre los distintos grupos ni en la presencia de edema entre las células del epitelio germinativo, ni en la distancia del espacio inter-tubular.

En todos los grupos se observaron células epiteliales inmaduras, desprendidas del epitelio germinativo en la luz del túbulo, no existiendo diferencias entre el grupo control y el de ejercicio, pero existiendo una reducción en los grupos de tratamiento, principalmente en el del EJ-Ubiq y el EJ-Resv (Tabla 7) (Fig 24).

**Tabla 7.** Número de ratones con presencia de células en la luz del túbulo seminífero en cada uno de los grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente.

<b>GRUPOS</b>	<b>NÚMERO DE RATONES EN CADA GRUPO CON PRESENCIA DE CÉLULAS INMADURAS EN LUZ</b>
<b>CG</b>	<b>10/15</b>
<b>EJERC</b>	<b>14/15</b>
<b>EJ-Resv</b>	<b>1/15</b>
<b>EJ-Ubiq</b>	<b>5/15</b>
<b>EJ-Excp</b>	<b>7/15</b>

**Figura 24.** Microfotografía que muestra túbulos normales en grupo control (A) y presencia de células del epitelio seminífero (flecha) en la luz del túbulo de ratones del grupo ejercicio (B).



#### 7.4.2. Apoptosis celular en el testículo

El porcentaje de apoptosis valorado de forma subjetiva fue muy bajo en todos los grupos de estudio (Tabla 8).

**Tabla 8.** Porcentaje de apoptosis observada con la tinción de hematoxilina eosina en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente.

GRUPOS	% de apoptosis
CG	6,36%
EJERC	6,56%
EJ-Resv	9,02%
EJ-Ubiq	7,74%
EJ-Excp	9,62%

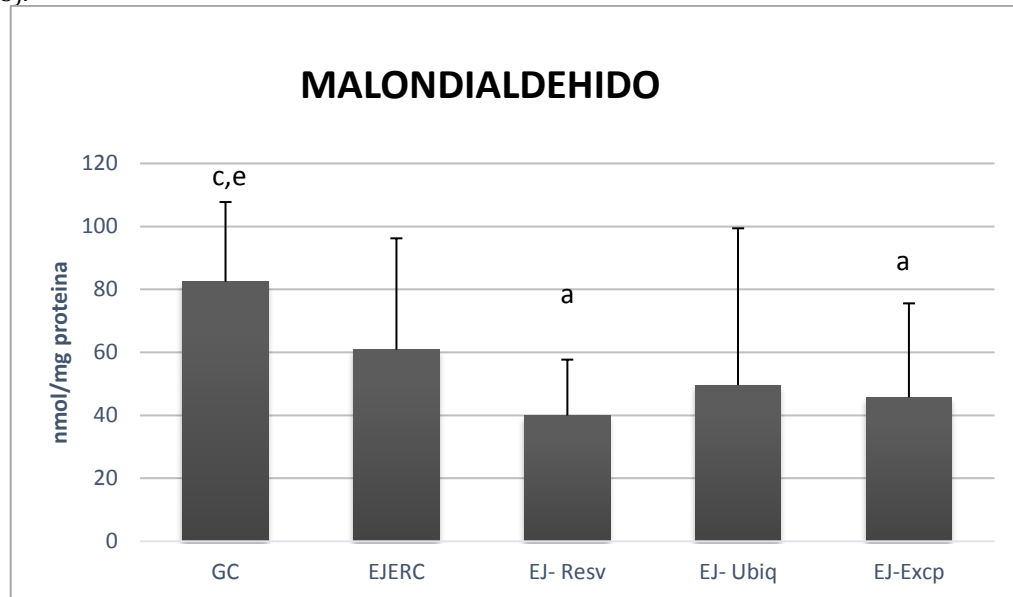
### 7.5 VALORACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

#### 7.5.1 Valoración de la peroxidación lipídica en testículo

La valoración de peroxidación en testículo, determinada mediante valoración de los niveles de malondialdehido (nmol/mg proteína), no demostró diferencia significativa entre el grupo de ejercicio y el grupo control, pero sí una tendencia a valores menores en el GC con respecto al grupo EJERC. Los grupos tratados con

vitamina C y trans-resveratrol presentaron los niveles más reducidos de malondialdehído, siendo la diferencia significativa respecto al grupo control (Fig 25).

**Figura 25.** Representación gráfica de los valores de malondialdehído obtenidos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

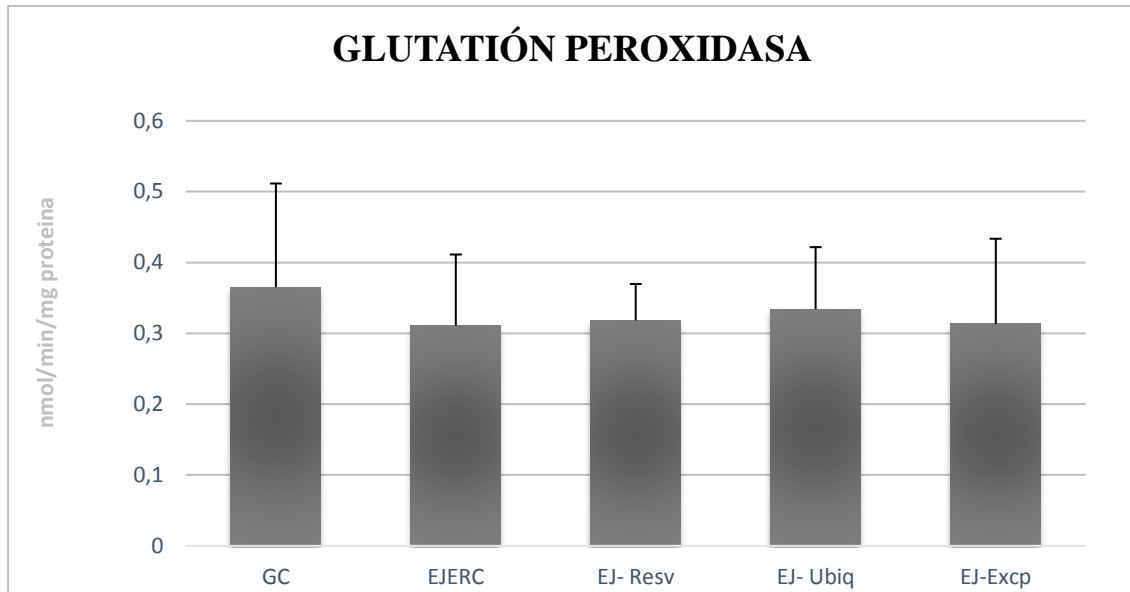


<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

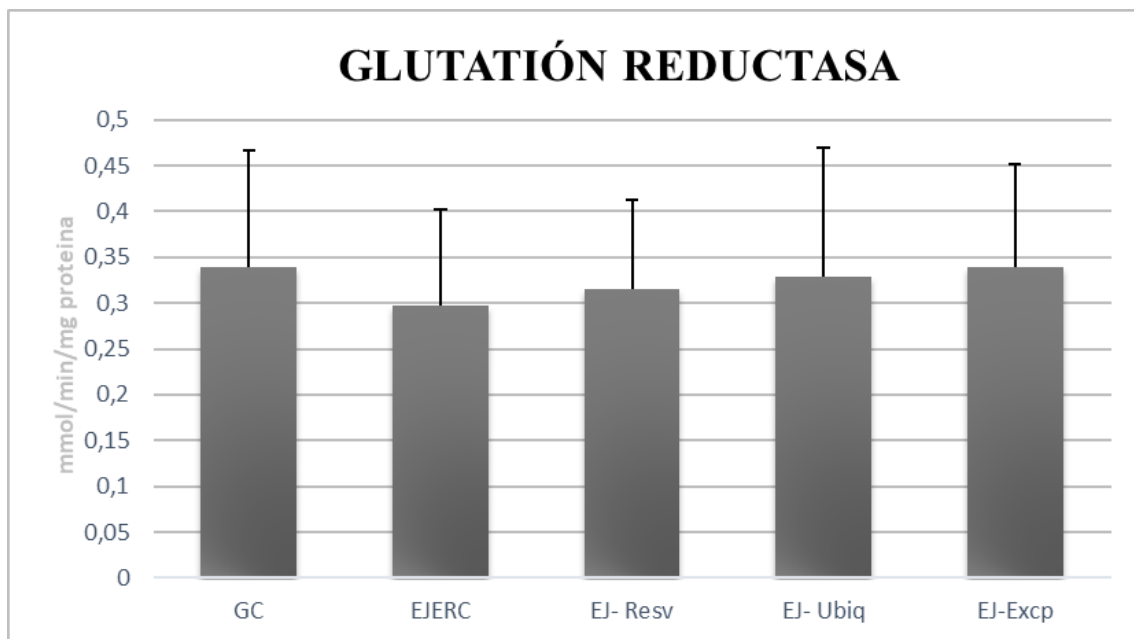
### 7.5.2 Valoración de enzimas antioxidantes

Se valoró la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y superóxido dismutasa (SOD), sin hallar diferencias significativas entre el GC y el grupo EJERC, solo se apreció una tendencia no significativa a niveles menores de actividad en el grupo EJERC de las enzimas GPx, GRd con respecto al GC (Figs 26 y 27). Con respecto a los grupos de tratamiento tampoco se observaron diferencias significativas (Figs 26, 27, 28, 29).

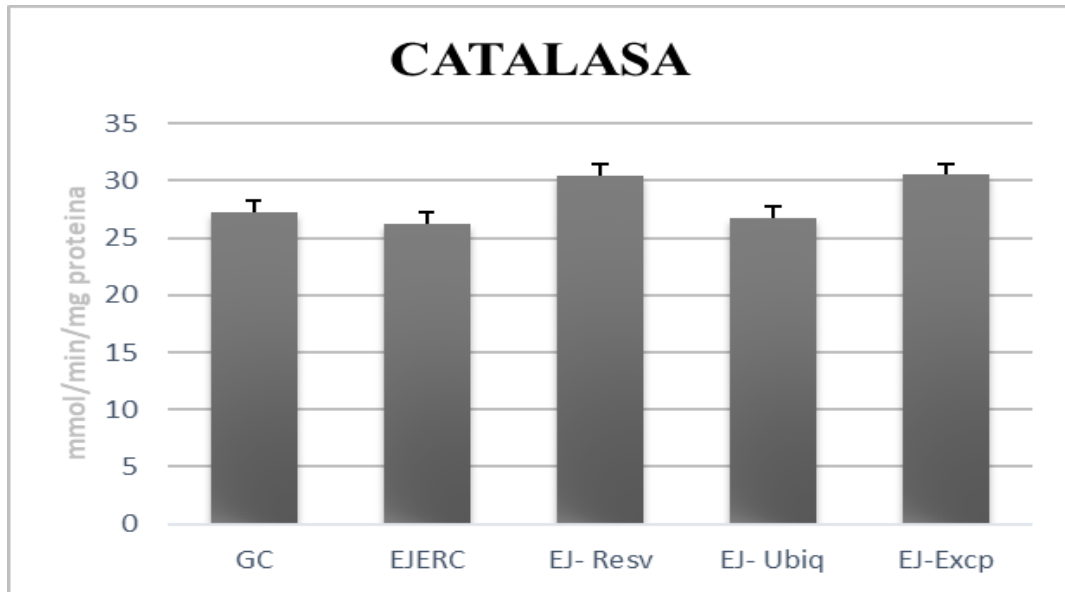
**Figura 26.** Representación gráfica de los valores de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) obtenidos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



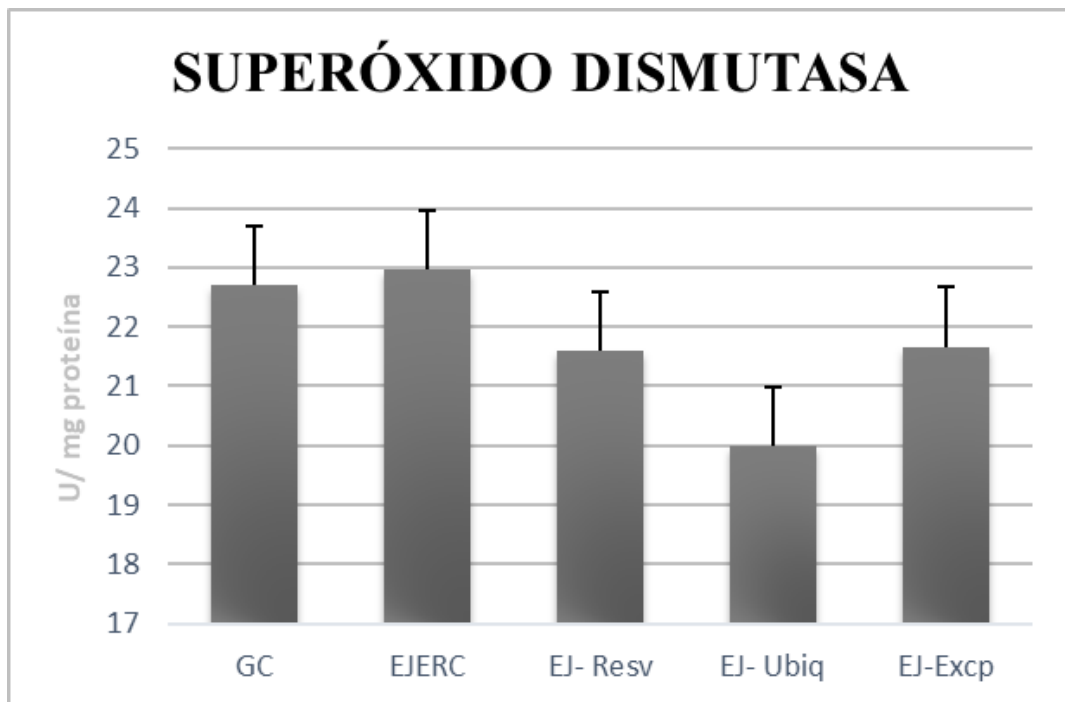
**Figura 27.** Representación gráfica de los valores de la enzima glutatión reductasa (GRd) observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 28.** Representación gráfica de los valores de la enzima catalasa (CAT) en los diferentes grupos. (GC=grupo control; EJERC=grupo ejercicio; EJ-Resv= grupo ejercicio+Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio+Ubiquinol, EJ-Excp= grupo ejercicio+Excipiente). Los valores se expresan como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos



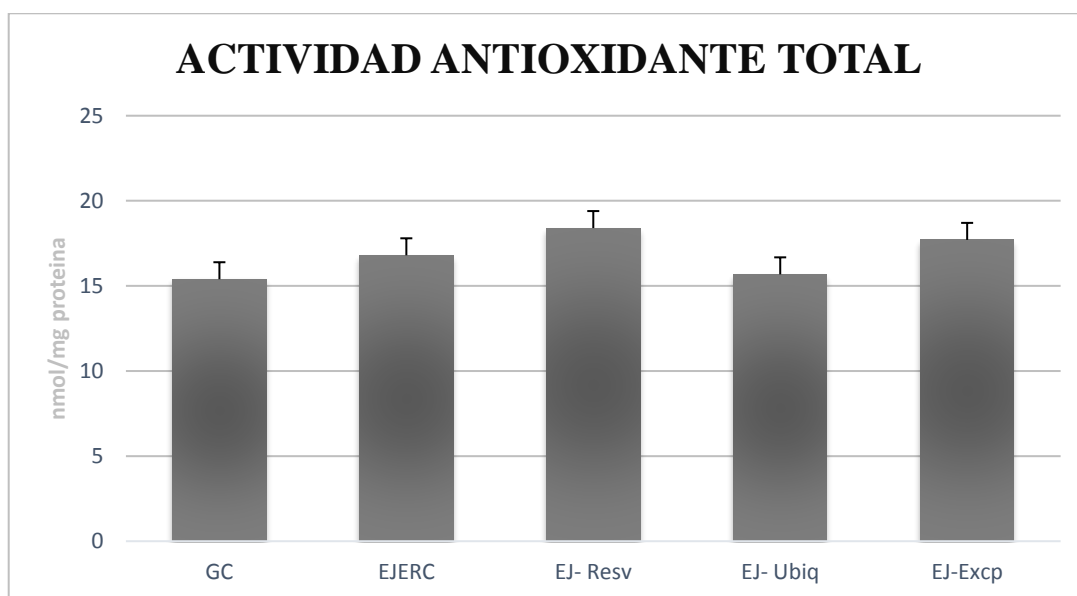
**Figura 29.** Representación gráfica de los valores de la enzima superóxido dismutasa (SOD) observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



### 7.5.3 Valoración de la actividad antioxidante total (TAS)

No se encontraron diferencias significativas entre GC y el grupo EJERC. Solo observamos una ligera tendencia a valores superiores de TAS en el grupo EJERC con respecto al GC. Los grupos de antioxidantes no mostraron tampoco diferencias con el GC ni grupo EJERC. Solamente el grupo tratado con trans-resveratrol mostró una tendencia a una mayor actividad antioxidante total en comparación con el resto de los grupos (Fig 30).

**Figura 30.** Representación gráfica de la actividad antioxidante total (TAS) observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio +Trans-Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media± desviación estándar (p<0,05). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



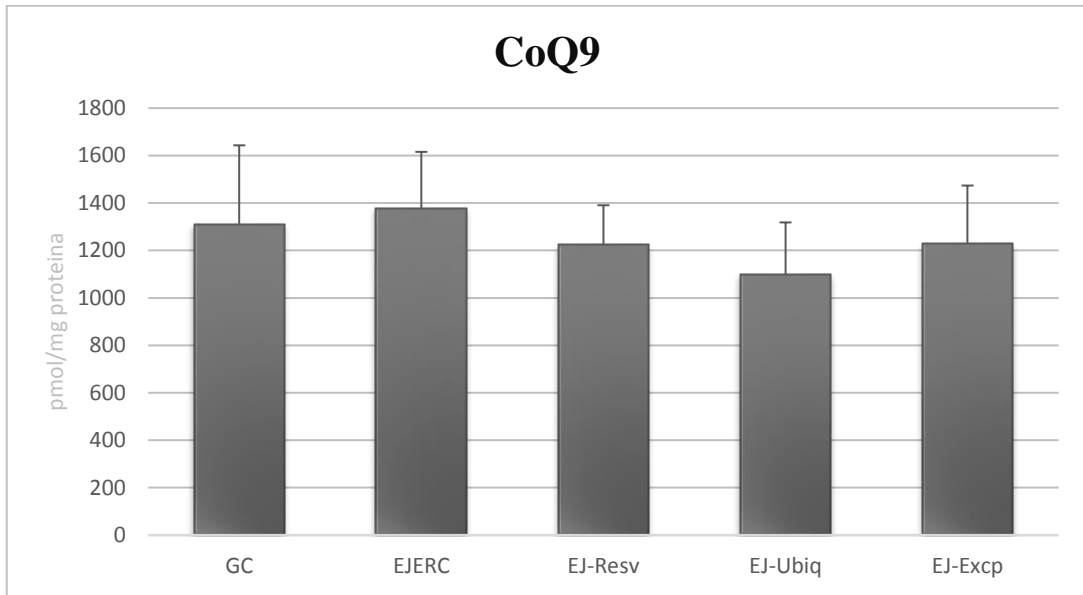
### 7.5.4 Valoración de niveles de Coenzima Q9, Q10 y la ratio Q9/Q10 en testículo

El grupo EJERC mostró una tendencia a valores mayores de ambas formas de CoQ (CoQ9 y CoQ10) con respecto al GC (Figs 31 y 32). El uso de antioxidantes redujo los niveles de Coenzima Q9, incluyendo el excipiente, aunque no lo suficiente para ser significativo (Fig 31). Los niveles CoQ10 fueron significativamente mayores en el grupo EJ-Ubiq que en el resto de los grupos (Fig 32).

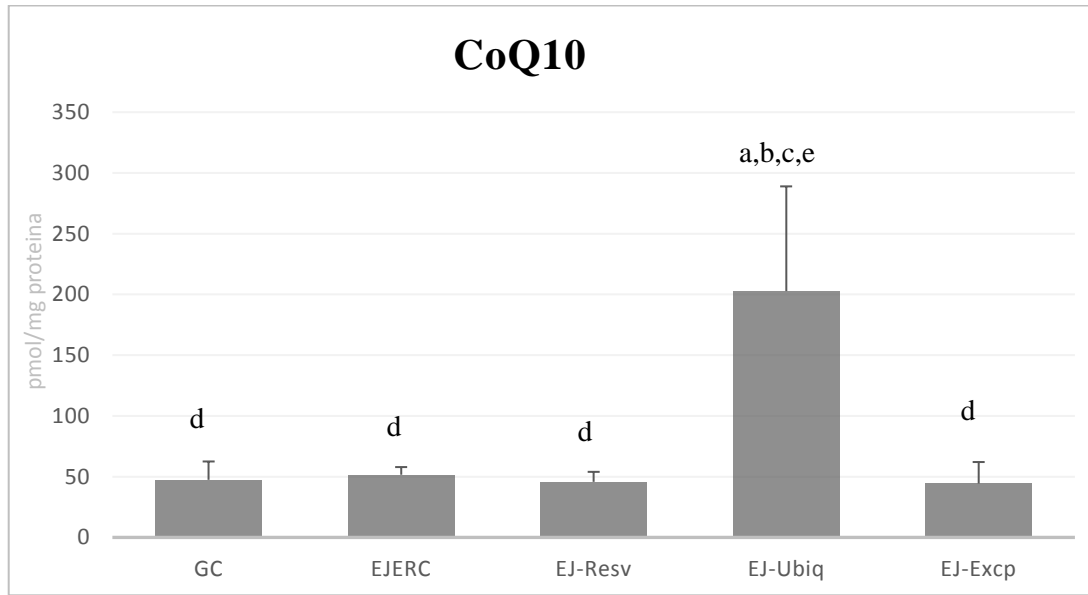
El grupo EJERC mostró una tendencia, aunque no de forma significativa, a valores menores de la ratio CoQ9/Q10 que el GC. En cuanto a los grupos de tratamiento,

sólo el grupo tratado con ubiquinol mostró un descenso en dicho parámetro, seguramente debido a la gran cantidad de Q10 presente en este grupo (Fig 33).

**Figura 31.** Representación gráfica de los niveles de Coenzima Q9 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

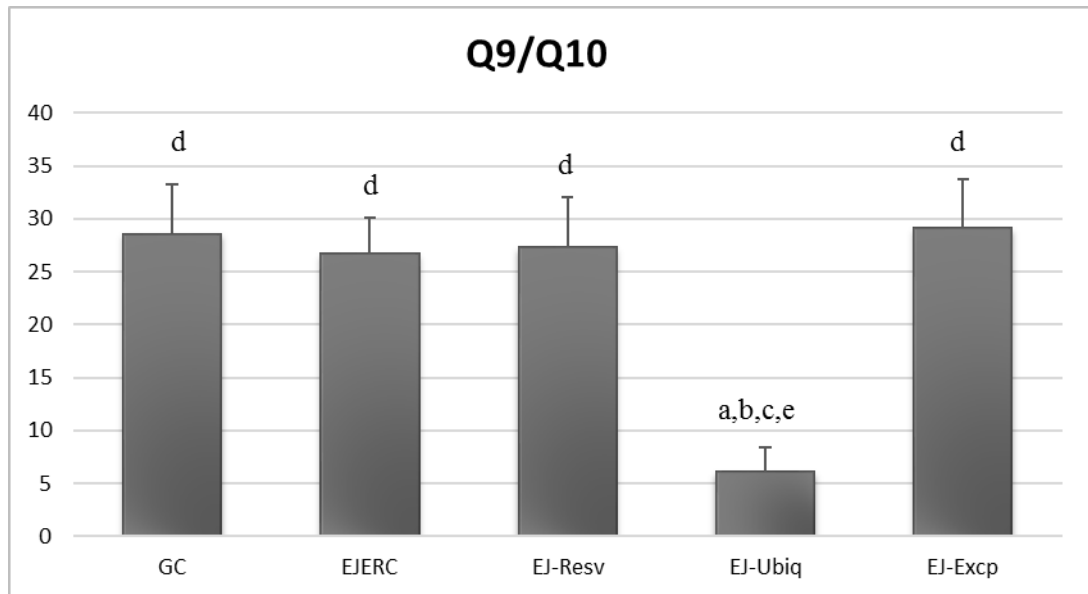


**Figura 32.** Representación gráfica de los niveles de enzima Q10 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media±desviación estándar (p<0,05).



<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.

**Figura 33.** Representación gráfica de la ratio Q9/Q10 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores se expresan como media±desviación estándar (p<0,05).



<sup>a</sup>diferencias significativas con grupo GC, <sup>b</sup>diferencias significativas con grupo EJERC, <sup>c</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Resv, <sup>d</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Ubiq, <sup>e</sup>diferencias significativas con grupo EJ-Excp.





---

***DISCUSIÓN***



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 HALLAZGOS

El modelo de ejercicio empleado no ha producido alteraciones estadísticamente significativas del estado oxidativo a nivel testicular. Lo que sí se ha observado en el grupo sometido a ejercicio es una tendencia a niveles más bajos de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, malondialdehído y de la ratio Coenzima Q<sub>9</sub>/Q<sub>10</sub>, junto con valores más elevados de la actividad antioxidante total; así mismo a nivel espermático, se han observado aumento de las alteraciones de la morfología de los espermatozoides y a nivel histomorfométrico alteraciones de algunos parámetros como el área y el diámetro de los núcleos de las espermatogonias. Los antioxidantes administrados han revertido algunos de estos efectos disminuyendo las alteraciones sobre la morfología y el diámetro de los núcleos, además han mejorado la vitalidad de los espermatozoides. Los resultados obtenidos sobre la morfología e histomorfometría coinciden con los descritos previamente por nuestro grupo de investigación (Rodríguez y cols., 2016).

### 8.2 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El modelo de ejercicio empleado ha provocado un descenso, aunque no de forma significativa de los niveles de las enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd). Por contrapartida, no se han visto alterados los niveles de la enzima superóxido dismutasa (SOD) ni de la enzima catalasa (CAT). Los valores de malondialdehído (MDA) han mostrado una tendencia a ser menores en el grupo de ejercicio (EJERC) respecto al grupo control (GC), con la subsecuente elevación de la actividad antioxidante total (TAS). Este es el primer estudio en el que se miden valores indicadores de estrés oxidativo, empleando un modelo de ejercicio de tres minutos de natación forzada durante cincuenta días. Sin embargo, son múltiples los estudios que han valorado, en modelos animales, como el ejercicio practicado de forma intensa afecta a los marcadores de estrés oxidativo a nivel testicular. Manna y cols., (2003 y 2004 a, b) estudiaron el efecto que tenía un programa de natación forzada

consistente en 1, 2 y 3 horas diarias, 5 días a la semana, durante 4 semanas, observando un descenso de los niveles de enzimas SOD, CAT, GPx y GST, así como, un incremento del marcador de peroxidación lipídica (MDA); Samanta y cols., (2006), empleando ese mismo modelo, pero incrementando la duración a 6 semanas, obtenían resultados similares en marcadores de estrés oxidativo testicular. Estudios posteriores corroboraban el hecho de que el ejercicio a ese nivel de intensidad provocaba un descenso significativo en las enzimas antioxidantes del testículo e incrementaba el grado de peroxidación lipídica (Jana y cols., 2008, 2014). Pese a la homogeneidad de los resultados publicados, Kalantari y cols., en 2017, con un modelo parecido a los descritos anteriormente, de 3 horas diarias, 6 días a la semana, durante 4 semanas no obtuvieron diferencias en los niveles de malondialdehído testicular entre el grupo reposo y el de ejercicio, no siendo medidos los niveles de enzimas antioxidante en dicho estudio. En otro tipo de modelos, como los prolongados (un año de duración, ejercicio cinco días a la semana durante una hora cada día), se ha observado un efecto beneficioso del ejercicio al verse reducido el estrés oxidativo producido por el envejecimiento en diversos tejidos como corazón, hígado, riñón y músculo estriado. Así, mientras que no había cambios significativos en los niveles de peroxidación lipídica entre el grupo ejercicio y control, los niveles de enzimas antioxidantes mejoraron en el grupo ejercicio con una respuesta dependiente del tejido (Gündüz y cols., 2003). El hecho de que exista diversidad de resultados en modelos de intensidad similar podría deberse a la diferente duración del ejercicio y al momento en el que los marcadores oxidativos fueron medidos. No obstante, cabe destacar que el tejido testicular, no valorado por Gündüz, debido a sus características, es mucho más sensible que otros tejidos al daño oxidativo. Por otra parte, según nuestro conocimiento, no se ha evaluado previamente el efecto de modelos de ejercicio más habitualmente realizados por la población, como son modelos de intensidad moderada, sobre los niveles de enzimas antioxidantes del testículo. Así hemos visto que, pese a que no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de enzimas entre el GC y el grupo EJERC, sí se ha observado una tendencia a valores menores, en el grupo EJERC, de dos de las enzimas principalmente involucradas en el control del estrés oxidativo, como son la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd), no ocurriendo lo mismo ni con la catalasa (CAT) ni con la superóxido dismutasa (SOD). El sistema

glutación peroxidasa/glutación reductasa se encuentra formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd). Así la glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o lipoperóxido (L-OOH) y la-glutación reductasa (GRd) cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y de lipoperóxidos (L-OOH). De otro lado, la enzima SOD y CAT forman parte de otro sistema antioxidante (SOD/CAT). De esta manera la enzima catalasa, al igual que la glutatión peroxidasa, también se encarga de eliminar el  $H_2O_2$ , teniendo similar localización celular pero diferente mecanismo de regulación. Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT presenta menor afinidad por el  $H_2O_2$  actuando en presencia de altas concentraciones de  $H_2O_2$  y la GPx lo hace a concentraciones bajas, así la GPx es capaz de eliminar pequeñas cantidades de  $H_2O_2$ , lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. El hecho de que sólo los niveles de GPx y GRd se encuentren disminuidos en el modelo de ejercicio planteado en el estudio podría deberse a que ha provocado pequeños incrementos en las cantidades de peróxido de hidrogeno, los cuales han estimulado la actividad catalítica de la GPx y GRd, pero no han llegado a producir cambios en otros sistemas enzimáticos (SOD/CAT). Resultados similares se han observado en estudios previos, pero en modelos de reposo, describiendo, un descenso parcial de sólo parte de los sistemas enzimáticos involucrados en tejido testicular como resultado a la exposición a corto plazo de varios químicos o agentes tóxicos (Abarikwu y cols., 2010).

Tanto el ubiquinol como el trans-resveratrol han reducido, aunque, sólo parcialmente, el descenso en los niveles de estas enzimas (GPx y GRd), posiblemente debido a su efecto antioxidante. Este es el primer estudio en el que se valora el efecto sobre testículo del ubiquinol en un modelo de ejercicio. Aunque si ha sido valorado previamente en otros modelos oxidativos inducidos por la administración de cadmio (Ognjanovic y cols., 2010), observando que tanto el ubiquinol como la combinación de ubiquinol+vitamina E administrados intramuscularmente, revertían los efectos nocivos provocados por el cadmio, incrementando la defensa antioxidante y disminuyendo la peroxidación lipídica. En el presente estudio, aunque también se observó un incremento en la actividad antioxidante, los resultados no han sido significativos, posiblemente debido entre otros factores, a que se trate de modelos

experimentales diferentes y a que los antioxidantes se han administrado por vía oral. El efecto protector del trans-resveratrol sobre el tejido testicular se ha estudiado, tanto en modelos de estrés oxidativo inducido por el ejercicio intenso (60 minutos diarios durante nueve semanas con un peso colgado de la cola de un 6% ) (Guo y cols., 2019) como sobre otros modelos oxidantes inducidos por administración de metotrexato (Yuluğ y cols., 2013), y en todos ellos ha inducido una mejora, aunque solo parcialmente, en el estado antioxidante testicular al incrementar los niveles de la enzima SOD sin afectar a las otras enzimas estudiadas, como la catalasa.

El malondialdehído, producto procedente de la degradación de lípidos, se emplea normalmente como indicador de peroxidación lipídica. La peroxidación es un proceso que consta de dos fases, iniciación y propagación. La iniciación se produce por la acción de especies reactivas de oxígeno sobre los ácidos grasos de la membrana celular, los principales iniciadores son los radicales hidroxilos (OH<sup>-</sup>) y los hidroperoxilos (HOO<sup>-</sup>). A diferencia de lo que esperábamos encontrar en nuestro estudio, Hemos observado que el grupo EJERC presentó valores más bajos de malondialdehído y una mayor actividad antioxidante total, aunque no de forma significativa, con respecto al GC. Dichos resultados coinciden con los observados en otros modelos de ejercicio (Kalantari y cols., 2017), pero están en contraposición con modelos de natación más intensos (Manna y cols., 2003, 2004 a, b; Jana y cols., 2008; Guo y cols., 2019). Este hecho podría justificarse con la idea de que, ese pequeño descenso de los niveles de GPx y GRd y mayor TAS, aunque no significativos, en el grupo EJERC, podría ser reflejo de un proceso de adaptación positivo frente al estímulo que supone el ejercicio de natación forzada. Así está descrito que los sistemas biológicos responden frente a diversos agentes tales como: químicos, toxinas, radiación y ejercicio físico con un fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas que resulta en una curva en forma de U invertida, así el estímulo a dosis bajas produce un efecto contrario al que tiene en dosis más elevadas (Radak y cols., 2005). Si aplicamos este concepto a un modelo de ejercicio, un ejercicio moderado generará pequeñas cantidades de ERO que incitarán al organismo a reaccionar y provocar una respuesta adaptativa frente a ese estímulo, pero cuando es excesivo, se producirá justo el efecto contrario, el organismo no será capaz de adaptarse a los grandes incrementos de ERO, provocándose un daño en el tejido.

En cuanto a la suplementación con antioxidantes, se ha observado que los grupos EJ-Resv y EJ-Excp presentaban, de forma significativa, los niveles de malondialdehído más bajos, pudiendo deberse este hecho a la potente actividad antioxidante del trans-resveratrol y la vitamina C presente en el excipiente. El efecto protector del resveratrol frente a la peroxidación lipídica ha sido estudiado anteriormente en modelos de ejercicio donde se ha demostrado que la administración de 50mg/Kg de resveratrol reducía los niveles de MDA incrementados como consecuencia de ejercicio intenso (Guo y cols., 2019).

### 8.3 PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

Con respecto a los parámetros medidos en los espermatozoides, el modelo de ejercicio planteado ha producido una alteración de la morfología espermática, pero no de la vitalidad. Así el grupo de ejercicio presentó un porcentaje estadísticamente mayor de espermatozoides anormales ( $53,03 \pm 4,83$ ) que el grupo control ( $46,47 \pm 10,57$ ), siendo las anomalías de la pieza intermedia las observadas principalmente ( $25,2 \pm 5,73$ ). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en nuestro estudio anterior, en el cual se empleaba el mismo modelo de ejercicio (Rodríguez y cols., 2016). Otros autores con modelos de ejercicio similares, aunque no valoraron la morfología, encontraron alteraciones en parámetros como motilidad, número de espermatozoides y capacidad de fecundación (Mingoti, y cols., 2003, Saki y cols., 2009, 2010). Modelos de natación forzada, de mayor intensidad y con 8 semanas de duración (Minaii y cols., 2014; Jana y cols., 2014), obtuvieron resultados similares a los nuestros, observando un incremento en el porcentaje de espermatozoides con formas anormales en el grupo que realizaba ejercicio. El mecanismo fisiopatológico por el cual el ejercicio puede causar alteraciones de la morfología puede ser diverso. Por un lado, se ha demostrado que el ejercicio puede causar una alteración del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal debido al estrés fisiológico, disminuyendo los niveles de testosterona, la cual es necesaria para el correcto desarrollo de la espermatogénesis (Manna y cols., 2003, 2004 a, b; Jana y cols., 2008), y por otro, el ejercicio puede producir un incremento de los niveles de ERO a nivel testicular (Mana y cols., 2003, 2004; Nirupama y cols., 2013). Estas ERO producidas, pueden actuar directamente sobre las células del epitelio germinativo del túbulo seminífero y, por tanto, afectar la

espermatogénesis lo que provocaría un incremento en el número de espermatozoides con formas anormales (Aziz y cols., 2004); además podrían afectar a las células de Leydig alterando la esteroidogénesis (Kaur y Bansal, 2004; Glade y Smith, 2015) y provocando disminución en los niveles de testosterona lo cual afectaría también por tanto la espermatogénesis. Aunque no se han determinado los niveles de testosterona en este estudio, no se puede descartar esta posibilidad. Sí se han medido enzimas antioxidantes encargadas de eliminar los ERO, observando una disminución en dos de ellas (glutación peroxidasa, glutación reductasa), aunque de forma no significativa. Esta tendencia al descenso de estas enzimas podría indicarnos que el modelo de ejercicio empleado ha producido un ligero incremento de los radicales de peróxido de hidrógeno y, por tanto, una ligera alteración de homeostasis oxidativa.

Todos los antioxidantes empleados, han revertido los efectos nocivos, que el ejercicio ha producido sobre la morfología de los espermatozoides epididimarios, siendo el ubiquinol el que mejores resultados ha presentado. Además, pese a que la vitalidad no se ha visto alterada por el ejercicio, todos los antioxidantes, incluido el excipiente han mejorado la vitalidad incluso con respecto al grupo control.

El trans-resveratrol es un conocido y potente antioxidante y en este estudio se ha demostrado que con una dosis mitad a la empleada previamente (100mg/Kg Vs 200mg/Kg), se obtienen resultados similares a los anteriores, con este modelo de ejercicio (Rodríguez y cols., 2016). Además de nuestro estudio, sólo hemos encontrado un autor que haya valorado el efecto protector del resveratrol frente a modelos de ejercicio, aunque empleando un modelo de nivel de intensidad más alto (60 minutos durante nueve semanas) (Guo y cols., 2019), observando que protege frente a la disminución en la concentración de espermatozoides inducida por el ejercicio. En modelos en reposo, son varios los estudios que valoran su efecto protector en diferentes modelos de estrés oxidativo, sobre parámetros espermáticos como concentración y motilidad espermática (Juan y cols., 2005; Shin y cols., 2008) y sobre la morfología (Özyilmaz Yay y cols., 2019; Mendes y cols., 2016). En el presente estudio, el hecho de que el trans-resveratrol sólo haya disminuido los efectos deletéreos producidos sobre las enzimas antioxidantes, pero no de forma significativa, nos hace pensar que tanto los mecanismos antioxidantes, fitoestrogénico, como activador de



sirtuinas podrían estar involucrados de forma simultánea en la mejoría que observamos sobre el espermatozoide.

El ubiquinol es el antioxidante que mejor protege contra el daño producido en la morfología espermática y el que más redujo las anomalías de la pieza intermedia. El ubiquinol es un antioxidante presente en células espermáticas y fluidos seminales, posee un importante papel protector sobre la fertilidad, como se ha demostrado en individuos con problemas de fertilidad en los que se una correlación entre niveles de ubiquinol y volumen de eyaculado y motilidad (Mancini y Balercia, 2011). Según lo revisado en literatura disponible, este es el primer estudio que valora la suplementación con ubiquinol sobre la función testicular en animales sometidos a ejercicio. Su efectividad sí ha sido valorada en pacientes subfértiles encontrándose resultados diversos. En este sentido, algunos autores han encontrado una mejora de la morfología tras la administración de este compuesto (Cakiroglu y cols., 2014; Safarinejad y cols., 2012), mientras que otros estudios reflejaban una mejoría en la motilidad y densidad, pero no en la morfología (Safarinejad y cols., 2009). Esta variación en los resultados podría deberse a la falta de homogenización en cuanto a dosis y protocolos y a las diferentes formas de coenzima Q cuya absorción ha sido previamente comprobada y contrastada. En nuestro caso se ha empleado una forma comercial de ubiquinol, previamente comprobada y contrastada su absorción (Ikematsu y cols., 2006; Ozaki y cols., 2010). Este estudio también refleja la efectividad del compuesto pues se ha observado un incremento en los niveles de coenzima Q10 en el grupo tratado con ubiquinol.

El mecanismo por el cual el ubiquinol protege de los daños deletéreos que el ejercicio produce sobre la morfología y mejora la vitalidad podría deberse al incremento de los niveles de CoQ como resultado de la suplementación, que puede actuar directamente como antioxidante, o preservar cambios en los niveles de testosterona (Banihani, 2018). Pese a que los niveles de testosterona no se han determinado en el presente estudio, no se puede descartar esta posibilidad.

El excipiente empleado también produjo una disminución significativa del número de formas anormales, mostrando resultados muy similares a los producidos por el trans-resveratrol, pero significativamente menores a los observados en el grupo

suplementado con ubiquinol. Esta mejora podría deberse a la presencia de vitamina C en el excipiente y a su conocida capacidad antioxidante (Samanta y cols., 2006). La vitamina C mejora parámetros seminales incluso la morfología en pacientes subfértiles (Akmal y cols., 2006). En ratones sanos sometidos a natación forzada también se ha visto que la suplementación oral con vitamina C mejora, entre otros, la morfología espermática, mejora que se acompaña de un incremento en los niveles de testosterona, pudiendo ser este incremento hormonal la causa de la mejora de los parámetros seminales (Sanguishetti y cols., 2014; Okon y Utuk, 2016).

En el presente estudio la vitalidad no ha resultado afectada, como se evidencia al comparar los datos del GC y el grupo EJERC. Mientras que el modelo de ejercicio aquí planteado no afecta a la vitalidad, otros modelos de natación forzada más intensos han evidenciado una disminución de la vitalidad en el grupo ejercicio (Minaii y cols., 2014; Moyaeri y cols., 2017). Esta vitalidad disminuida se ha asociado a un incremento de ERO, las cuales se han visto que dañan las membranas celulares, alterando su función y permeabilidad, llevando a la célula a la muerte. La afectación de la morfología en este estudio, sin alteración de la vitalidad podría explicarse por el modelo de ejercicio, que parece haber inducido un cierto nivel de estrés oxidativo en el testículo, alterando así la espermatogénesis y, por ende, la morfología, pero insuficiente como para inducir un estrés oxidativo a nivel del epidídimo, compartimento independiente del testículo donde se producen los principales cambios en su membrana plasmática a través de remodelación, adquisición y cambio de proteínas de la superficie espermática (Vernet y cols., 2004).

Pese a la ausencia de cambios en la vitalidad, se ha observado que tanto la suplementación con ubiquinol, como con trans-resveratrol y el excipiente, ha mejorado la vitalidad; mientras que no se observaron diferencias entre la acción del ubiquinol y la del trans-resveratrol, si se hallaron diferencias entre el ubiquinol y el excipiente, quizás porque la combinación de estos dos potencia el efecto. Este es el primer estudio que valora el efecto de la suplementación con ubiquinol y con trans-resveratrol, sobre la vitalidad de los espermatozoides en modelos de ejercicio. La vitamina C sí se ha empleado previamente, en modelos de natación, empleando diferentes dosis, sin observarse efecto alguno sobre la vitalidad (Sanghisetti y cols., 2014), aunque otros antioxidantes, como la melatonina, sí han demostrado tener un efecto protector sobre

la vitalidad en modelos de ejercicio (Minaii y cols., 2014; Moyaeri y cols., 2017). El mecanismo por el cual los antioxidantes mejoran la vitalidad podría radicar en que inhiben o disminuyen la peroxidación lipídica de las membranas celulares y, por tanto, evitan que estas se alteren. Tanto el ubiquinol como el trans-resveratrol inhiben la peroxidación de lípidos (Turunen y cols., 2004; Alarcón de Lastra y Villegas, 2007).

#### 8.4 ESPERMATOGÉNESIS

La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero, en él se lleva a cabo la espermatogénesis. El ciclo de la espermatogénesis incluye una fase de meiosis y otra de espermiogénesis, las cuales tienen una duración en los ratones de entre 48-52 días. En este estudio se ha elegido un periodo de 50 días para así poder estudiar un ciclo completo. La espermatogénesis es un proceso de transformación y maduración celular muy sensible a agentes externos tales como factores medioambientales, agentes tóxicos, deficiencias alimentarias, enfermedades sistémicas y radiaciones ionizantes, entre otros. También se ha estudiado el efecto que el ejercicio produce sobre ella; así autores como Manna y cols., (2003, 2004 a, b) y Jana y cols., (2008, 2014), han observado como un modelo de natación forzada en ratones, a diferentes niveles de intensidad afecta negativamente a la espermatogénesis alterando el número de espermátocitos y espermátidas del epitelio, así como la arquitectura del túbulo seminífero, encontrándose células desprendidas del epitelio.

En cuanto a la valoración subjetiva de la histología de los túbulos, no se han encontrado diferencias significativas en la arquitectura de la pared, grado de edema, ni en el grado de apoptosis entre el grupo control y el grupo de ejercicio. Sí se ha observado que el grupo EJERC es el que mayor número de animales con células inmaduras en la luz tubular presentó. La presencia de células inmaduras en el epitelio germinativo en diferentes estadios en la luz revela que existe un daño en la espermatogénesis. La presencia de diferentes tipos de células germinales en la luz como consecuencia del ejercicio impuesto fue previamente descrita por Manna y cols., 2003, 2004 a, b, Samantha y cols., 2006, Jana y cols., 2008. Una de las causas de esta muerte y depleción celular, podría ser un descenso en los niveles de testosterona intratesticular, dado que se necesitan niveles adecuados de testosterona para mantener tanto una correcta espermatogénesis como para que se adquiriera una

estructura morfológica normal (Sharpe y cols., 1992; Jana y cols., 2010). Además, se requiere testosterona para mantener unidas las diferentes generaciones de células germinales en los túbulos seminíferos, por lo cual bajas concentraciones de testosterona provocarían una separación de células del epitelio pudiendo iniciar la muerte de las células germinales (Blanco- Redríguez y Martínez García, 1998). Otra de las causas de esta depleción podría ser el daño oxidativo de las células descrito previamente (Yuluğ y cols., 2013). Los mecanismos por los cuales el ejercicio pudiera provocar un descenso de la testosterona y/o provocar estrés oxidativo se han descrito previamente. En todos los grupos de tratamiento con suplementación de antioxidante se redujo el número de animales con presencia de células dentro de la luz, principalmente en el grupo tratado con trans-resveratrol, seguido por el tratado con ubiquinol. Aunque empleando otros compuestos, se ha estudiado previamente el efecto de la suplementación con antioxidantes en la preservación y mantenimiento de la espermatogénesis en modelos de natación forzada (Jana y cols., 2014; Mana y cols., 2004 b). Sí se ha valorado el trans-resveratrol en modelos de reposo en los que se han observado diferentes resultados; por una parte, se ha visto que, a dosis de 20mg/Kg administrado de forma intraperitoneal, actúa como antioxidante protegiendo contra la depleción de células en la luz del túbulo seminífero provocadas como consecuencia de agentes oxidantes (Yuluğ y cols., 2013); por otra, usando diferentes dosis de trans-resveratrol administradas también intraperitonealmente se ha visto que, a dosis de 8mg/Kg y 20 mg/Kg, actúa como prooxidante incrementando el número de células en la luz del túbulo siendo proporcional esta respuesta a la dosis administrada (Ranawat y cols., 2014). En el presente estudio parece que la dosis y vía de administración empleada, la vía oral, han sido adecuadas, ejerciendo un efecto antioxidante y protegiendo a las células del epitelio germinativo del daño oxidativo y, por tanto, la espermatogénesis, pudiendo ser este último efecto debido a su efecto sobre la activación de las sirtuinas y al efecto que estas tienen sobre la activación de la GnRH y por tanto del eje hipotálamo gonadal (Cakir y cols., 2009). Tras el estudio y análisis de las publicaciones encontradas, creemos que es la primera vez que se valora este efecto con el ubiquinol y la vitamina C.

En cuanto al análisis histomorfométrico, se observó una tendencia a un incremento en el área, longitud, anchura y perímetro del túbulo seminífero, así como

también en área y porcentaje de epitelio seminífero del grupo ejercicio con respecto al grupo control. Como vimos anteriormente, el grupo ejercicio fue también el que mayor número de animales con células germinales en la luz presentó. Este incremento observado en los parámetros determinados sobre los túbulos podría deberse a que el espacio entre las células germinales es mayor, al estar produciéndose una separación entre las células del epitelio germinativo como consecuencia de la alteración que el ejercicio impuesto provoca sobre la espermatogénesis. Con respecto a los grupos de tratamiento, el grupo tratado con trans-resveratrol fue el que presentó valores más bajos para dichos parámetros, siendo la diferencia estadísticamente significativa no sólo para el grupo de ejercicio sino también para el grupo control. Como se ha comentado anteriormente, el grupo EJ-Resv fue además el que presentó de forma muy significativa el menor porcentaje de animales con células germinales en la luz del túbulo, posiblemente, como vimos anteriormente, por su efecto sobre las sirtuinas, principalmente la sirtuina-1 al estimular el eje hipotálamo gonadal y mejorar la espermatogénesis (Rato y cols., 2016)

En cuanto a los núcleos del epitelio seminífero, se ha visto que el grupo EJERC presentaba de forma significativa valores más elevados de área, aspecto y diámetro que el GC, datos que concuerdan con lo descrito en nuestro previo estudio (datos no publicados). El incremento de estos valores podría estar relacionado con la primera fase de muerte celular o apoptosis, caracterizada por entrada de agua debido a la pérdida de permeabilidad de la membrana. En las células germinales, la apoptosis se asocia con el incremento de ERO y disminución en la actividad de la enzima glutatión reducido (GSH) (Jana y cols., 2010); existen otros factores que la pueden afectar, como son la falta de hormonas (gonadotropinas o andrógenos) y el aumento de la temperatura del testículo. También se ha observado que el incremento de la apoptosis de las células germinales puede preceder a una depleción de células germinales en la luz (Blanco- Redríguez y Martínez-García, 1998).

En cuanto a los grupos con suplementación de antioxidantes se observó que el diámetro de los núcleos disminuyó en todos los casos, incluido en el grupo EJ-Excp, siendo el trans-resveratrol el que mejor protegió frente a este efecto, al presentar diámetros del núcleo similares al grupo control.

La protección del trans-resveratrol frente a fenómenos de apoptosis ha sido descrita previamente en modelos sobre la apoptosis inducida por paclitaxel en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Nicolini y cols., 2001), en daños isquémicos y tóxicos en células PC12 (Agarwall y cols., 2011; Siddiqui y cols., 2010) y daños neurotóxicos del  $\beta$ -amiloide (Savaskan y cols., 2003); en modelos reproductivos también ha sido estudiada en daño testicular inducido por cadmio (Eleawa y cols., 2014) y doxorubicina (Türedi y cols., 2015) y en modelos de ratas con varicocele inducido (Hajipour y cols., 2018).

En cuanto al ubiquinol se ha demostrado su efecto de inhibición de la apoptosis en hepatocitos tras un estrés metabólico (Vasiliev y cols., 2011), pero dicho efecto no ha sido estudiado en modelos reproductivos, siendo este el primer estudio que lo hace.

Consideramos que el modelo de ejercicio seleccionado de natación forzada de 3 minutos diarios durante 50 días, en ratones macho CD-1, pudiera estar afectando a la fertilidad, al producir alteraciones significativas sobre la morfología de los espermatozoides epididimarios, incrementando el diámetro de los núcleos de las espermatogonias de los túbulos seminíferos y reduciendo parcialmente la capacidad antioxidante del testículo, al disminuir el nivel de las enzimas GPx y GRd. Por otro lado, observamos que, el empleo de antioxidantes como el ubiquinol, el trans-resveratrol o la vitamina C, usados diariamente como suplemento en la dieta, no presentan efectos nocivos sobre la salud y podrían ayudar a mejorar la fertilidad, incrementando el número de formas normales de espermatozoides, los porcentajes de vitalidad espermática, incrementando parcialmente la capacidad antioxidante del testículo y mejorando la espermatogénesis. De los antioxidantes empleados el que mejor parece proteger la morfología de los espermatozoides es el compuesto formado por ubiquinol más excipiente (Vitamina C), y el que menor número de células inmaduras presenta en la luz del tubo seminífero y, por tanto, mejor pudiera proteger la espermatogénesis es el trans-resveratrol.







---

## **CONNCLUSIONES**





## 9. CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>.- El modelo de ejercicio de 3 minutos de natación forzada diaria durante 50 días en ratones CD-1, provoca alteraciones similares a las observadas en nuestro estudio anterior, incrementando el porcentaje de morfoanomalías de los espermatozoides epididimarios y el diámetro del núcleo de las espermatogonias de la pared de los túbulos seminíferos, sin alteración de la vitalidad de los espermatozoides.

2<sup>a</sup>.- El modelo de ejercicio planteado produce un descenso, no significativo, de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, malondialdehído y de la ratio CoQ<sub>9</sub>/Q<sub>10</sub>, junto con un incremento de la actividad antioxidante total.

3<sup>a</sup>.- La administración de los antioxidantes ubiquinol y trans-resveratrol de forma diaria como suplemento en la dieta, protege frente a los efectos nocivos que el ejercicio planteado produce sobre la morfología espermática, disminuyendo el número de anomalías, a la vez que incrementa la vitalidad de los espermatozoides; reduce el diámetro de los núcleos de las espermatogonias y el número de células inmaduras en la luz del túbulo.

4<sup>a</sup>.- El ubiquinol es el antioxidante que mejor protege frente a los daños en la morfología de los espermatozoides epididimarios y el trans-resveratrol es el que mayor reducción presenta del diámetro de los núcleos de las espermatogonias y el que mejor preserva la espermatogénesis al disminuir la presencia de células inmaduras en la luz de los túbulos.



## BIBLIOGRAFÍA





## BIBLIOGRAFÍA

- **Abarikwu, S.O., Adesiyun, A.C., Oyeloja, T.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.** (2010). Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by an herbicide, atrazine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3):874-882.
- **Abd-El Kader, S., Gari, A., Salah El-Den, A.** (2013). Impact of moderate versus mild aerobic exercise training on inflammatory cytokines in obese type 2 diabetic patient: a randomized clinical trial. *African Health Sciences*, 13(4):857-863.
- **Acharya, U.R., Mishra, M., Patro, J., Panda, M.K.** (2008). Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology*, 25(1):84-88.
- **Agarwal, A.** (2012). Cardiovascular benefits of exercise. *International Journal of General Medicine*, 5: 541-545.
- **Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, R.K., Ranga G., Li, J.** (2008). Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending in fertility clinic: an observational study. *Fertility and Sterility*, 89(1):124-128.
- **Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S., and Said, T.M.** (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8:616–627.
- **Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A.** (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4):829-843.
- **Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.** (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1):1-17.
- **Agarwal, M., Kumar, V., Kashyap, M.P., Khanna, V.K., Randhawa, G.S., Pant, A.B.** (2011). Ischemic insult induced apoptotic changes in PC12 cells: protection by trans resveratrol. *European Journal of Pharmacology*, 666(1-3):5-11.
- **Agdam, H.R., Razi, M., Amniattalab, A., Malekinejad, H., Molavi, M.** (2017). Co-Administration of Vitamin E and Testosterone Attenuates the Atrazine-Induced Toxic Effects on Sperm Quality and Testes in Rats. *Cell Journal*, 19(2): 292-305.
- **Aitken, R.J.** (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4):659–668.

- **Aitken, R.J.** (1997). Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction*, 3(3):169–173.
- **Aitken, R.J.** (2006). Sperm function tests and fertility. *Internal Journal of Andrology*, 29(1):69-75.
- **Aitken, R.J., Clarkson, J.S.** (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2):459-469.
- **Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S.** (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1): 183-197.
- **Aitken, R.J., Fisher, H.** (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bio Essays*, 16(4):259–267.
- **Aitken, R.J., Krausz, C.** (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122(4):497-506.
- **Aitken, R.J., Roman, S.D.** (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 1(1):15-24.
- **Akmal, M., Qadri, J.Q., Noori, S, Shahiya, T., Afrozul H., Khelod, Y.** (2006). Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *Journal of Medicinal Food*, 9(3):440-442.
- **Akorede, G.J., Ambali, S.F., Hudu, M.G., Aisha Olatunja, A.O., Shittu, M., Aremua, A., Basiru, A., TalhaBiobakua, A., Ahmed, A.O., Ameen, S.A.** (2020). Protective effect of vitamin C on chronic carbamazepine-induced reproductive toxicity in male wistar rats. *Toxicology Reports*, 27(7):269-276.
- **Alarcon de Lastra, C., and Villegas, I.** (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35:1156-1150.
- **Al-Attar, A.M.** (2011). Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Science*, 18(1):63-72.
- **Albano, E.** (2006). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65(3):278-290.



- **Alhamar, A.T.** (2019). Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *Journal of Human Reproduction Science*, 12(1):4-18.
- **Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T.** (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8(5):338-348.
- **Arce, J.C., De Souza, M.J., Pescatello, L.S., Luciano, A.A.** (1993). Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes. *Fertility and Sterility*, 59(2):398-404.
- **Aruldas, M.M., Subramanian, S., Sekar, P., Vengatesh, G., Chandrahasan, G., Govindarajulu, P., Akbarsha, M.A.** (2005). Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). *Human Reproduction*, 20(10):2801-2813.
- **Aulesa, C., Lasheras, J., Gris, J.M., Herrero, J., Marques, C., Iglesias, A.** (2007). Seasonal variations in semen parameters. *Revista Internacional de Andrología*, 4:37-42.
- **Awad, H., Halawa, F., Mostafa, T., Alta, H.** (2006). Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology*, 29(3):409-413.
- **Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A.J., and Agarwal, A.** (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81(2):349-354.
- **Badouard, C., Ménézo, Y., Panteix, G., Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J.** (2008). Determination of new types of DNA lesion in human sperm. *Zygote*, 16(1):9-13.
- **Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E.J., Kuszynski, C.A., Stohs, S.J.** (2000). Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14(1):33-41.

- **Balercia, G., Arnaldi, G., Fazioli, F., Serresi, M., Alleva, R., Mancini, A.** (2002). Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrologia*, 34(2):107-111.
- **Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S.** (2009). Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and Sterility*, 91(5):1785-1792.
- **Balercia, G., Mosca, F., Mantero, F., Boscaro, M., Mancini, A., Lamonica, G.R., Littarru, G.** (2004). Coenzyme Q (10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and Sterility*, 81(1):93-98.
- **Banihani, S.A.** (2018). Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Testosterone. *Biomolecules*, 8(4):172.
- **Bayyari, N.A.** (2017). The effect of cell phone usage on semen quality and fertility among Jordanian males. *Middle East Fertility Society Journal*, 22(3):178-182.
- **Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G.** (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7 Suppl: S41-50.
- **Betteridge, D.J.** (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2):3-8.
- **Bitgul, G., Tekmen, I., Keles, D., Oktay, G.** (2013). Protective effects of resveratrol against chronic immobilization stress on testis. *ISRN Urology*, 6:1-9.
- **Blache, D., Rustan, I., Durand, P., Lesgards, G., Loreau, N.** (1997). Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 702(1-2):103-110.
- **Blanco-Redriguez, J., Martinez- Garcia, C.** (1998). Apoptosis precedes detachment of germ cell from the seminiferous epithelium after hormonal suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *International Journal of Andrology*, 21(2):109-115.
- **Brady, P.S., Brady, L.J., Ullrey, D.E.** (1979). Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *The Journal of Nutrition*, 109(6):1103-1109.

- **Branco, C.S., Garcez, M.E., Pasqualotto, F.F, Erdtman, B., Salvador, M.** (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2):235–237.
- **Bray, T.M., Bettger, W.J.** (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(3):281-291.
- **Bustos-Obregon, E., Poblete, D., Catriao, R., del Sol, M., Henrique Fernandes, F.** (2013). *International Journal of Morphology*, 31, (4):1251-1256.
- **Cakir, I., Perello, M., Lansari, O., Messier, N.J., Vaslet, C.a., Nillni, E.A.** (2009). Hypothalamic sirt 1 regulates food intake in a rodent model system. *PLoS One*, 4: e8322.
- **Cakiroglu, B., Eyyupoglu, S.E., Gozukucuk, R., Uyanik, B.S.** (2014). Ubiquinol effect on sperm parameters in subfertile men who have asteno-teratozoospermia with normal sperm concentration. *Nephro-Urology Monthly*, 6(3): e16870.
- **Camont, L., Cottart, C.H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D.** (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 634(1):121-128.
- **Cano Sokolff, N.C., Misra, M., Ackerman, K.E.** (2016). Exercise, training, and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in men and women. *Frontiers of Hormones Research*, 47:27-43.
- **Carlberg, I., Mannervik, B.** (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113:484-490.
- **Cass, S.P.** (2017). Alzheimer's Disease and Exercise: A Literature Review. *Current Sports Medicine Report*, 16(1):19-22.
- **Chance, B., & Sies, H.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3): 527-605.
- **Chang, S.I, Jin, B., Youn, P., Park, J.D. Ryu, D.Y.** (2007). Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(2):196-203.
- **Chen, X., He, H., Wang, G., Yang, B., Ren, W., Ma, L., Yu, Q.** (2007). Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 21(3):257-265.

- **Chigurupati, S., Son, T.G., Hyun, C.H., Lathia, J.D., Mughal, M.R., Savell, J., Li, S.C., Nagaraju, G.P.C., Mattson, M.P.** (2008). Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the teste of mice. *Journal of Endocrinology*, 199(2):333-341.
- **Crane, F.L.** (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6):591-598.
- **Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M.** (2016). Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Molecular Medicine Reports*, 14(5):4659-4665.
- **Das, U.B, Mallick, M., Debnath, J.M., Ghosh, D.** (2002). Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian Journal of Andrology*, 4(3):201-207.
- **De Lamirande, E., Gagnon, C.** (1993 a). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(1):21–25.
- **De Lamirande, E., Gagnon, C.** (1993 b). Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 59(6):1291–1295.
- **De Luliis, G.N., Newey, R.J., King, B.V., Aitken, R.J.** (2009) Mobile phone radiation induce reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PloS One*, 4(7): e6446.
- **De Souza, M.J., Arce, J.C., Pescatello, L.S., Scherzer, H.Z., Luciano, A.A.** (1994). Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *International Journal of Sports Medicine*, 15(7):383–391.
- **De Souza, M.J., Miller, B.E.** (1997). The effect of endurance training on reproductive function in male runners. A ‘volume threshold’ hypothesis. *Sports Medicine*, 23(6): 357–374.
- **Dewasmes, G., Bothorel, B., Hsuing, R., Clavert, A., Candas, V.** (1991). Human scrotal temperature during heat exposure associated with passive leg heating. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 286:187-191.
- **Di Luigi, L., Romanelli, F., Sgró, P., Lenzi, A.** (2012). Andrological aspects of physical exercise and sport medicine. *Endocrine*, 42(2):278-284.

- **Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M, Dumelin, E.E., Tappel, A.L.** (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 45(6):927-932.
- **Durairajanayagam, D., Agarwal, A., Ong, C.** (2015). Causes, effects, and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(1):14-27.
- **Edwards, D.G., Schofield, R.S., Lennon, S.L., Pierce, G.L., Nichols, W.W., Braith, R.W.** (2004). Effect of exercise training on endothelial function in men with coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, 93(5):617–620.
- **Eleawa, S.M., Alkhateeb, M.A., Alhashem, F.H., Bin-Jaliah, I., Sakr, H.F., Elrefaey, H.M., Elkarib, A.O., Alessa. R.M., Haidara, M.A., Shatoor, A.S., Khalil. M.A.** (2014). Resveratrol reverses cadmium chloride-induced testicular damage and subfertility by downregulating p53 and Bax and upregulating gonadotropins and Bcl-2 gene expression. *The Journal of Reproduction and Development*, 60(2):515-527.
- **Ennezat, P.V., Malendowicz, S.L, Testa, M., Colombo, P.C., Cohen-Solal, A., Evans T., Lejemtel, T.H.** (2001). Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(1):194-198.
- **Ernster, L., Forsmark-Andrée, P.** (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clinical Investigation*, 711(8 Suppl): S60-5.
- **Eroglu, M., Sahin, S., Durukan, B., Ozakpinar, O. B, Erdinc, N., Turkgeldi, L., Sofuoglu, K., Karateke, A.** (2014). Blood serum and seminal plasma selenium, total antioxidant capacity and coenzyme Q10 levels in relation to semen parameters in men with idiopathic infertility. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3):46-51.
- **Eskenazi, B., Kidd, S.A., Marks, A.R., Slotter, E., Block G, Wyrobek AJ.** (2005). Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 20(4):1006-1012.
- **Fernández-Ayala, D.J.M., López-Lluch, G., García-Valdéz, M., Arroyo, A., Navas, P.** (2005). Specificity of coenzyme Q10 for a balanced function of respiratory chain and endogenous ubiquinone biosynthesis in human cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706(1-2):174-183.

- **Fouad, A.A., Al Sultan, A.I., Yacoubi, M.T.** (2011). Coenzyme Q10 counteracts testicular injury induced by sodium arsenite in rats. *European Journal of Pharmacology*, 655(1-3):91-98.
- **Frauscher, F., Klauser, A., Stenzl, A., Helweg, G., Amort, B., Zur Nedden, D.** (2001). US findings in the scrotum of extreme mountain bikers. *Radiology*, 219(2):427-431.
- **Free, M.J., Schluntz, G.A., Jaffe, R.A.** (1976). Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 14(4):481-488.
- **Fremont, L.** (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66(8):663-673.
- **Fridovich, I.** (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 247(1):1-11.
- **Galassetti, P., Riddell, M.C.** (2013). Ejercicio y diabetes tipo 1 (T1DM). *Comprehensive Physiology*, 3(3): 1309-36.
- **Gambini, J., Inglés, M., Olaso, M., López-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., Borrás, C.** (2015). Propiedades del resveratrol: estudios in vitro e in vivo sobre metabolismo, biodisponibilidad y efectos biológicos en modelos animales y humanos. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015: 837042.
- **Gao, L., Chu, Q., Ye, J.** (2002). Determination of trans-resveratrol in wines, herbs, and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 78(2):255-260.
- **Gaschler, M.M., Stockwell, B.R.** (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482:419-425.
- **Gaskins, A.J., Mendiola, J., Afeiche, M., Jogensen, N., Swan, S.H., Chavarro, J.E.** (2015). Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. *British Journal of Sports Medicine*, 49(4):265-270.
- **Gavazza, M.B., Catala, A.** (2006) The effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from rat testis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74(4):247-254.

- **Gebreegziabher, Y., Marcos, E., McKinon, W., Rogers, G.** (2004). Sperm characteristics of endurance trained cyclists. *International Journal of Sports Medicine*, 25(4): 247–251.
- **Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L.** (1997). Resveratrol a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of U S A*, 94(25):14138-14143.
- **Gerard-Monnier, D., Eldermeier, I., Regnard, K.** (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 11(10):1176-1183.
- **Gertz, M., Nguyen, G.T., Fischer, F., Suenkel, B., Schlicker, C., Fränzel, B., Tomaschewski, J., Aladini, F., Becker, C., Wolters, D., Steegborn, C.** (2012). A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PloS One*, 7: e49761.
- **Gielen, S., Laughlin, M.H., O’Conner, C., Duncker, D.J.** (2015). Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 5784: 347-355.
- **Gielen, S., Schuler, G., Hambrecht, R.** (2001). Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation*, 103(1):1-6.
- **Glade, M.J., Smith, K.** (2015). Oxidative Stress, Nutritional Antioxidants, and Testosterone Secretion in Men. *Annals of Nutritional Disorders & Therapy*, 2:id 1019.
- **Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E., Vina, J.** (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(2):126–131.
- **Griveau, J.F., Le Lannou, D.** (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20(2):61–69.
- **Griveau, J.F., Renard, P., Le Lannou, D.** (1994). An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *International Journal of Andrology*, 17(6):300–307.

- **Griveau, J.F., Renard, P., Le Lannou, D.** (1995). Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore induced acrosome reaction process. *International Journal of Andrology*, 18(2):67-74.
- **Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F.K., Ciarcia, G.** (2014). Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Frontiers in Endocrinology*, 22(5):56.
- **Gündüz, F. Sentürk, U.K, Kuru, O., Aktekin, B., Aktekin, M.R.** (2004). The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiological Research*, 53(2):171-176.
- **Guo, Y., Wang, A., Liu, X., Li, E.** (2019). Effects of resveratrol on reducing spermatogenic dysfunction caused by high-intensity exercise. *Reproductive Biology and Endocrinol*, 17(1):42.
- **Gvozdjaková, A., Kucharská, J., Dubravicky, J., Mojto, V., Singh, R.B.** (2015). Coenzyme Q<sub>10</sub>,  $\alpha$ -tocopherol, and oxidative stress could be important metabolic biomarkers of male infertility. *Disease Markers*, 2015:827941.
- **Hackney, A.C.** (2008). Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The "exercise-hypogonadal male condition". *Journal of Endocrinological Investigation*, 31(10):932-938.
- **Hackney, A.C., Fahner, C.L., Gullledge, T.P.** (1998). Basal reproductive hormonal profiles are altered in endurance trained men. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 38(2):138-141.
- **Hajipour, E., Mashayekhi, F.J., Mosayebi, G., Baazm, M., Zendedel, A.** (2018). Resveratrol decreases apoptosis and NLRP3 complex expressions in experimental varicocele rat model. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 21(2):225-229.
- **Hajizadeh Maleki, B., Tartibian, B., Chehrazi, M.** (2017). The effects of three different exercise modalities on markers of male reproduction in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Reproduction*, 153(2):157- 164.
- **Halliwell, B.** (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16:33-50.
- **Han-Ming, S., Jun, D, Sin-Eng, C., Alvin, L., Choon-Nam, O.** (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*, 17(5):1266-73.



- **Homaee, H.M., Moradi, L., Azarbayjani, M.A. Peeri, M.** (2014). Effect of high intensity exercise training and endurance training on weight loss and C-reactive protein in obese men. *International Journal of Biosciences*, 4:190-196.
- **Howell, R.L., Donegan, C.L., Pinkert, C.A.** (2003). Mouse embryo yield and viability after euthanasia by CO<sub>2</sub> inhalation or cervical dislocation. *Comparative Medicine*, 53(5):510-513.
- **Ikematsu, H., Nakamura, K., Harashima, S., Fujii, K., and Fukotomi, N.** (2006). Safety assessment of coenzyme Q10 (Kaneka Q10) in healthy subjects: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(3):212-218.
- **Irvine, D.S.** (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction* 1:6–12.
- **Islam, N., Trainer, P.J.** (1998). The hormonal assessment of the infertile male. *British Journal of Urology*, 82(1): 69-75.
- **Ivell, R.** (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5-15.
- **Jacob, R.A., Pianalto, F.S., Agee, R.E.** (1992). Cellular ascorbate depletion in healthy men. *The Journal of Nutrition*, 122(5):1111-1118.
- **Jana, K., Dutta, A., Chakraborty, P., Manna, I., Firdaus, S.B., Bandyopadhyay, D., Chattopadhyay, R., & Chakravarty, B.** (2014). Alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine protects intensive swimming exercise mediated germ-cell depletion, pro-oxidant generation, and alteration of steroidogenesis in rat testis. *Molecular Reproduction and Development*, 81(9):833-850.
- **Jana, K., Samanta, P.K., De, D.K.** (2010). Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant status. *Toxicology Sciences*, 116(2):647-659.
- **Jana, K., Samanta, P.K., Manna, I., Ghosh, P., Singh, N., Khetan, R.P., & Ray, B.R.** (2008). Protective effect of sodium selenite and zinc sulfate on intensive swimming-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 33(5):903–914.

- **Jensen, C. E., Wiswedel, K., McLoughlin, J., Van der Spuy, Z.** (1995). Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertility and Sterility*, 64 (6):1189–1196.
- **Jiang, Y.G., Peng, T., Luo, Y., Li, M.C, Lin, Y.H.** (2008) Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 121(13):1204–1209.
- **Józków, P., Medras, M.** (2012). Psychological stress and the function of male gonads. *Endocrinologia Polska*, 63(1):44-49.
- **Józków, P., Rossato, M.** (2017). The impact of intensive exercise on semen quality. *American journal of Men´s Health*, 11:654-662.
- **Juan, M.E., Gonzalez-Pons, E., Munuera T., Ballester, J., Rodriguez, J.E., and Planas, J.M.** (2005). Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *The Journal of Nutrition*, 135(4):757-760.
- **Jung, A., Schuppe, H.C.** (2007). Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia*, 39(6): 203-215.
- **Jung, A., Strauss, P., Lindner, H.J., Schuppe, H.C.** (2008) Influence of moderate cycling on scrotal temperature. *International Journal of Andrology*, 31(4):403–407.
- **Kagan, V.E., Nohl, H., Quinn, P.** (1996). Coenzyme Q: its role in scavenging and generation of radicals in membranes. *Antioxidants in Health and Disease*, 157-200.
- **Kalantari, A., Saremi, A., Shavandi, N., Nia, A.F.** (2017). Impact of four weeks swimming exercise with alpha-tocopherol supplementation on fertility potential in healthy rats. *Urology Journal*, 29:5023-5026.
- **Kaur, P., Bansal, M.P.** (2004). Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. *Journal of Biomedical Science*, 11(3):391-397.
- **Kawamura, T., Muraoka, I.** (2018). Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. *Antioxidants*, 5,7(9).
- **Kipandula, W., Lampiao, F.** (2015). Semen profiles of young men involved as bicycle taxi cyclists in Mangochi District Malawi: A case- control study. *Malawi Medical Journal*, 27(4):151-153.
- **Knez, W.L., Jenkins, D.G., Coombes, J.S.** (2007). Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 39(2):283–288.

- **Kolthur-Seetharam, U., Teerds, K., de Rooij, D.G., Wendling, O., McBurney, M., Sassone-Corsi, P., Davidson, I.** (2009). The histone deacetylase SIRT1 controls male fertility in mice through regulation of hypothalamic-pituitary gonadotropin signaling. *Biology of Reproduction*, 80(2):384-391.
- **Kostaropoulos, I.A., Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Ionomou, G.V., Makrygiannis, V., Papadopoulos, G., Kouretas, D.** (2006). Comparison of the blood redox status between long-distance and short-distance runners. *Physiological Research*, 55(6):611–616.
- **Kumar, S., Kumari, A., Murarka, S.** (2009). Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(8):615-24.
- **Kvist, U., Björndal, L.** (2002). Manual on basic semen analysis, ESHRE. Monographs 2. Oxford: Oxford University Press.
- **Lanzafame, F.M., La Vignera, S., Vicari, E., Calogero, A.E.** (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(5):638-659.
- **Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Crane, P.** (2006). Exercise is associated with reduced risk of incident dementia among persons 65 years of age and older. *Annals of Internal Medicine*, 144(2):73-81.
- **Lavranos, G., Balla, M., Tzortzopoulou, A., Syriu, V., Angeloupolou, R.** (2012). Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reproductive Toxicology*, 34:298-307.
- **Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F.** (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update* 2:246–256.
- **Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Lombardzo, F., Terminali, O., Passi, S., Dondero, F.** (1994) Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Human Reproduction*, 9:2044–2050.
- **Linke, A., Adams, V., Schulze, P.C., Erbs, S., Gielen, S., Fiehn, E. Mobius-Winkler, S., Schubert, A., Schuler, G., Hambrecht, R.** (2005). Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*, 111(14):1763–1770.

- **Litarru, G.P.** (2007). Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q10: Recent Developments *Mol Biotechnology*, 37(1):31-37.
- **Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B.** (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):209-214.
- **Liu, Z., Lin, H., Ye, S., Liu, Q.Y., Meng, Z., Zhang, C.M., Xia, Y., Margoliash, E., Rao, Z., Liu, X.J.** (2006). Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroy-ing reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 103(4):8965-8970.
- **López-Dominguez, J.A., Khaiwesh, H., González-Reyes, J.A., López- Lluch, G., Navas, P., Ramsey, J.J., de Cabo, R., Burón, M.I., Villalba, J.M.** (2013). Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice. *Age*, 35(6):2017-2044.
- **Lucesoli, F., Fraga, C.G.** (1999). Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. *Toxicology*, 132(2-3):179-186.
- **Magnusdottir, E.V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M., Olafsdottir, K.** (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human Reproduction*, 20(1):208-215.
- **Maimoun, L., Lumbroso, S., Manetta, J., Paris, F., Leroux, J.L., Sultan, C.** (2003). Testosterone is significantly reduced in endurance athletes without impact on bone mineral density. *Hormone Research*, 59(6): 285-292.
- **Maiorino, M., Bosello, V., Ursini, F., Foresta, C., Garolla, A., Scapin, M., Sztajer, H., Flohe, L.** (2003). Genetic variation of gpx-4 and male infertility in humans. *Biology of Reproduction*, 68(4):1134-1141.
- **Maleki, B.H., Tartibian, B., Vaamonde, D.** (2014). The effects of 16 weeks of intensive cycling training on seminal oxidants and antioxidants in male road cyclists. *Clinical of Journal of Sports Medicine*, 24(4): 302-307.
- **Mancini, A. & Balercia, G.** (2011). Coenzyme Q (10) in male infertility: physiopathology and therapy. *Biofactors*, 37(5):374-380.
- **Mancini, A., De Marinis, L., Oradei, A., Hallgass, E., Conte, G., Pozza, D. and Littarru, G. P.** (1994). Coenzyme Q10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. *Journal of Andrology*, 15(6):591-594.

- **Maneesh M, Jayalakshmi H, Dutta S, Chakrabarti, A., Vasudevan, D.M.** (2005). Experimental therapeutic intervention with ascorbic acid in ethanol induced testicular injuries in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*,43(2):172-176.
- **Manna, I., Jana, K., Samanta, P.K.** (2003). Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(1):33-40.
- **Manna, I., Jana, K., Samanta, P.K.** (2004 a). Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42(8): 816-822.
- **Manna, I., Jana, K., Samanta, P.K.** (2004 b). Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male Wistar rats: Protective role of  $\alpha$ -tocopherol succinate. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 29(2):172-185.
- **McCord JM.** (1993), Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry*, 26(5):351-357.
- **McCord, J.M., Fridovich, I.** (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5-6):363-369.
- **Mendes, T.B., Paccola, C.C., de Oliveira Neves, F.M., Simas, J.N., da Costa Vaz, A., Cabral, R.E., Vendramini, V., Miraglia, S.M.** (2016). Resveratrol improves reproductive parameters of adult rats varicocelized in peripuberty. *Reproduction*, 152(1), 23-35.
- **Minaii, B, Moayeri, A., Shokri, S., Habibi Roudkenar, M., Golmohammadi, T., Malek, F., Barbarestani, M.** (2014). Melatonin improves the sperm quality in forced swimming test induced oxidative stress in nandrolone treated Wistar rats. *Acta Medica Iran*, 52(7):496-504.
- **Mingoti, G.Z., Pereira, R.N., Monteiro, C.M.** (2003). Fertility of male adult rats submitted to forced swimming stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(5):677–681.
- **Mishra, M., Acharya, U.R.** (2004). Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(2):173-178.

- **Moayeri, A., Mokhtari, T., Hedayatpour, A., Abbaszadeh, H.A., Mohammadpou, S., Ramezanikhah, H., Shokri, S.** (2018). Impact of melatonin supplementation in the rat spermatogenesis subjected to forced swimming exercise. *Andrologia*, 18(3):1-9.
- **Mogulkoc, R., Baltaci, A.K., Aydin, L., Oztekin, E., Tuncer, I.** (2006). Pinealectomy increases oxidant damage in kidney and testis caused by hyperthyroidism in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 24(5):449-453.
- **Moustafa, M.H, Sharma, R.K, Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A, Thomas, A.J Jr, Agarwal, A.** (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, 19(1):29-38.
- **Mruk, D, Silvestrini, B, Mo, M, Cheng, CY.** (2002). Antioxidant superoxide dismutase- a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4):305-311.
- **Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A.** (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 54:533-539.
- **Murta D., Batista M., Trindade A., Silva E., Henrique D.** (2014). In vivo noth signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse. *Plos One* 9, (11): e113365.
- **Nadjarzadeh, A., Sadeghi, M.R., Amirjannati, N., Vafa, M.R., Motevalian, S.A, Gohari, M.R, Akhondi, M.A., Yavari, P., Shidfar, F.** (2011) Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind, placebo Controlled Trial. *Journal of Endocrinology Investigation*, 34: e224–228.
- **Nadjarzadeh, A., Shidfar, F., Amirjannati, N., Vafa, M.R., Motevalian, S.A., Gohari, M.R., Nazeri Kakhki, S.A., Akhondi, M.M., Sadeghi, M.R** (2014). Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia*, 46(2):177-183.
- **Nair, N., Bedwal, S., Prasad, S., Saina, M.R., Bedwal, R.S.** (2005). Short-term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymis of rats. *Indian Journal of experimental biology*, 43(9):786-794.

- **Newton, R.U., Galvao, D.A.** (2008). Exercise in Prevention and Management of Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 9:135-146.
- **Nicolini G, Rigolio R, Miloso M, Bertelli AA, Tredici G.** (2001). Anti-apoptotic effect of trans-resveratrol on paclitaxel-induced apoptosis in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neuroscience Letters*, 302(1):41-44.
- **Niki, E.** (1997). Mechanism and dynamics of antioxidant action of ubiquinol. *Molecular Aspects of Medicine*, 18:63-70.
- **Nirupama, M., Devaki, M., Nirupana, R., Yajurvedi, H.N.** (2013). Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(1):58-68.
- **Nurunen, M., Olsson, J., Dallner, G.** (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1-2):171-199.
- **O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C.** (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(4):528-540.
- **Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Ethordević, N.Z., Trbojević, I.S., Stajn, A.S., Saicić, Z.S.** (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q (10) and vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29(2):191-197.
- **Okon, U.A., Utuk, I.I.** (2016). Ascorbic acid treatment elevates follicle stimulating hormone and testosterone plasma levels and enhances sperm quality in albino Wistar rats. *Nigerian Medical Journal*, 57(1):31-36.
- **Olas, B., Wachowicz, B.** (2005). Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets*, 16(5):251-260.
- **Olive, D.L.** (2010). Exercise and fertility: an update. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 22(4):259-263.
- **Ozaki, A., Muromachi, A., Sumi, M., Sakai, Y., Morishita, K., Okamoto, T.** (2010). Emulsification of Coenzyme Q10 using gum Arabic increase bioavailability in rats and human and improves food-processing suitability. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 56(1):41-47.

- **Özyilmaz Yay, N., Şener, G., Ercan, F.** (2019). Resveratrol treatment reduces apoptosis and morphological alterations in cisplatin induced testis damage. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4):621-631.
- **Paillard, T., Rolland, Y., de Souto Barreto, P.** (2015). Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: A narrative review. *Journal of Clinical Neurology*, 11(3): 212-219.
- **Papa, S., Skulachev, V.P.** (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis, and aging. *Molecular Cellular and Biochemistry*, 174(1-2):1621-1627.
- **Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fujutu, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J.A.** (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas man! *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 291(3):391-511.
- **Radak, Z., Chung, H.Y., Goto, S.** (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*, 6(1):71-75.
- **Ramadan, L.A., Abd-Allah, A.R., Aly, H.A., Saad-el-Din, A.A.** (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological Research*, 46(4):363-370.
- **Ranawat, P., Khanduja, K. L, Pathak, C.M.** (2014). Resveratrol an ingredient of red wine abrogates the reproductive capacity in male mice. *Andrologia*, 46(6):650-658.
- **Rato, L., Alves, M.G., Silba, B.M., Souza, M., Oliveira, P.** (2016). Sirtuins: Novel Players in Male Reproductive Health. *Current Medicinal Chemistry*, 23(11):1084-99.
- **Reddy, K.P., Madhu, P., Reddy P.S.** (2016). Protective effects of resveratrol against cisplatin- induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 91:65-72.
- **Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J.F., Casper, R.F.** (2001). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a) pyrene. *Reproductive Toxicology*, 15(5):479-486.
- **Rezaie Agdam, H., Razi, M., Amniattalab, A., Malekinejad, H., Molavi, M.** (2017). Co-administration of vitamin E and testosterone attenuates the atrazine-induced toxic effects on sperm quality and testes in rats. *Cell Journal*, 19(2):292-305.



- **Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., Breibart, H. (2004).** Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosoma reaction. *Biology of Reproduction*, 70(2):18-22.
- **Rodríguez, I., Díaz, A., Vaamonde, D. (2016).** Assessment of the effect of prolonged forced swimming on CD-1 mice sperm morphology with and without antioxidant supplementation. *Andrologia*, 48(3):277-281.
- **Rodríguez-Bernaldo, A., Lage-Yusty, M.A., Lopez-Hernandez, J. (2009).** HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42:1018-1022.
- **Rodríguez-Bies, E., Navas, P., López-Lluch, G. (2015).** Age-dependent effect of every-other-day feeding and aerobic exercise in ubiquinone levels and related antioxidant activities in mice muscle. *The Journal of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(1):33-43.
- **Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. (2009)** The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testes axis, and semen quality: a randomized controlled study. *Journal of Endocrinology*, 200:259–271.
- **Safarinejad, M.R., Safarinejad, S., Shafiei, N., Safarinejad, S. (2012).** Effects of reduced form of Coenzyme Q10 (Ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *The Journal of Urology*, 188:526-531.
- **Sahinturk, V., Guclu, C., Baycu, C. (2007).** Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 9(1):117–124.
- **Saki, G., Rahim, F., Alizadeh, K. (2009).** Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *Journal of Human Reproduction Science*, 2(2):72-75.
- **Saki, G., Rahim, F., Kaisi, O.A. (2010).** Effect of forced swimming stress on in-vivo fertilization capacity of rat and subsequent offspring quality. *Journal of Human Reproduction Science*, 3(1):32-34.

- **Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J.** (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*, 78(3):491-499.
- **Saleh, RA., Agarwal A., Nada, EA., El-Tonsy MH., Sharma, RK., Meyer A.** (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 79 Suppl 3: 1597-1605.
- **Salem, M.H., Kamel, K.I., Yousef, M.I., Hassan, G.A., EL-Nouty, F.D.** (2001). Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B (1). *Toxicology*,162(3):209-218.
- **Samanta, P.K., Manna, I., & Jana, K.** (2006). Effect of L- ascorbic acid supplementation on testicular oxidative stress and endocrine disorders in mature male rats exposed to intensive swimming exercise. *Reproductive Medicine and Biology*, 5(2):145-153.
- **Sanghisetti, V., V, Ghongane, B.B., Nayak, B.B.** (2014). Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *Journal of Clinical Diagnosis Research*. 8: HC05-HC08.
- **Sanocka, D., Kurpisz, M.** (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 23(2):12.
- **Sarabia, L., Espinoza-Navarro, O., Maurer, I., Ponce, C., Bustos-Obregón, E.** (2011). Protective Effect of Melatonin on Damage in the Sperm Parameters of Mice Exposed to Diazinon. *International Journal of Morphology*, 29(4):1241-1247.
- **Savaskan, E., Olivieri, G., Meier, F., Seifritz, E., Wirz-Justice, A., Müller-Spahn, F.** (2003). Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology*, 49(6):380-383.
- **Schulte, R.T., Ohl, D.A., Sigman, & M., Smith. G.D.** (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27:3-12.
- **Segal, R., Zwaal, C., Green, E., Tomasone, J.R., Loblaw, A., Petrella, T.** (2017). Exercise for people with cancer: a clinical practice guideline. *Current Oncology*, 24(1):40-46.

- **Sen Gupta, R., Sen Gupta, E., Dhakal, B.K., Thakur, A.R., Ahnn, J.** (2004). Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells*, 17(1), 132-139.
- **Senthil Kumar, J., Banudevi, S., Sharmila, M., Murugesan, P., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M., Arunakaran, J.** (2004). Effects of vitamin C and E on PCB (Aroclorn1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, 19(2):201-208.
- **Sgro, P., Romanelli, F., Felici, F., Sansone, M., Bianchini, S., Buzzachera, C.F., Baldari, C., Guidetti, L., Pigozzi, F., Lenzi, A.** (2014). Testosterone responses to standardized short-term sub-maximal and maximal endurance exercises: issues on the dynamic adaptive role of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(1):13-24.
- **Sharpe, R.M.** (2000). Environment, lifestyle, and male infertility. *Baillieres Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 14(3):489-503.
- **Sharpe, R.M., Maddocks, S., Millar, M., Saunders, PTK, Kerr, J.B., McKinnell, C.** (1992). Testosterone and spermatogenesis: identification of stage dependent, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *Journal of Andrology*, 13:172-184.
- **Shin, S., Jeon, J.H., Park, D., Jang, M.J., Choi, J.H., Choi, B.H., Joo, S.S., Nahm, S.S., Kim, J.C. Kim, YB.** (2008). Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research*, 31(1):83-87.
- **Shoba, B., Lwin, Z.M., Ling, L.S., Bay, B.H., Yip, G.W.** (2009). Function of Sirtuins in Biological Tissues. *The Anatomical Records*, 292(4):536-543.
- **Siddiqui MA., Kashyap MP, Kumar V, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, Pant AB.** (2010). Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells. *Toxicology in Vitro*, 24(6):1592-1598.
- **Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S.** (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction*, 4(1):38-47.
- **Song, G.J., Norkus, E.P., Lewis, V.** (2006). Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International Journal of Andrology*, 29(6):569-575.

- **Sönmez, M., Türk, G., Yüce, A.** (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63(7):2063-2072.
- **Stoy, J., Hjollund, N.H., Mortensen, J.T., Burr, H., Bonde, J.P.** (2004). Semen quality and sedentary work position. *International Journal of Andrology*, 27(1): 5-11.
- **Sztejn, J.M., Farley, J.S., Mobraaten, L.E.** (2000). In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of Reproduction*, 63(6):1774-1780.
- **Tappel, A.L.** (1962). Vitamin E as the Biological Lipid Antioxidant. *Vitamins & Hormones*. 20:493-510.
- **Tartibian, B., FitzGerald, L.Z., Azadpour, N., Maleki, B.H.** (2015). A randomized controlled study examining the effect of exercise on inflammatory cytokine levels in post-menopausal women. *Post Reproductive Health*, 21(1):9-15.
- **Tartibian, B., Maleki, B.H.** (2012). Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 22(2):132- 139.
- **Tartibian, B., Maleki, B.H., Kanaley, J., Sadeghi, K.** (2011). Long-term aerobic exercise and omega-3 supplementation modulate osteoporosis through inflammatory mechanism in post-menopausal women: a randomized repeated measures study. *Nutrition and Metabolism*, 15:8-71.
- **Thiele, J.J., Friesleben, H.J., Fuchs, J., Ochsendorf, F.R.** (1995). Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, 10(1):110-115.
- **Tremellen, K.** (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update*. 14(3):243-258.
- **Tung, B.T., Rodriguez-Bies, E., Thanh, H.N., Le-Thi-Thu, H., Navas, P., Motilva-Sánchez, V., López-Lluch, G.** (2015). Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clinical and Experimental Research*, 27(6):775-783.
- **Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Kutlu Ö, Kahraman C.** (2015). Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(3):229-235.

- **Turner, R.T., Evans, G.L., Zhang, M., Maran, A., Sibonga, J.D.** (1999). Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*, 140:50-54.
- **Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E.** (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and the effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*, 13:1429-1436.
- **Uzun, F.G., Kalender, S., Durak, D., Demir, F., Kalender, Y.** (2009). Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8):1903-1908.
- **Vaamonde, D., Algar-Santacruz, C., Abbasi, A., García-Manso, J.M.** (2018). Sperm DNA fragmentation as a result of ultra-endurance exercise training in male athletes. *Andrologia*, 50(1).
- **Vaamonde, D., Da Silva, ME., Garcia- Manso, JM., Barrera, N., Vaamonde, R.** (2012). Physically active men show better parameters and hormone values than sedentary men. *European Journal of Applied Physiology*, 112(9):3267-3273.
- **Vaamonde, D., Da Silva-Grigoletto, M.E., García-Manso, J.M., Vaamonde-Lemos, R., Swanson, R.J., Oehninger, S.C.** (2009). Response of semen parameters to three training modalities. *Fertility and Sterility*, 92(6):1941-1946.
- **Vasiliev AV, Martinova EA, Sharanova NV, Gapparov MM.** (2011). Effects of coenzyme Q10 on rat liver cells under conditions of metabolic stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 150(4):416–419.
- **Vernet, P., Aitken, R.J., Drevet, J.R.** (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1-2):31-39.
- **Vijayprasad S., Ghongane, B.B., & Nayak, B.B.** (2014). Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8: HC05-HC08.
- **Vingren, J.L., Kraemer, W.J., Ratamess, N.A., Anderson, J.M., Volek, J.S., Maresh, C.M.** (2010). Testosterone physiology in resistance exercise and training: the up-stream regulatory elements. *Sports Medicine*, 40(12): 1037-1053.
- **Wang, Y., Wisloff, U., Kemi, O.J.** (2010). Animal models in the study of exercised-induced cardiac hypertrophy. *Physiological Research*, 59(5):633-644.

- **Wensel, E., Somoza, V.** (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5):472-481.
- **Wheeler, G.D., Wall, S.R., Belcastro, A.N., Cumming, D.C.** (1984). Reduced serum testosterone and prolactin levels in male distance runners. *Journal of American Medical Association*, 252(4):514-516.
- **Wise, L.A., Cramer, D.W., Hornstein, M.D., Ashby, R.K., Missmer, S.A.** (2011). Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertility and Sterility*, 95(3):1025–1030.
- **Wyrobek, A.J., Bruce, W.R.** (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 72(11):4425-4429.
- **Yoganathan, T., Eskild, W., Hansson, V.** (1989). Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(4):355-359.
- **Yuluğ, E., Türedi, S., Alver, A., Türedi, S., Kahraman, C.** (2013). Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *Scientific World Journal*, 28:489659
- **Zhao, X., Bian, Y., Sun, Y., Li, L., Wang, L., Zhao, C.et al.** (2013). Effects of moderate exercise over different phases on age-related physiological dysfunction in testes of SAMP8 mice. *Experimental Gerontology*, 48(9):869-880.
- **Zini, A., de Lamirande, E., Gagnon, C.** (1993). Reactive Oxygen Species in Semen of Infertile Patients: Levels of Superoxide Dismutase- And Catalase-Like Activities in Seminal Plasma and Spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16:183-188.
- **Zini, A., Schlegel, P.N.** (1996). Catalase mRNA expression in male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*, 17(5):473-480.
- **Zini, A., Schlegel, P.N.** (1997). Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat's testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *Journal of Urology*, 158(2):659-663.
- **Zribi, N., Chakroun, N.F., Elleuch, H., Abdallah, F.B., Ben Hamida, A.S., Gargouri, J.** (2011). Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 27:3-12.

## ÍNDICE DE TABLAS







## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Ganancia de peso tras los 50 días del experimento.

**Tabla 2.** Porcentaje de anomalías mayores y menores observadas en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Porcentaje de anomalías de Cabeza, pieza intermedia y cola observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Mediciones obtenidas del área, porcentaje de epitelio y porcentaje de luz de los distintos grupos estudiados. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.** Mediciones obtenidas del área, aspecto, área/box, diámetro mínimo, circularidad, longitud, anchura y perímetro de los túbulos seminíferos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Mediciones obtenidas del área, aspecto y diámetro de los núcleos de la pared de los túbulos seminíferos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 7.** Número de ratones con presencia de células en la luz del túbulo seminífero en cada uno de los grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente.

**Tabla 8.** Porcentaje de apoptosis observada de forma subjetiva con la tinción de hematoxilina eosina en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo

ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente.

## ÍNDICE DE FIGURAS





## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Efecto del estrés oxidativo sobre el espermatozoide.

**Figura 2.** Bioquímica fundamental del sistema enzimático

**Figura 3.** Esquema sobre las fases de la peroxidación lipídica.

**Figura 4.** Regulación hormonal de la espermatogénesis.

**Figura 5.** Estructura química del trans-resveratrol y el 17  $\beta$  estradiol.

**Figura 6.** Puntos de acción del trans- resveratrol en los procesos de oxidación.

**Figura 7.** Estructura química del ubiquinol, ubiquinona y semiquinona.

**Figura 8.** Lugares de acción del ubiquinol, vitamina E y ascorbato, en el proceso de peroxidación lipídica.

**Figura 9.** Ácido ascórbico (vitamina C).

**Figura 10.** Ascorbato.

**Figura 11.** Fotografía de tres de los grupos sometidos a estudio. Los animales estaban alojados en cajas individuales.

**Figura 12.** Ratón sometido a una sesión diaria de natación en tanques de agua templada.

**Figura 13.** Administración de antioxidantes diarios a uno de los animales.

**Figura 14.** Valoración de morfología y vitalidad espermática mediante la técnica de eosina-nigrosina.

**Figura 15.** Delimitación de los contornos externos y de la luz sobre las imágenes a 10X, para la determinación del área de epitelio, porcentaje de epitelio y porcentaje de luz de los túbulos seminíferos.

**Figura 16.** Delimitación de los contornos de los túbulos seminíferos sobre las imágenes de 10X para determinar el área, aspecto, diámetro, circularidad, perímetro, anchura y longitud.

**Figura 17.** Proceso de segmentación sobre preparación de 20X, previamente convertida a blanco/negro, para determinación del área, aspecto y diámetro de los núcleos de las células de la pared del tubo seminífero.

**Figura 18.** Microfotografía a 10X de corte transversales de túbulos seminíferos normales.

**Figura 19.** Microfotografía a 20X de corte transversal de tubo seminífero. Las flechas marcan el detalle de fenómenos de apoptosis celular.

**Figura 20.** Ingesta diaria de pienso consumida en los distintos grupos de estudio, datos expresados como medias  $\pm$  desviación estándar. No se observan diferencias significativas entre grupos.

**Figura 21.** Representación del porcentaje de formas anormales de espermatozoides en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Figura 22.** Porcentaje de vitalidad observados en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Figura 23.** Representación gráfica del diámetro obtenido de los núcleos de la pared de los túbulos seminíferos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Figura 24.** Microfotografía que muestra túbulos normales en grupo control (A) y presencia de células del epitelio seminífero en la luz del túbulo de ratones del grupo ejercicio (B).

**Figura 25.** Representación gráfica de los valores de malondialdehído obtenidos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26.** Representación gráfica de los valores de enzima glutatión peroxidasa obtenidos en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $p < 0,05$ ).

**Figura 27.** Representación gráfica de los valores de la glutatión reductasa observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo

ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ).

**Figura 28.** Representación gráfica de los valores de la enzima catalasa en los diferentes grupos. (GC=grupo control; EJERC=grupo ejercicio; EJ-Resv= grupo ejercicio+Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio+Ubiquinol, EJ-Excp= grupo ejercicio+Excipiente). Los valores están expresados como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

**Figura 29.** Representación gráfica de los valores de la enzima superóxido dismutasa observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ).

**Figura 30.** Representación gráfica de la actividad antioxidante total observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ).

**Figura 31.** Representación gráfica de los niveles de Coenzima Q9 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media± desviación estándar ( $p<0,05$ ).

**Figura 32.** Representación gráfica de los niveles de enzima Q10 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media±desviación estándar ( $p<0,05$ ).

**Figura 33.** Representación gráfica de la ratio Q9/Q10 observada en los diferentes grupos. GC = grupo control; EJERC = grupo ejercicio; EJ-Resv = grupo ejercicio + Trans-resveratrol, EJ-Ubiq = grupo ejercicio + Ubiquinol, EJ-Excp = grupo ejercicio + Excipiente. Los valores están expresados como media±desviación estándar ( $p<0,05$ ).





## LISTADO DE ABREVIATURAS





## LISTADO DE ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AH<sup>·</sup>:** Ascorbato
- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ATP:** Adenosín trifosfato
- **CAT:** Enzima catalasa
- **CH-2:** Grupos metileno
- **CoQ10:** Coenzima Q10
- **Cu:** Cobre
- **EO:** Estrés oxidativo
- **ERN:** Especies reactivas de nitrógeno
- **ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- **Fe:** Hierro
- **FSH:** Hormona folículo estimulante
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina
- **GPx:** Enzima glutatión peroxidasa
- **GRd:** Enzima glutatión reductasa
- **GSH:** Glutatión reducido
- **GSSG:** Glutatión oxidado
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno
- **HOO<sup>·</sup>:** hidroperóxido
- **LH:** Hormona luteinizante
- **L-OOH:** Lipoperóxido
- **Mn:** Manganeseo
- **NADPH:** Nicotianamina adenina dinucleótido fosfato
- **NO<sup>·</sup>:** Óxido nítrico
- **O<sub>2</sub>:** Oxígeno
- **O<sup>2·</sup>:** Superóxido
- **OH<sup>·</sup>:** Hidroxilo
- **ONOO<sup>·</sup>:** Peroxinitrito
- **PI:** Pieza intermedia
- **PL:** Peroxidación lipídica
- **PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados
- **QH:** Ubiquinol
- **RL:** Radical libre
- **RO<sup>2·</sup>:** Peroxilo
- **ROS:** Reactive oxygen species
- **SDO-Ex:** Superóxido dismutasa extracelular
- **SIRT:** Sirtuina
- **SOD:** Enzima superóxido dismutasa
- **Zn:** Zinc