

EFECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA, TRANS-REVERATROL Y UBIQUINOL EN LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN RATONES CD-1 SOMETIDOS A EJERCICIO INTENSO DE NATACIÓN FORZADA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

BALTASAR CORTÉS GARCÍA

MÁSTER EN MEDICINA, SANIDAD Y MEJORA ANIMAL

CURSO 2012-2013

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Córdoba, a 10 de Diciembre de 2013

**EFEECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA,
TRANS-REVERATROL Y UBIQUINOL EN LA
MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN
RATONES CD-1 SOMETIDOS A EJERCICIO
INTENSO DE NATACIÓN FORZADA**

Trabajo Fin de Máster

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

Grupo de Reproducción Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de Córdoba

Autor

VºBº Tutor

Fdo.: Baltasar Cortés García

Fdo.: Inmaculada Rodríguez Artiles

Córdoba, a 10 de Diciembre de 2013.

INMACULADA RODRÍGUEZ ARTILES PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INFORMA:

Que el Trabajo Fin de Máster titulado “EFECTO DEL N-ACETILCISTEÍNA, TRANS-RESVERATROL Y UBIQUINOL EN LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN RATONES CD-1 SOMETIDOS A EJERCICIO DE NATACIÓN FORZADA”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. Baltasar Cortés García, realizado bajo mi dirección y asesoramiento, lo considero finalizado y puede ser presentado para su mantenimiento y defensa pública ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos donde corresponda, firmo en Córdoba, a diez de diciembre de dos mil trece.

Fdo: Dra. Inmaculada Rodríguez artiles.

Agradecimientos a Kaneka Corporation (Osaka, Japón) la cesión del ubiquinol así como su apoyo y asesoramiento para la realización de este trabajo. Asimismo, agradecemos el asesoramiento del Prof. Dr. Juan Manuel Serrano Caballero, del Dpto. de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, en el diseño y realización del estudio estadístico.

Índice

RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	24
AGRADECIMIENTOS.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

El ejercicio continuado induce daños en la calidad espermática alterando entre otros parámetros la morfología de los espermatozoides, esto es debido a la alta producción de radicales libres. En experiencias previas, hemos probado la N-Acetilcisteína y el trans-reveratrol administrados como suplemento de la dieta en un modelo de natación forzada en ratones CD-1, y los resultados demostraron que estos antioxidantes reducen el daño causado por el ejercicio intenso disminuyendo el porcentaje de anomalías de los espermatozoides. El objetivo de este estudio es repetir el mismo diseño ampliando el número de antioxidantes a tres (N-Acetilcistina, trans-resveratrol y ubiquinol).

Setenta y cinco ratones son agrupados de forma aleatoria en 5 grupos de 15: grupo reposo (REP), control de natación (C-NAT), natación + N-Acetilcisteína (NAC), natación + trans-resveratrol (RESV), y natación + ubiquinol (UBIQ). Los animales de los grupos C-NAT, NAC, RESV y UBIQ son sometidos a un ejercicio intenso de 3 minutos de natación forzada en piscina con temperatura controlada (33-35°C) durante 50 días seguidos. Los antioxidantes se administran diariamente en una torta de 1 gramo mezclados con pienso.

La valoración morfológica de los espermatozoides se realizó una vez sacrificados los animales, a partir de una extensión del contenido espermático teñido con eosina-nigrosina, obtenido de la cola del epidídimo.

Se observaron que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo REP y C-NAT, lo que significa que el ejercicio de natación forzada utilizado induce el daño espermático. Comparando el porcentaje de espermatozoides normales y el tratamiento recibido, todos los grupos de tratamiento presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) con el grupo C-NAT, lo que significa que la administración de los tres antioxidantes es eficaz en la disminución de las anomalías espermáticas inducidas por el ejercicio intenso, destacando entre ellos el ubiquinol, que llega a superar el porcentaje de espermatozoides normales del grupo REP ($p < 0,05$). Cuando las

anomalías se clasifican como mayores (anomalías de cabeza y pieza intermedia) y menores (anomalías de cola) se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo REP y todos los antioxidantes excepto el NAC, lo que significa que todos tienen mayor capacidad que este para proteger la espermatogénesis, dado que las anomalías mayores son las que más correlación tienen con la misma. En cuanto a vitalidad: todos los grupos de tratamiento presentaron diferencias significativas con los grupos REP y C-NAT, lo que indica que la administración de los antioxidantes utilizados preserva la vitalidad de los espermatozoides.

Palabras clave: esperma, morfología, ejercicio, estrés oxidativo, antioxidantes.

SUMMARY

Continuous exercise has been shown to induce damage altering sperm quality, and more precisely sperm morphology. This seems to be related to the high production of free radicals as a result of exercise. In previous experiences, we tested the administration of N-acetylcysteine and trans-resveratrol as a dietary supplement in an experimental model of forced swimming in CD-1 mice; the results indicated that these antioxidants reduce the damage caused by intense/ continuous exercise decreasing percentage of abnormal sperm. The objective of this study was to compare the protective effect of three different antioxidants (N-acetylcystine, trans-resveratrol and ubiquinol).

Seventy-five mice were randomly allocated into 5 groups of 15: rest group (REP), swimming (C-NAT), swimming + trans-resveratrol (RESV), swimming + N-acetylcysteine (NAC) and swimming + ubiquinol (UBIQ). The animals in the C-NAT, NAC, RESV and UBIQ groups were subjected to 3 minutes of forced swimming exercise in a pool with controlled temperature (33-35°C) for 50 consecutive days. Antioxidants were administered daily in a 1-gram cake mixed with feed.

After death of the animals by cervical dislocation sperm morphology assessment was performed from an extension of epididymary (tail) sperm content stained with eosin-nigrosin.

Significant differences were found ($p < 0.05$) between the C-NAT and REP group, which means that forced swimming exercise induces sperm damage. When comparing the percentage of normal sperm, all antioxidant supplemented groups showed significantly higher numbers ($p < 0.01$) with regards to C-NAT group. This means that the administration of all three antioxidants is effective in reducing sperm abnormalities induced by continuous exercise; among them, ubiquinol, showed higher percentage of normal sperm in comparison to REP group ($p < 0.05$). When anomalies were categorized into major (abnormalities of head and midpiece) and minor (tail abnormalities)

significant differences were found ($p < 0.05$) between the REP group and all antioxidant supplemented groups except for NAC. This seems to indicate that all antioxidants have greater capacity than NAC to protect spermatogenesis, as major anomalies correlate most with this process. With regards to vitality, all treatment groups differed significantly when compared to REP and C-NAT groups, indicating that administration of these antioxidants preserves sperm vitality.

Keywords: sperm, morphology, exercise, oxidative stress and antioxidants.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el deporte ha sufrido un importante auge en la sociedad, el ser humano ha ido tomando consciencia de los numerosos beneficios que aporta a la salud una práctica habitual del mismo. Cada vez son más las personas que realizan actividades físicas e incorporan este hábito a su vida cotidiana. El ejercicio físico aporta multitud de beneficios para la salud, entre ellas la producción de semen de mejor calidad (Vaamonde y col., 2012). Sin embargo, la realización de ejercicio de forma intensa crónica puede causar una disfunción del sistema reproductivo en el macho (Arce y col. 1993; Hackney, 1996) ya que induce estrés oxidativo (Temiz y col., 2000; Di Meo y col., 2001; Ihara y col., 2001) incrementando la producción de ROS, y estos dañan todas las macromoléculas celulares incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados de membrana (PUFA) (Lin y col., 1999). La membrana testicular es rica en PUFA siendo por tanto altamente susceptible de sufrir estrés oxidativo (Álvarez y Storey, 1995), produciendo entre otros, incremento en el porcentaje de anomalías de los espermatozoides (Aziz y col., 2004), disminución de la motilidad espermática, capacidad para fusionarse con el oocito, alteraciones de la integridad y fragmentación del ADN (Saleh y col., 2002), y disminuyendo los niveles de testosterona (Manna y col., 2003).

El estrés oxidativo está inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), o los radicales libres, y aunque los ROS son necesarios para la adquisición de capacidad fertilizante en aspectos, como condensación de la cromatina, remodelación de la secuencia de señales intracelulares, maduración epidimaria y capacitación (Baker y col., 2003; Pons- Rejraji y col., 2009), niveles excesivos de ROS pueden tener un impacto negativo sobre la misma induciendo anomalías en los espermatozoides (Aziz y col., 2004). Por tanto, la concentración de ROS debe mantenerse en unos niveles adecuados para evitar el daño celular. En una situación normal, los mecanismos antioxidantes presentes en el aparato reproductor masculino, combaten estas especies reactivas de oxígeno (ROS) y protegen a las células gonadales y a los espermatozoides maduros del

daño oxidativo (Sikka, 2001), y entre ellos se encuentran enzimas, como la catalasa y la superóxido dismutasa.

En la especie humana, debido a las altas tasas de infertilidad en atletas de élite, se ha estudiado el efecto de diferentes modalidades e intensidades de ejercicios sobre la calidad espermática, observándose cambios principalmente en la concentración y la morfología espermáticas (Arce y De Souza, 1993; Vaamonde y col., 2009). Asimismo, en entrenamientos que suponen una alta intensidad y resistencia, se ha observado cambios en los niveles de hormonas reproductivas, menores concentraciones espermáticas, motilidad disminuida y diversos cambios en la morfología que pueden comprometer la fertilidad (Arce y col., 1993; De Souza y col., 1994; Vaamonde y col. 2005; Vaamonde y col. 2009). Entre las hormonas reproductivas estudiadas se encuentra la testosterona que juega un papel importante en el proceso de desarrollo y maduración del espermatozoide durante la espermatogénesis (Morono y col., 1979), además se requieren unos niveles adecuados de la misma para que las células de Sertoli participen adecuadamente en el desarrollo de un número de espermatozoides maduros y viables que permitan una fertilidad normal (Almeida y col., 2000).

En la actualidad se están incrementando las investigaciones que estudian el efecto que los antioxidantes como suplemento en la dieta puedan tener para combatir el estatus de estrés oxidativo (OSS) (Sikka, 2001). Los estudios más recientes se están centrando en demostrar las múltiples cualidades de los antioxidantes tanto a nivel reproductivo (Vaamonde y col., 2011; Rodríguez y col., 2012) como a otros niveles, sistema nervioso, cardiovascular y muscular (Abdellah y col., 2001; Amrouche y col., 2012; Bemeur y col., 2012; Díaz-Castro y col., 2012; Dolinsky y col., 2012; Gatson y col., 2013; Huynh y col., 2012; Liu y col., 2012; Ringholm y col., 2013; Sabe y col., 2013; Silva y col., 2012; Sohet y col., 2009; Wang y col., 2013; Wu y col., 2013).

La N-Acetilcisteína (NAC), es un potente antioxidante y posiblemente es uno de los más estudiados. Juega un papel importante en la protección celular contra el daño oxidativo, tiene la habilidad de estimular y de mantener los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) y detoxificar los ROS. Es un precursor de los glutationes reducidos (Sreenivasula y col., 2011). Son múltiples los estudios que han valorado su capacidad antioxidante, no solo a nivel reproductivo (Ebenezer y col., 2008; Duarte y col., 2010; Sreenivasula y col., 2011; Oksay y col., 2012; Ranawat y col., 2013; Ji y

col., 2013) sino también a nivel intestinal (Amrouche y col., 2012), cardiovascular (Silva y col., 2012) y cerebral (Bemeur y col., 2012).

El trans-resveratrol es un antioxidante natural ampliamente consumido en alimentos como la uva roja y el vino. Presenta una amplio rango de funciones biológicas demostradas en estudios previos, como antiinflamatoria (Chapin y col., 1983), antioxidante (Leonard y col., 2003), antiviral, antitumoral (Jang y col., 1997; Wensel y col., 2005) y preservando la morfología espermática frente a estrés oxidativo inducido por ejercicio intenso (Vaamonde y col., 2011). Actúa reduciendo la peroxidación lipídica, oxidación y nitración proteica (Olas y Wachowicz, 2005), mejorando el funcionamiento de las mitocondrias. Investigaciones previas han ido encaminadas a comprobar su actividad antioxidante en diferentes sistemas orgánicos; reproductivo (Silva y col., 2001; Emilia y col., 2005; Young-guang y col., 2008; Federico y col., 2009; Collodel y col., 2011; Vaamonde y col., 2012; Mengyuan y col., 2013; Ourique y col., 2013), muscular (Dolinsky y col., 2012; Ringholm y col., 2013; Wu y col., 2013) sistema nervioso (Liu y col., 2012; Gatson y col., 2013; Wang y col., 2013) y cardiovascular (Dolinsky y col., 2012; Sabe y col., 2013).

El ubiquinol (forma reducida del coenzima Q10) actúa transfiriendo electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y en la traslocación de protones a través de la membrana mitocondrial (Lass y col., 1999). Su síntesis ocurre en las membranas lipídicas de las células en el organismo. Su función como antioxidante es notable en los lípidos presentes en las membranas intracelulares, donde ejerce las funciones de transportador redox (Bentinger y col., 2007). Elimina los radicales libres, y previene la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica en las membranas celulares, ayudando además a la regeneración del α -tocoferol. También disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias y del factor α de necrosis tumoral (Fouad y col., 2011). Su actividad como antioxidante se está estudiando en diferentes campos existiendo números estudios que han demostrado su capacidad para disminuir los efectos deletéreos que los ROS producen en distintos tejidos (Villalba y col., 2010), como testicular (Ramadán y col., 2002; Fouad y col., 2011), muscular, donde se ha visto que disminuye el estrés oxidativo asociado a ejercicio intenso (Díaz-Castro y col., 2012), hepático (Sohet y col., 2009; Abdellah y col., 2001), cardiovascular (Abdellah y col., 2001; Huynh y col., 2012) y sistema nervioso (Abdellah y col., 2001).

En experiencias previas, hemos probado la N-Acetilcisteína y el trans-reveratrol administrados como suplemento de la dieta en un modelo de natación forzada en ratones CD-1, y los resultados demostraron que estos antioxidantes reducen el daño causado por el ejercicio intenso disminuyendo el porcentaje de anomalías de los espermatozoides. El objetivo de este estudio es repetir el mismo diseño ampliando el número de antioxidantes a tres (N-Acetilcistina, trans-resveratrol y ubiquinol).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Para el estudio se usaron 75 ratones de la cepa CD-1 machos, de 65 días de edad y 40gr de peso, procedentes de los laboratorios Janvier Labs[®] Rodent Research model and associated services[®] (Francia).

Estos fueron alojados en el animalario del Servicio Centralizado de animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba en jaulas individuales y mantenidos en un ambiente controlado de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% de humedad y un ciclo de 12 horas de luz y doce de oscuridad. 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 fueron distribuidos al azar en 5 grupos homogéneos de 15 ratones (n=15):

- Grupo REP: grupo control en reposo
- Grupo C-NAT: grupo control de ejercicio de natación sin antioxidantes
- Grupo RESV: grupo de ejercicio de natación con administración de trans-reveratrol.
- Grupo NAC: grupo de ejercicio de natación con administración de N-acetilcisteína.
- Grupo UBIQ: grupo de ejercicio de natación con administración de Ubiquinol.

Diariamente los animales eran revisados clínicamente de manera individual para valorar cualquier problema que los hiciera no aptos para el experimento.

Ejercicio:

Los animales de los grupos C-NAT, NAC, RESV y UBIQ fueron sometidos durante 50 días a una sesión diaria de ejercicio intenso de 3 minutos de natación forzada (Saki y cols., 2009; Vaamonde y col., 2011; Rodríguez y col., 2012) en piscinas circulares de 60 cm de diámetro y 80 cm de profundidad con agua a temperatura constante de 33-35°C controlada con termómetro de mercurio de laboratorio. 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.

Una vez finalizado el ejercicio los ratones se secaban con papel y eran devueltos a sus jaulas. Los animales del grupo REP eran manipulados al igual que el resto.

Antioxidantes:

Las drogas fueron administradas mezcladas con pienso en tortas de 1 gramo. Para la elaboración de las tortas en primer lugar se molió el pienso con un molinillo de laboratorio con un tamiz de 1mm. Este fue mezclado con una cantidad de agua destilada en una proporción 1:1, en la cual previamente se había disuelto la cantidad proporcional de droga correspondiente. Las dosis usadas fueron: 1000 p.p.m de N- acetilcisteina (Panreac Quimica S.A.U), 200mg/Kg de trans-reveratrol (Caiman Chemical Company) y 200 mg / Kg de ubiquinol (Kaneka). Tras mezclar durante 5 minutos para homogenizar la masa esta se metió en moldes de poliespan de 1 cm de diámetro y 2,5 de profundidad. Una vez en los moldes estas 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 (Teslar, Tarrasa, España), existente en la Unidad de Banco de Muestras del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba. 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-reveratrol se hizo en un cuarto oscuro con luz tenue roja para evitar la isomerización de la molécula.

Además se elaboraron tortas placebo de la misma manera sin añadir ninguna droga para los grupos REP y C-NAT.

De cada lote de tortas se tomaron 20 unidades elegidas de forma aleatoria para analizar el contenido de droga. Las tortas de trans-resveratrol y NAC se analizaron en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (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) para las tortas de trans-reveratrol y de HPLC con detección por espectrofotometría de masas para las N- Acetilcisteína. Las tortas de Ubiquinol se analizaron en el departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba mediante extracción de la fracción lipídica del pienso (con hexano) y separación mediante HPLC con detector electroquímico.

Las tortas se administraban junto con el pienso tras la finalización del ejercicio. 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.

Sacrificio y toma de muestras

24 horas tras la finalización del experimento los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical (Howell y cols., 2003) y posterior decapitación.

Una vez sacrificados se abrió abdomen por laparotomía en línea media para la obtención de epidídimos que fueron diseccionados y despojados de la grasa circundante y se procedió a abrir la cola con ayuda de una aguja de 22 gauge en un portaobjetos de cristal.

Análisis morfológico y de vitalidad de los espermatozoides

Para la valoración morfológica de los espermatozoides, se realizó una tinción con eosina-nigrosina (Vital ScreamTM, FertiPro[®]). 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 obtenía una alícuota de la mezcla que se colocaba sobre uno de los extremos del portaobjetos de cristal y se realizaba una extensión. Se realizaron dos extensiones por cada animal.

Se valoraron 100 espermatozoides por cada portaobjetos, un total de 200 espermatozoides por ratón (Björndahl y col., 2002) mediante microscopia óptica (Olympus BH-2) a 1000x 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 de 1975. Se recogieron datos sobre aquellos que presentaban una o varias anomalías. Además, en esos 200 espermatozoides analizados por ratón, también se valoró y anotó la vitalidad de los mismos, diferenciando los vivos (en los que no había penetrado el colorante), de los muertos (en los que sí había penetrado el colorante). Los datos obtenidos se recogieron en tablas de Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI (v16.1.18). Los datos se expresan como las medias \pm el error estándar de la media (EEM). Se ha realizado un análisis de varianza no paramétrico, H de Kruskal Wallis, para la comparación entre todos los grupos. Además, en los casos en los que se han encontrado diferencias significativas (nivel de significancia mínima del 0,05), se realiza un análisis no paramétrico, T de Wilcoxon, para la comparación de las medianas entre tratamientos y grupos.

RESULTADOS

Todos los animales que iniciaron el estudio mantuvieron durante el mismo un buen estado general y no se produjeron bajas. Tampoco se observaron alteraciones en su apetito, ni en el aspecto general.

a) Parámetros morfológicos de los espermatozoides:

Se han valorado los parámetros medios de morfología espermática en los diferentes grupos: morfología normal vs anomalías, anomalías simples (una sola anomalía) vs anomalías múltiples (varias anomalías), y anomalías mayores (cabeza y pieza intermedia) vs anomalías menores (cola), dentro de las anomalías simples.

Cabe resaltar que el lote de ejercicio (C-NAT) presenta el menor porcentaje de espermatozoides normales, y que el lote de ubiquinol (UBIQ) presenta el mayor porcentaje de normales (Tabla 1). Se valoró si existen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal entre tratamientos. El análisis no paramétrico de Kruskal Wallis refleja que sí existen diferencias significativas entre tratamientos, y la comparación de medianas expresa diferencias significativas entre los grupos REP, C-NAT y UBIQ (Tabla 2). Todos los antioxidantes utilizados manifiestan diferencias altamente significativas en comparación con el C-NAT, y entre ellos hay diferencias significativas entre UBIQ y todos los demás (Tabla 2).

GRUPO	% Normales	% Anormales
REP	53,53±2,73	46,47±2,73
C-NAT	46,97±1,24	53,03±1,25
NAC	56,23±2,02	43,77±2,02
RESV	58,17±1,21	41,83±1,21
UBIQ	64,97±1,12	35,03±1,12

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides normales y anormales en los seis lotes de estudio. Los valores están expresados en media±EEM. REP=Reposo; C-NAT=Control de natación; NAC= N-Acetilcisteína; RESV=Trans-resveratrol; UBIQ=Ubiquinol. Cada grupo n=15.

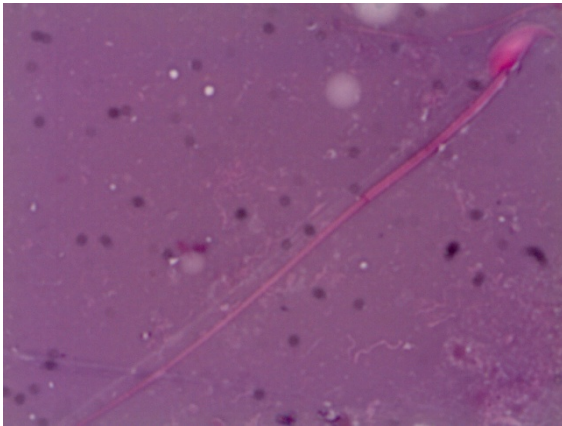


Fig. 1. Espermatozoide normal.

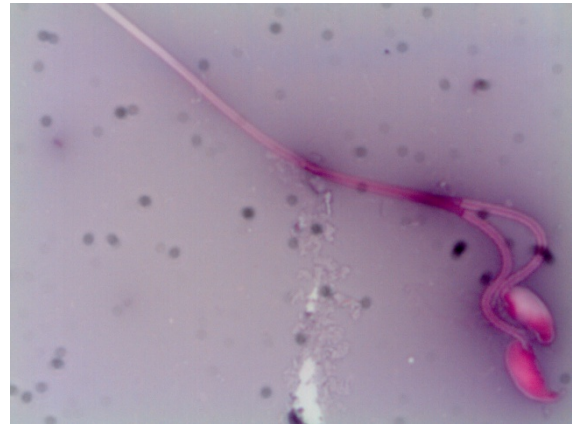


Fig. 2. Espermatozoide anormal (doble cabeza y doble PI, con una sola cola)

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,02*	p<0,56	p<0,08	p<0,0003**
C-NAT	p<0,02*		p<0,0011**	p<0,00002**	p<0,000003**
NAC	p<0,56	p<0,0011**		p<0,22	p<0,001**
RESV	p<0,08	p<0,00002**	p<0,22		p<0,0006**
UBIQ	p<0,0003**	p<0,000003**	p<0,001**	p<0,0006**	

Tabla 2. Nivel de significancia del % de espermatozoides normales según el tratamiento (T de Wilcoxon).

*=p<0,05; **=p<0,01

En cuanto a las anomalías (Tabla 3, 4 y 5), también se han encontrado diferencias significativas con respecto al tratamiento. El análisis no paramétrico de Kruskal Wallis no refleja diferencias entre las anomalías simples de pieza intermedia y cola, ni entre anomalías simples y múltiples, se observa que los tratamientos no han influido. Sin embargo, cuando se agrupan las anomalías teniendo en cuenta su implicación en la espermatogénesis (anomalías mayores y menores), si se encuentran diferencias significativas (Tabla 6), concretamente entre el grupo REP y todos los antioxidantes, excepto el NAC. El UBIQ resalta con todos excepto con el RESV.

GRUPO	Anormales	
	% Anomalías simples	% Anomalías múltiples
REP	91,15±1,14	8,85±1,14
C-NAT	89,03±1,40	10,96±0,01
NAC	88,64±1,26	11,38±1,26
RESV	88,16±1,41	11,84±0,01
UBIQ	88,69±1,35	11,31±1,35

Tabla 3. Espermatozoides con morfología anormal; porcentaje de espermatozoides con anomalías simples y porcentaje con anomalías múltiples en los seis lotes de estudio. Los valores están expresados en media±EEM. REP=Reposo; C-NAT=Control de natación; NAC= N-Acetilcisteína; RESV=Resveratrol; UBIQ=Ubiquinol. Cada grupo n= 15.

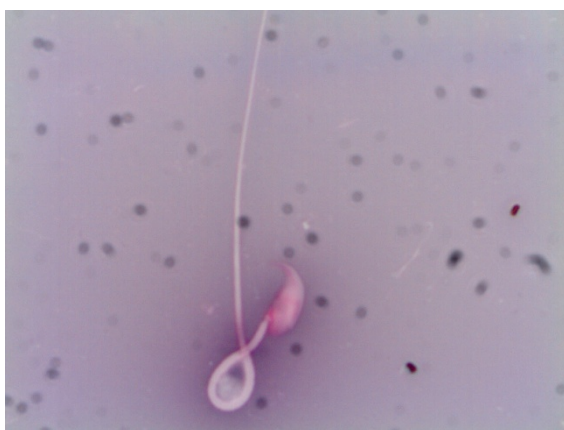


Fig. 3. Anomalía simple; PI doblada.



Fig.4. Anomalía múltiple; PI doblada + cola lazo.

GRUPO	Anormales	
	% Anomalías mayores (Cabeza + PI)	% Anomalías menores (cola)
REP	56,16±3,44	34,99±4,01
C-NAT	52,35±2,71	36,68±2,94
NAC	52,59±3,02	36,05±3,56
RESV	45,51±3,45	42,65±3,47
UBIQ	36,48±2,58	52,20±3,49

Tabla 4. Espermatozoides con morfología anormal; porcentaje de espermatozoides con anomalías mayores y porcentaje con anomalías menores en los seis lotes de estudio. Los valores están expresados en media±EEM. REP=Reposo; C-NAT=Control de natación; NAC= N-Acetilcisteína; RESV=Trans-resveratrol; UBIQ=Ubiquinol. Cada grupo n= 15.

GRUPO	Anormales			
	% Cabeza	% PI	% Cola	% Múltiples
REP	6,77±1,04	49,39±3,89	34,99±4,01	8,85±1,14
C-NAT	4,66±0,55	47,70±2,78	36,68±2,94	10,96±1,40
NAC	2,90±0,76	49,69±3,17	36,05±3,56	11,38±1,26
RESV	0,62±0,48	44,89±3,58	42,65±3,47	11,84±1,41
UBIQ	1,13±0,48	35,36±2,47	52,20±3,49	11,31±1,35

Tabla 5. Espermatozoides con morfología anormal; porcentaje de espermatozoides con anomalías en simples (cabeza, PI o pieza intermedia y cola) y múltiples. Los valores están expresados en media±EEM. REP=Reposo; C-NAT=Control de natación; NAC=N-Acetilcisteína; RESV=Trans-resveratrol; UBIQ=Ubiquinol. Cada grupo n= 15.

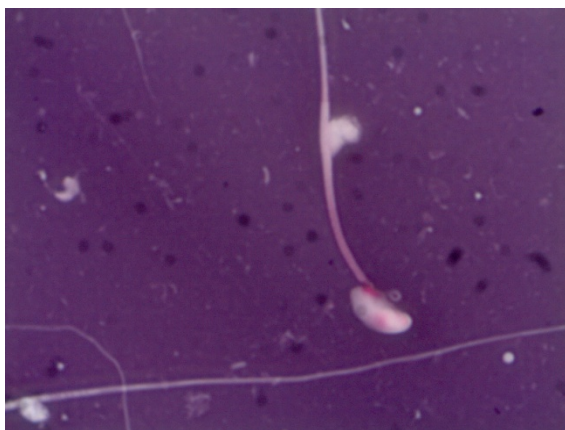


Fig. 5. Anomalía de cabeza; cabeza maza.



Fig. 6. Anomalías de PI; PI doblada y PI engrosada.

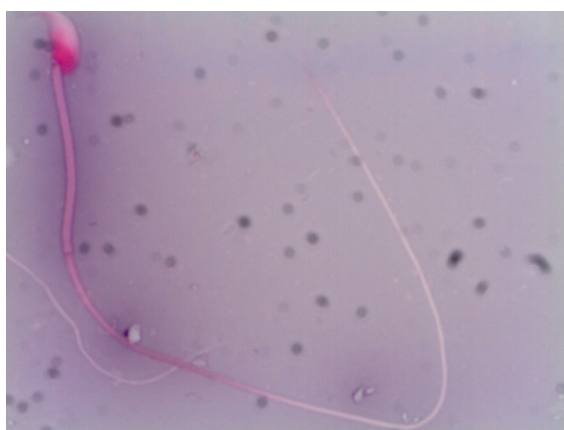


Fig. 7. Anomalía de cola; cola gancho.



Fig. 8. Anomalía múltiple; PI doblada + cola lazo.

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,34	p<0,24	p<0,04*	p<0,0004**
C-NAT	p<0,34		p<0,98	p<0,11	p<0,0005**
NAC	p<0,24	p<0,98		p<0,10	p<0,0009**
RESV	p<0,04*	p<0,11	p<0,10		p<0,07
UBIQ	p<0,0004**	p<0,0005**	p<0,0009**	p<0,07	

Tabla 6. Nivel de significancia de la comparación de anomalías mayores (Cabeza + PI) según el tratamiento (T de Wilcoxon).

*=p<0,05; **=p<0,01.

En las anomalías de cabeza (Tabla 4) todos los antioxidantes presentan diferencias significativas en comparación con los grupos REP y C-NAT, reduciendo dichos porcentajes. Entre tratamientos el test de Kruskal Wallis muestra que solo hay diferencias significativas entre el RESV y el NAC, en cuanto a esta variable (Tabla 7).

El test de Kruskal Wallis muestra diferencias significativas en la comparación del porcentaje de espermatozoides con anomalías simples y el tratamiento, al realizar el test de Wilcoxon se observan diferencias entre grupos de tratamiento (Tablas 8 y 9).

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,20	p<0,011*	p<0,00001**	p<0,00005**
C-NAT	p<0,20		p<0,11	p<0,00003**	p<0,0003**
NAC	p<0,011*	p<0,11		p<0,006**	p<0,07
RESV	p<0,00001**	p<0,00003**	p<0,006**		p<0,21
UBIQ	p<0,00005**	p<0,0003	p<0,07	p<0,21	

Tabla 7. Nivel de significancia de la comparación de anomalías simples de cabeza según el tratamiento (T de Wilcoxon).

*=p<0,05; **=p<0,01.

Tanto en las anomalías de pieza intermedia (Tabla 8), como en las de cola (o anomalías menores) (Tabla 9), el único antioxidante de los utilizados que muestra diferencias significativas es el Ubiquinol.

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,61	p<0,86	p<0,38	p<0,0101*
C-NAT	p<0,61		p<0,88	p<0,45	p<0,004**
NAC	p<0,86	p<0,88		p<0,28	p<0,002**
RESV	p<0,38	p<0,45	p<0,28		p<0,056
UBIQ	p<0,0101*	p<0,004**	p<0,002**	p<0,056	

Tabla 8. Nivel de significancia de la comparación de anomalías simples de PI (pieza intermedia) según el tratamiento (T de Wilcoxon).

*=p<0,05; **=p<0,01.

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,58	p<0,80	p<0,11	p<0,004**
C-NAT	p<0,58		p<0,67	p<0,19	p<0,0101*
NAC	p<0,80	p<0,67		p<0,21	p<0,002**
RESV	p<0,11	p<0,19	p<0,21		p<0,08
UBIQ	p<0,004**	p<0,0101*	p<0,002**	p<0,08	

Tabla 9. Nivel de significancia de la comparación de anomalías simples de cola (o anomalías menores) según el tratamiento (T de Wilcoxon).

*=p<0,05; **=p<0,01.

b) Vitalidad de los espermatozoides (Vivos/Muertos):

Todos los antioxidantes superan ampliamente las medias del porcentaje de vivos de los grupos REP y C-NAT (Tabla 10). Además muestran diferencias significativas en la mejora de la vitalidad con respecto a estos dos grupos (Tabla 11). En la comparación entre los antioxidantes, el RESV y el UBIQ mejoran este parámetro con respecto al NAC (Tabla 11).

GRUPO	% Vivos	% Muertos
REP	35,87±3,21	64,13±3,21
C-NAT	43,97±4,27	56,03±4,27
NAC	75,63±2,08	24,37±2,08
RESV	84,47±1,81	15,53±1,81
UBIQ	87,73±0,75	12,27±0,75

Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Los valores están expresados en media±EEM. REP=Reposo; C-NAT=Control de natación; NAC= N-Acetilcisteína; RESV=Trans-resveratrol; UBIQ=Ubiquinol. Cada grupo n= 15.



Fig. 9. Espermatozoide vivo (arriba) y espermatozoide muerto (abajo).

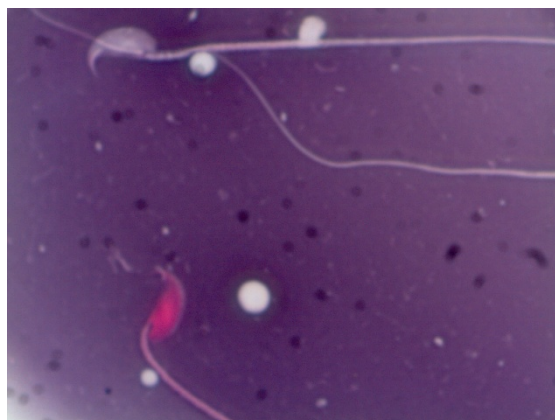


Fig. 10. Espermatozoide vivo (arriba) y espermatozoide muerto (abajo).

El test de Kruskal Wallis muestra diferencias significativas en la comparación del porcentaje de espermatozoides vivos y el tratamiento, al realizar el test de Wilcoxon se observan diferencias entre grupos de tratamiento (Tabla 11).

	REP	C-NAT	NAC	RESV	UBI
REP		p<0,25	p<0,000003**	p<0,000003**	p<0,000003**
C-NAT	p<0,25		p<0,00005**	p<0,00004**	p<0,00005**
NAC	p<0,000003**	p<0,00005**		p<0,007**	p<0,0002**
RESV	p<0,000003**	p<0,00004**	p<0,007**		p<0,16
UBIQ	p<0,000003**	p<0,00005**	p<0,0002**	p<0,16	

Tabla 11. Nivel de significancia de la comparación de vitalidad según el tratamiento (T de Wilcoxon).
*=p<0,05; **=p<0,01.

DISCUSIÓN

En este estudio se comprueba, como habíamos demostrado en experiencias anteriores por nuestro grupo de investigación (Vaamonde y col., 2011; Rodríguez y col., 2012), que el modelo de ejercicio de natación forzada empleado (Saki y col., 2009) es eficiente para inducir daño testicular, reflejado en el incremento del porcentaje de espermatozoides con morfología anormal. Este mismo efecto se ha visto en estudios realizados en la especie humana, donde se pone de manifiesto la influencia del entrenamiento intenso en la calidad espermática, ya que ejercicios intensos inducen efectos perjudiciales (Vaamonde y col., 2009). Sin embargo, la actividad física moderada mejora los parámetros seminales comparado con hombres sedentarios (Vaamonde y col., 2012). La espermatogénesis se ve inhibida en respuesta a factores estresantes, el ejercicio supone un factor estresante, pero también se ha visto que la inmovilización y la manipulación inducen estrés (Almeida y col., 2000; Álvarez, 2008; Vaamonde y col., 2011; Rodríguez y col., 2012), lo que puede justificar que los valores del grupo no sometido a ejercicio (REP) obtenidos en este estudio, se encuentren por debajo de los valores espermáticos normales en el ratón CD-1 (Bocanegra-Astivia y Altamiranol-Lozano, 2006).

Aziz y col. (2004) evalúan la relación entre morfología espermática y producción de ROS y observaron que existe correlación negativa entre ambas variables. Así mostraron como los ROS producen un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con cabezas amorfas, daño del acrosoma, gotas citoplasmáticas, pieza intermedia y defectos de cola. Asimismo, Gil-Guzman y col. (2001), mostraron como los ROS producen daños espermáticos durante la migración de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos al epidídimo, donde encontraron gran número de espermatozoides inmaduros con anomalías de cabeza y presencia de gotas citoplasmáticas. El efecto de los ROS sobre los parámetros espermáticos ha sido ampliamente estudiado, y aunque los ROS son necesarios en aspectos críticos de la función espermática, niveles excesivos pueden tener un impacto negativo sobre la calidad espermática (Kefer y col. 2009). Los radicales libres se generan en las

mitocondrias como consecuencia del metabolismo oxidativo (Valko y col., 2007; Guthrie y Wech, 2012). El estrés oxidativo provoca la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas plasmáticas de los espermatozoides (Álvarez y Storey, 1995) y la fragmentación del ADN (Saleh y col., 2002; Sheweita y col., 2005; Agarwal y col., 2008; Aitken y col., 2011). Todo este mecanismo de estrés oxidativo genera espermatozoides anormales (Baker y col., 2003).

Todos los antioxidantes probados en nuestro estudio preservan la función testicular, ya que los porcentajes de espermatozoides normales son significativamente diferentes a los del control natación (C-NAT). En experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación, el NAC empleado a la mitad de dosis que la utilizada en este estudio, también indujo la mejora en el porcentaje de espermatozoides normales (Rodríguez y col., 2012), y el trans-resveratrol a la misma dosis que la utilizada en este estudio, repite su capacidad de revertir el daño testicular que induce el ejercicio intenso (Vaamonde y col., 2011). Con respecto al ubiquinol se observa, un comportamiento similar a los otros dos antioxidantes probados, pero más intenso, ya que es el que más altos porcentajes de espermatozoides normales refleja. En modelos experimentales diferentes, el ubiquinol también ha demostrado su papel protector en el daño testicular producido tras la administración de arsénico en ratas (Fouad y col., 2011) y tras la exposición a campos magnéticos en ratones (Ramadan y col., 2002).

Considerando el tipo de anomalías, observamos al igual que Aziz y col. (2004), que se incrementan de forma significativa las de cabeza, pieza intermedia y cola en los animales sometidos a ejercicio de natación forzada, y dado que las mismas disminuyen en los que reciben la administración de alguno de los antioxidantes empleados, excepto el NAC, es por lo que creemos que este modelo de ejercicio induce el incremento de ROS, y tanto el trans-resveratrol como el ubiquinol, por su efecto antioxidante, hacen que disminuyan los porcentajes de anomalías de cabeza el primero, y de cabeza, pieza intermedia y cola el segundo. Por tanto, en las anomalías de pieza intermedia, que es el compartimento del espermatozoide donde se encuentran las mitocondrias, se observa que el único antioxidante, de los tres que hemos probado, que ejerce efecto significativo sobre la disminución de las mismas es el ubiquinol, y creemos que se puede deber a su mecanismo de acción, ya que actúa transfiriendo electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y en la traslocación de protones a través de la membrana mitocondrial

(Lass y col., 1999), es decir, actúa como transportador redox y antioxidante (Bentinger y col., 2007).

En el mismo sentido, vemos que al agrupar las anomalías de los espermatozoides en mayores (anomalías de cabeza + pieza intermedia) y menores (anomalías de cola), de los tres antioxidantes probados, también es el ubiquinol el que más efecto significativo tiene en la reducción de dichas anomalías, que son las que están más directamente relacionadas con la espermatogénesis.

En el análisis del parámetro de vitalidad (vivos/muertos), se observa que la administración de los antioxidantes utilizados preserva la vitalidad de los espermatozoides, que se ve reducida con el ejercicio. El trans-resveratrol y el ubiquinol superan al NAC en este sentido. A pesar de que la vitalidad que hemos valorado es un parámetro espermático muy subjetivo, en el que influyen diferentes factores, se trata de un resultado novedoso respecto a estudios similares previos a este (Vaamonde y col., 2011; Rodríguez y col., 2012, que según nuestra revisión bibliográfica no se ha valorado previamente en estudios de ratones sometidos a ejercicio.

Por último, este es el primer estudio y la primera publicación de estas características en el que se compara la acción de tres antioxidantes sobre la función testicular y el ejercicio crónico intenso. Los resultados obtenidos indican que por encima de los demás destaca el ubiquinol, siendo el que mayores efectos beneficiosos refleja en preservar la morfología espermática de los ratones CD-1 sometidos a natación forzada.

CONCLUSIONES

El estudio y valoración de los resultados obtenidos nos permite concluir que:

1. El modelo de ejercicio utilizado induce daño testicular expresado por el incremento del porcentaje de anomalías en los espermatozoides de la cola del epidídimo de ratones CD-1.
2. Los tres antioxidantes probados, N-Acetilcisteína, resveratrol y ubiquinol, preservan la función testicular de los ratones CD-1 sometidos a ejercicio de natación forzada, siendo el ubiquinol el que mejores resultados muestra.
3. El ubiquinol es el único antioxidante, de los tres probados en este estudio, que revierte las alteraciones de la pieza intermedia de los espermatozoides, compartimento donde se encuentran las mitocondrias, y creemos que se puede deber a su mecanismo de acción en estas organelas celulares.
4. La administración de los antioxidantes utilizados preserva la vitalidad de los espermatozoides, que se ve reducida con el ejercicio de natación forzada. El trans-resveratrol y el ubiquinol superan al N-Acetilcisteína en este sentido.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la inestimable colaboración de mi compañera Antonia Sánchez de Medina y el apoyo y la paciencia de mi tutora Inmaculada Rodríguez. Agradecer también su trabajo al resto de colaboradores de este grupo de investigación (Alicia Díaz, Diana Vaamonde y Guillermo López), y al profesor Juan Manuel Serrano por su ayuda con el análisis estadístico. Además de agradecer la labor del Servicio Centralizado de Animales de Experimentación (SCAE) y del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) y los Dptos. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología y de Producción Animal de la Universidad de Córdoba. Por último, a la empresa Kaneka por facilitarnos sus productos para realizar este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Makker K and Sharma R (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, 59(1):2-11.
- Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis Gn and Nixon B (2010). New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol*, 189: 99-115.
- Aitken RJ and Curry BJ (2011). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antiox Redox Signal*, 14(3): 367-381.
- Almeida SA, Kempinas WG and Lamano Carvalho TL (2000). Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Braz J Med Biol Res*, 33(9): 1105-1109.
- Álvarez L (2008). Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch Zootec*, 57: 39-59.
- Álvarez JG and Storey BT (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 42(3):334-346.
- Arce JC and De Souza MJ (1993). Exercise and male factor infertility. *Sports Med*, 15(3): 146-169.
- Arce JC, De Souza MJ, Pescatello LS and Luciano AA (1993). Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes. *Fertil Steril*, 59 (2): 398-404.
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ and Agarwal A (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81: 349-354.
- Baker MA, Krutskikh A and Aitken (2003). Biochemical entities involved in reactive oxygen generation by human spermatozoa. *Protoplasma*, 221:145-151.
- Bentinger M, Brismar K and Dallner G (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7S: 41-50.
- Björndahl L, Barratt CL, Fraser LR, Kvist U and Mortimer D (2002). ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Hum Reprod*, 17 (5): 1299-1305.

- Bloomer RJ, Canale RE, McCarthy CG and Farney TM (2012). Impact of Oral Ubiquinol on Blood Oxidative Stress and Exercise Performance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-10.
- Bocanegra-Astivia y Altamirano-Lozano (2006). Toxicología reproductiva inducida por la casiopeína III-IA en ratones macho de la cepa CD-1. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- Clarkson PM and Thompson HS (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, 72: 637-646.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodoma H and Gagnon C (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1):48-54.
- De Souza MJ, Arce JC, Pestcatello LS, Scherzer HS and Luciano AA (1994). Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med*, 15(7): 383-391.
- Di Meo S and Venditti P (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10(1-2):125-140.
- Díaz-Castro J, Guisado R, Kajarabille N, García C, Guisado IM, de Teresa C and Ochoa JJ (2012). Coenzyme Q10 supplementation ameliorates inflammatory signaling and oxidative stress associated with strenuous exercise. *Eur J Nutr*, 51: 791-799.
- Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubryt M, Gordon T and Dyck JRB. Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol*, 590.11: 2783-2799.
- Duarte F, Blaya R, Telöken PE, Becker D, Fernandes M and Rhoden EL. The effects of N-acetylcysteine on spermatogenesis and degree of testicular germ cell apoptosis in an experimental model of varicocele in rats. *Int Urol Nephrol*, 42(3): 603-608.
- Fouad AA, Al-Sultan AI and Yacoubi M (2011). Coenzyme Q10 counteracts testicular injury induced by sodium arsenite in rats. *European Journal of Pharmacology*, 655:91-98.
- Gatson JW, Liu MM, Abdelfattah K, Wigginton JG, Smith S, Wolf S and Minei JP (2013). Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*, 74(2): 470-474.
- Gil-Guzman E, Ollero M, López MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr and Agarwal A (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*, 16(9): 1922-1930.
- Guthrie HD and Welch GR (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78:1700-1708.

- Hackney AC (1996). The male reproductive system and endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 28(2): 180-189.
- HAMPL R, Drábková P, Kandár R and Stêpán J (2012). Impact of oxidative stress on male infertility. *Ceska Gynekol*, 77(3):241-245.
- Hess RA and Renato de Franca L. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Chapter 1. In: Yan Cheng, ed. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. New York, Landes Bioscience; 2008:1-15.
- Howell RL, Donegan CL and Pinkert CA (2003). Mouse embryo yield and viability after euthanasia by CO₂ inhalation or cervical dislocation. *Comp Med*, 53(5): 510-513.
- Huynh K, Kiriazis H, Du X-J and Love JE (2012). Coenzyme Q10 attenuates diastolic dysfunction, cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in the db/db mouse model of tupe 2 diabetes. *Diabetologia*, 55: 1544-1553.
- Ihara H, Shino Y, Morita Y, Kawaguchi E, Hashizume N and Yoshida M (2001). Is skeletal muscle damaged by the oxidative stress following anaerobic exercise?. *J Clin Lab Anal*, 15(5): 239-243.
- Kefer JC, Agarwal A and Sabanegh E (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*, 16(5): 449-457.
- Lass A, Forster MJ and Sohal RS (1999). Effects of coenzyme Q10 and α -Tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial α -Tocopherol by coenzyme Q10.
- Liu GS, Zhang ZS, Yang B and He W (2012). Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice. *Life Sci*, 91 (17-18): 872-877.
- Manna I, Jana K and Samanta PK (2003). Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiol Scand*, 178: 33-40.
- Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM and Boveris A (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Comp Physiol*, 286: 505-411.
- Oksay T, Naziroglu M, Ergün O, Dogan S, Özatik O, Armagan A, Özorak A and Celik Ö (2013). N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. *Andrología*, 45(3):171-177.
- Olas B and Wachwicz B (2005). Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets*, 16(5): 251-260.
- Ourique GM, Finamor IA, Saccol EM, Riffel AP, Pês TS, Gutierrez PB, Baldisserotto B, Pavanato MA and Barreto KP (2013). Resvesratrol improves sperm motility,

- prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod Toxicol*, 37: 31-39.
- Pons- Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnion F, Janny L and Grizard G (2009). Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecol Obstet Fertl*, 37(6): 529-535.
- Ramadan LA, Abd-Allah ARA, Aly HAA and Saad-El-Din AA (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-Carnitine in mice. *Pharmacological Research*, 46(2): 363-370.
- Ranawat P, Khanduja Kl and Pathak CM (2013). Resveratrol –an ingredient of red wine abrogates the reproductive capacity in male mice. *Andrologia*, 1-9.
- Ringholm S, Olesen J, Pedersen JT, Brandt CT, Halling JF, Hellsten Y, Prats C and Pilegaard H (2013). Effect of lifelong resveratrol supplementation and exercise training on skeletal muscle oxidative capacity in aging mice; impact of PGC-1 α . *Exp Gerontol*, 48 (11): 1311-1318.
- Rodríguez I, Díaz A and Vaamonde D (2012). Effect of N-Acetylcysteine administration on sperm morphology of mice submitted to swimming stress. *AERA*, 121.
- Sabe AA, Elmadhun NY, Dalaj RS, Robich MP and Sellke FW (2013). Resveratrol regulates autophagy signaling in chronically ischemic myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, S0022-5223(13)01258-0.
- Saki G, Rahim F and Alizadeh K (2009). Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *J Hum Reprod Sci*, 2: 72-75.
- Saleh RA and Agarwal A (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*, 23: 737–752.
- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM and Agarwal A (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 11:66.
- Sharma RK and Agarwal A (1996). Ole os reactive species in male infertility. *Urology*, 48(6): 835-850.
- Sheweita SA, Tilmisany AM and Al-Sawaf H (2005). Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*, 6(5): 495-501.
- Silva EC, Cajuerio JF, Silva SV, Soares PC and Guerra MM (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8): 1722-1726.

- Sikka SC, Rajasekaran M and Hellstrom WJG (1995). Role of Oxidative Stress and antioxidants in Male Infertility. *Journal of Andrology*, 6: 464-468.
- Sikka SC (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, 1:78-86.
- Sikka SC (2001). Reative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*, 8(7): 851-862.
- Sohet FM, Neyrinck AM, Pachikian BD, de Backer FC, Binels LB, Niklowitz P, Menke T, Cani PD and Delzenne NM (2009). Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochemical Pharmacology*, 78: 1391-1400.
- Sreenivasula Reddy P, Pushpa Rani G, Sainath SB, Menna R and Supriya Ch (2011). Protective effects of N-Acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25: 247-253.
- Temiz a, Baskurt OK, Pekcetin C, Kandemir F and Güre A (2000). Leukocyte activation, oxidant stress and red blood cell properties after acute, exhausting exercise in rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 22(4): 253-259.
- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N and Vaamonde-Lemos R (2012). Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Appl Physiol*, 112: 3267-3273.
- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Cunha-Filho JS and Vaamonde-Lemos R (2009). Sperm morphology normalcy is inversely correlated to cycling kilometers in elite triathletes. *Rev Andal Med Deporte*, 2(2): 43-46.
- Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ and Oehninger SC (2009). Response of semen parameters to three traning modallities.
- Vaamonde D, Da Silva ME, Poblador MS and Lancho JL (2005). Reproductive Profile of Physically Active Men After Exhaustive Endurance Exercise. *Int Sports Med*, 26: 1-10.
- Vaamonde D, Diaz A and Rodriguez I (2011). Preliminary results of trans-resveratrol as an effective protector against exercise-induced morphology abnormalities on mice sperm. *Fertility and Sterility*, 96: 166-167.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44-48.

- Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez and Alcain FJ (2010). Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations. *Expert Opin Investid Drugs*, 19(4):1-20.
- Wang SJ, Bo QY, Zhao XH, Yang X, Chi ZF and Liu XW (2013). Resveratrol pre-treatment reduces early inflammatory responses induced by status epilepticus via mTOR signaling. *Brain Res*, 1492: 122-129.
- Wu RE, Huang WC, Liao CC, Chang YK, Kan NW and Huang CC (2013). Resveratrol protects against physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Molecules*, 18(4): 4689-4702.
- Wyrobek AJ and Bruce WR (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72 (11): 4425-4429.

