

## Antioxidantes en el varón con deseos genésicos: El silencio de los corderos Antioxidants in the male with reproductive desires: The silence of the lambs

Vicente López Villaverde  
Embryocenter. Sevilla

### RESUMEN

El relativamente bajo coste de los multivitamínicos y su aparente bajo riesgo suponen un reclamo terapéutico muy atractivo que han situado al clínico en una posición vulnerable frente a la agresiva e innovadora dinámica de la empresa farmacéutica.

Por eso conviene tener respuestas frente a ciertas preguntas tales como: a) *¿Deberíamos tratar a todos los varones con antioxidantes?* b) *En el caso de indicar un antioxidante, ¿qué requisitos debería cumplir y cuánto tiempo deberían usarse?* y c) *¿Existen efectos negativos derivados de su uso indiscriminado?* Nuestro silencio y falta de juicio crítico en su utilización podrían contribuir aún más a nuestra indefensión.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 37; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras clave:** *Multivitamínicos, antioxidantes, fertilidad*

Aceptado:07/04/2020

Correspondencia:Laura Moreno Ochoa

Vicente López Villaverde

Embryocenter. Sevilla

vicente\_lopez\_villaverde@revistafertilidad.org SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

---

## SUMMARY

The relatively low cost of multivitamins and their apparent low risk represent an attractive therapeutic claim and it experts have become vulnerable to the aggressive and innovative dynamics of pharmaceutical business.

It is necessary to answer questions such as: a) Should all men be treated with antioxidants? b) Which characteristics should have the antioxidant, how long should they be used? c) What are the possible negative effects of indiscriminated use of these drugs?

Our silence and lack of critical judgment in this matter could contribute to our helplessness.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 37; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Keywords:** *Multivitamins, antioxidant, fertility*

## INTRODUCCIÓN

La experiencia se suele entender como una forma de conocimiento o habilidad derivados de la observación, de la participación y de la vivencia de un suceso.

La Real Academia de la Lengua Española la define como práctica prolongada que proporciona conocimiento o habilidad para hacer algo; conocimiento de la vida adquirido por las circunstancias o situaciones vividas, y circunstancia o acontecimiento vivido por una persona.

Así pues, un componente fundamental en la experiencia es el factor tiempo, posiblemente más relevante que el derivado del número de sucesos vividos.

Ser especialista en algo no implica ser experto en aquello, la experiencia no es sólo comprender algo o saber de algo, sino que tiene que ver con lo que no está pautado, con aspectos poco tangibles que involucran la incertidumbre.

En un momento como el actual, que cuenta con protocolos optimizados de estimulación ovárica y manejo embrionario en el laboratorio, la necesidad de mejorar los resultados gestacionales ha dirigido el enfoque terapéutico hacia aspectos menos evidentes como el uso de probióticos para la optimización del microbioma endometrial o el empleo de los antioxidantes para mejorar la capacidad fecundante del espermatozoide. El relativamente bajo coste de los multivitamínicos y su aparente bajo riesgo suponen un atractivo reclamo de uso, tanto para los pacientes como para los profesionales sanitarios.

Pero estas conductas, aparentemente sencillas, han situado al clínico en una posición de especial vulnerabilidad frente a la agresiva e innovadora dinámica de la empresa farmacéutica capaz de hacer crecer exponencialmente el mercado mundial de vitaminas y suplementos en los últimos años.

Se espera que el valor del mercado alcance los 278 000 000 000 \$ para 2024 (Grand View Research 2016) (1).

Nuestro silencio y falta de juicio crítico en su utilización podrían contribuir aún más a nuestra indefensión.

Para conocer la utilidad de los antioxidantes en el varón con deseos genésicos, sería deseable contar con respuestas sólidas frente a preguntas, tales como: a) *¿Deberíamos tratar a todos los varones con antioxidantes?*, b) *En el caso de indicar un antioxidante, ¿qué requisitos debería cumplir y cuánto tiempo deberían usarse?*

En la Revisión Sistemática de la Base de Datos Cochrane de 2014 respecto al uso de los Antioxidantes para la subfertilidad masculina (2) se había concluido, solo con criterios de baja calidad, que el uso de antioxidantes podría ser útil en varones infértiles pero se desconocía su utilidad en varones con semen normal sin infertilidad demostrada. Por eso se esperaba con cierta expectación la nueva actualización.

Por desgracia, los resultados obtenidos en la revisión actual de 2019 (3) vuelven a estar por debajo de las expectativas creadas, y no solo porque los 7 ensayos seleccionados, controlados y aleatorios, hayan seguido siendo de baja calidad, o porque de los 44 estudios clínicos incluidos únicamente 12 hayan informado de las tasas de embarazo clínico (unos resultados que, si bien inicialmente parecían favorables, dejaban de mostrar evidencia de utilidad cuando se retiraron las publicaciones con alto riesgo de sesgo), sino además porque la selección de los 18 antioxidantes estudiados, y sus combinaciones, no representan necesariamente los antioxidantes más idóneos para el tratamiento de la subfertilidad masculina. Al igual que en revisiones anteriores, los antioxidantes incluidos fueron: arginina, carnitinas (L-carnitina, L-acetil carnitina), carotenoides ( $\beta$ -caroteno), coenzima Q10 (CoQ10), cisteínas (etilcisteína y N-acetilcisteína (NAC)), ácido fólico, magnesio, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (ácido alfa-lipoico y ácido docosaheptaenoico (DHA)), resveratrol, selenio (Se), vitamina B, vitamina C, vitamina D con calcio, vitamina E y zinc (Zn).

Unos meses más tarde de la publicación de la Cochrane, en

---

agosto de 2019, otro metanálisis sobre la influencia de la suplementación oral de vitaminas y minerales en la infertilidad masculina (4) fue publicado en *Reproductive BioMedicine Online*.

Mimetizando los resultados de la revisión de la Cochrane de 2019, tras el proceso de selección, solo 7 de los 18 estudios clínicos escogidos reunieron los criterios requeridos de aleatorización y control con placebo y doble ciego y, a semejanza de aquella, los agentes antioxidantes fueron los mismos (Se, Zn, L-carnitina y acetil-L-carnitina, Coenzima Q1, L-arginina, vitamina C, vitamina D, vitamina E y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)).

Como sucediera en la Cochrane, los estudios incluidos en este metanálisis también mostraron una alta heterogeneidad y, en su mayoría, no hubo información de las tasas de embarazo.

La conclusión, una vez más, fue que se necesitan más estudios con cohortes homogéneas más grandes para evaluar el efecto de las vitaminas y minerales en el seminograma.

### Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Desde 1943 (5) las especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido implicadas como una potencial causa de infertilidad masculina. Elevadas concentraciones de ROS se han asociado con infertilidad hasta en un 40 % de hombres (6) y se ha publicado que alrededor del 30 % al 80 % de los casos de subfertilidad por factor masculino se deben a los efectos dañinos del estrés oxidativo (7).

El término “especies reactivas de oxígeno” involucra no sólo a los radicales libres derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno, como el  $H_2O_2$  y el ácido hipocloroso (HOCl) y a las especies reactivas del nitrógeno (RNS) derivadas del óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) expresadas principalmente en macrófagos. La vida media de un radical libre es de tan sólo unos microsegundos, pero las reacciones que causan pueden tener consecuencias negativas.

La generación de ROS puede ser tanto fisiológica como patológica y también tejido-específico, y variar en diferentes circunstancias.

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se basan en atrapar y eliminar las ROS, bloquear la disponibilidad de los prooxidantes (Fe, Cu) y proteger el daño celular generado por agentes internos o externos.

Básicamente existen dos fuentes de agentes antioxidantes: endógena (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) y exógena (dieta), muy útil cuando la primera se satura. Entre los antioxidantes enzimáticos, se encuentran la superóxido

dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas. Entre los no enzimáticos: el glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Co-enzima Q) y melatonina.

El aporte exógeno de dichos antioxidantes resulta irrelevante y se ve minimizado por la biotransformación significativa a lo largo del tracto gastrointestinal.

Aquellos antioxidantes exógenos que ingresan al organismo solo a través de la dieta son: vitaminas-antioxidantes (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocopherol y  $\beta$ caroteno), carotenoides (luteína, zeaxantina y licopeno), polifenoles (flavonoides y no-flavonoides) y otros como los glucosinolatos (ej. isotiocianatos) y compuestos organoazufrados (ej. dialil-disulfido).

Simplificando el proceso, las ROS pueden originarse intracelularmente, fundamentalmente en la mitocondria durante la cadena de transporte de electrones, como el caso del anión superóxido ( $O_2\cdot^-$ ), pero también en la membrana plasmática (sistema NADPH oxidasa) por las enzimas NOX, hallazgo que fue descrito por primera vez en neutrófilos y macrófagos durante la fagocitosis y que contribuye a potenciar la actividad bactericida. Las enzimas NOX generan ROS mediante la oxidación de NADPH intracelular a  $NADP^+$  y la transferencia de electrones a través de membranas para reducir el oxígeno molecular y generar el anión superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) como producto primario. El  $O_2\cdot^-$  es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Éstos, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y al contenido de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los PMN.

La activación del sistema NADPH puede desencadenarse por señales inflamatorias, estímulos vasculares (incluyendo aquellos de los que se sabe que favorecen la resistencia a la insulina) y obesidad (8).

También existen factores exógenos que son fuente de ROS, algunos controlables por el individuo y otros no, como los hábitos tóxicos y la contaminación ambiental.

Los espermatozoides son células especialmente vulnerables al estrés oxidativo porque sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, lo que les hace especialmente vulnerables a la peroxidación de lípidos por los ROS (9) y porque su escaso citoplasma, como consecuencia de su pérdida durante las fases finales de la espermatogénesis, impide que acumulen en él antioxidantes. Si además son inmaduros, la vulnerabilidad resulta aún mayor porque no ha podido eliminar las ROS presentes durante las fases iniciales de la espermatogénesis y acumulan NADPH oxidasa (10).

Por todo esto, los espermatozoides dependen del plasma seminal, que es rico en antioxidantes (11).

Los procesos inflamatorios magnifican el daño espermático ya que provocan una generación de ROS 100 veces superior de lo que se produce en condiciones normales. La próstata y las vesículas seminales son las principales fuentes de leucocitos peroxidasa positivos y macrófagos. La participación de los leucocitos en la inflamación está estrechamente relacionada con la leucocitospermia acompañante (12).

Sin embargo, no todas las actuaciones de las ROS deben contemplarse como deletéreas ya que desempeñan un papel importante en la fisiología espermática, al ser utilizadas por el sistema inmunitario para atacar y eliminar a los patógenos, o en la señalización celular, mediante la movilización de los sistemas de transporte de iones (señalización *redox* o señalización oxidativa). Las ROS también están involucradas en la iniciación de la movilidad del espermatozoide al incrementar la síntesis de AMP cíclico (AMPC) y la fosforilación de proteínas (13) y se requieren niveles fisiológicos de ROS para determinadas funciones espermáticas, tales como la capacitación, maduración e hiperactivación (14). Las ROS, específicamente el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aumen-

tan la fosforilación de la tirosina, que es el mecanismo más probable e indirectamente responsable de la maduración y capacitación espermática, reacción acrosómica y unión del espermatozoide con el ovocito (15).

Llegado este punto de información, mis respuestas a los dos interrogantes planteados al inicio, serían:

**Pregunta a) ¿Deberíamos tratar a todos los varones con antioxidantes?**

**Respuesta: NO, en general.**

SI, cuando se acumulan factores de riesgo derivados de la edad, estilo de vida o influencia medioambiental, o cuando son portadores de patología seminal, infecciones o procesos inflamatorios genitales. En estos casos podríamos actuar minimizando su impacto, pero con la condición de que deben mejorarse los estilos de vida implicados y para eso es imprescindible que en la anamnesis no pasemos por alto el impacto medioambiental en varones aparentemente sanos (Tabla 1) (16).

TABLA 1			
	FUENTES ROS	MECANISMOS	EFFECTOS REPRODUCTIVOS
E X Ó G E N O S	Estrés	↑ Cortisol, Inmunidad TH1	↓ Testosterona, ↑ Apoptosis Leydig
	Calor	↓ Actividad antioxidante, ≠ Mitocondria	≠ Sertoli, ↓ testosterona LH
	Tóxicos ambientales	↑ Inflamatoria, muerte celular	≠ Leydig, Sertoly
	Radiación EM	↓ Actividad antioxidante	↓ Testosterona LH
	Ejercicio excesivo	↑ OX mitocondrial NOX XO	↓ Testosterona FSH, LH
	Obesidad	↑ Leptinas OX mitocondrial	↑ EJE HHO, E2 gonadal
	Dieta proteica.grasa	↓ Actividad antioxidante	↓ Testosterona LH
	Alcohol	↑ C.P. 450 ≠ metales ↓ antioxidante	↑ Apoptosis leydig sertoly ↓ testosterona FSH, LH
	Narcóticos, marihuana	↑ A. inflamatoria, muerte celular	↓ EJE HHO ↓ Testosterona FSH, LH
	Tabaco	↓ O2 NOX	↓ EJE HHO testosterona FSH, LH ≠ Leyding sertoly
	Anabolizantes Esteroides	↑ OX mitocondrial NOX OX ↑ inflamación	≠ Leyding, sertoly ↓ testosterona
ENDÓGENOS	Edad	≠ ↓ Actividad antioxidante mitocondria	↑ lipoperoxidación ↓ receptores LH testosterona
	Infecciones	↑ Macrófagos, inflamación OX mitocondrial	↓ Testosterona ↑ FSH, LH

Los niveles elevados de ROS pueden impactar sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal afectando negativamente a la secreción hipofisaria y suprarrenal. Sabemos que las hormonas sistémicas (FSH, LH, testosterona, E2, PRL) pueden regular la capacidad antioxidante seminal (17, 18) y que existe una relación negativa entre el nivel sérico de testosterona, E2, T4 libre y el daño en el ADN del espermatozoide (19, 20).

Los factores exógenos adversos aumentan la actividad inflamatoria mitocondrial y de las enzimas NOX y la muerte celular, al mismo tiempo que disminuyen la actividad antiinflamatoria. Al final, estos factores pueden causar la peroxidación de lípidos en las células de Leydig, Sertoli y células germinales, disminuyendo la producción de testosterona, dañando las membranas mitocondriales de los espermatozoides y aumentando la proporción de espermatozoides inmaduros (21-23).

En la Tabla 1 se resumen los mecanismos y efectos reproductivos de las fuentes de ROS (24).

*Pregunta b) En el caso de indicar un antioxidante, ¿qué requisitos debería cumplir?*

*¿Cuánto tiempo?*

#### **b1) Requisitos:**

Resulta relevante que la última revisión de la Cochrane no fuera capaz de encontrar ningún antioxidante, ni combinaciones entre ellos, que pudiera tener un efecto beneficioso sobre la fertilidad, mientras que el metanálisis de Buhling (que no incluía ningún estudio diferente a los revisados en la Cochrane) comunicó una mejora significativa en el uso de la coenzima Q10 (200 y 300 mg/día) para oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia, del Selenio (200 µg/día y 100 µg/día) para la oligozoospermia y teratozoospermia y para la combinación de L-carnitina (2 g/día) y acetil-L-carnitina (ALC; 1 g/día) en la astenozoospermia.

En esta revisión también se encontraron ventajas para la asociación entre el zinc (66 mg/día) y ácido fólico (5 mg/día), o para la combinación entre los ácidos grasos poliinsaturados ácido eicosapentaenoico (EPA) 1.12 g/día y ácido docosahexaenoico (DHA) 0.72 g/día.

#### **b2) Tiempo necesario**

Según la Cochrane, la mejoría en los parámetros seminales, cuando la hubo, se observó después de tres a seis meses de tratamiento con antioxidantes, sin embargo, trascurridos 9 meses, este efecto positivo ya no era tan evidente. Posible-

mente esto podría explicarse por un menor cumplimiento del tratamiento, o por el menor compromiso con los factores que influyen en el estilo de vida, tales como el consumo de tabaco y alcohol.

### **REFLEXIONES DESDE LA EXPERIENCIA:**

Ante este panorama confuso podríamos sugerir tres reflexiones:

**a) Que quizá no fuera útil el uso generalizado de antioxidantes sin perfil** y que deberíamos prescribirlos en función de las necesidades individuales derivadas de la patología detectada, es decir, quelar tóxicos ambientales cuando el medio ambiente sea adverso, o proteger la membrana celular cuando se produzcan situaciones de infección/inflamación.

Dado que la fuente de ROS puede ser múltiple, habría que asociar aquellos antioxidantes que completan los mecanismos de protección oxidativa (24) (Tabla 2).

En los casos de edad avanzada o de consumo excesivo de oxígeno (deporte, obesidad), cuando es necesario proteger del exceso de ROS generados en la mitocondria, la L-carnitina tendría su utilidad potenciando la generación de energía, y el glutatión y la CoQ10 a los antioxidantes enzimáticos, igual que el Zn y Se.

En las situaciones que originen mecanismos inflamatorios con afectación a los lípidos de la membrana la elección sería: ácidos Omega 3, indicados por proteger a los fosfolípidos y disminuir las citoquinas proinflamatorias, y Vitamina E, por su capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación.

El flavonoide escina, por su acción venotónica y vasoprotectora y por sus propiedades saponificante, antioxidante, antiedematosa y antiinflamatoria, resulta especialmente indicado en las situaciones de varicocele.

El glutatión, que no ha sido incluido entre los 18 antioxidantes evaluados en la Cochrane, resulta ser un antioxidante endógeno fundamental que ha sido definido como un *agente de defensa contra la toxicidad medioambiental por xenobióticos* debido a su protección frente a los daños causados por drogas, fármacos, contaminantes ambientales y agentes cancerígenos. Posee la capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo y protege de la acción oxidativa de los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Además, el glutatión inhibe la producción de la mayoría de citoquinas inflamatorias, ralentizando el proceso de envejecimiento.

La curcumina aumenta los niveles de glutatión, la vitamina

TABLA 2

	AGENTE	POBLACIÓN	CONCLUSIÓN	n
MI ME	ESCINA	Varicocele	↑ R ↓ tamaño Varicocele	219
MI	Co Q 10	AT	↑ R.-Mov-Morf	55
MI ME	GLUTATION	OAT	↑ Mov-Morf	20
MI ME	GINSEN ROJO	Varicocele	↑ R-Mov-Morf	80
MI	L-CARNITINA	A	↑ R-Mov	86
MI ME	NIGELLA SATIVA	OAT	↑ R-Mov-Morf	68
ME	OMEGA-3	OAT	↑ R-Mov-Morf	211
MI	SELENIO	A	↑ R-Mov-Morf	64
MI ME	ZN+FOLATOS	OAF	↑ R	11
MI ME	MENEVIT*	≠DNA	↑ PR	60
MI ME	VIT C + VIT E	A	S.C. (vit E cochrane PR;NV)	31 (67**)

R: recuento, MOV: movilidad, Morf: morfología, O oligozoospermia, A: astenozoospermia, T: teratozoospermia, PR: pregnancy rate, MI: mitocondria, ME: membrana plasmática

Licopeno, Vit E, Vit C, Zn, Se, A. Fólico, Ajo, \*\*Cochrane Database of Systematic Reviews 2014

C su absorción y el selenio, por ser un componente del sistema glutatión peroxidasa, mantiene estables sus niveles.

La asociación de Zn (favoreciendo la maduración espermática), Se (estabilizando al glutatión) y Vitamina C (impidiendo la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el anión superóxido y el radical hidroxilo) protegen la fragmentación del ADN espermático.

**b) Que las necesidades individuales de antioxidantes sean diferentes** como consecuencia de la modulación epigenética de los factores medioambientales y endógenos por la interacción de las ROS ambientales y los polimorfismos funcionales de los genes antioxidantes endógenos.

Sabemos que los genes NRF2 (factor nuclear eritroide 2), que regulan la expresión de la mayoría de los enzimas antioxidantes, y los polimorfismos funcionales en los genes de NRF2 (SOD, GST, NOS, CAT y GPX), contribuyen potencialmente a las causas genéticas de la infertilidad masculina asociadas con el mayor riesgo de baja calidad seminal, espermática y subfertilidad.

Quienes fumen y sean portadores de polimorfismos NRF2 o GST tendrán mayor riesgo de sufrir alteración espermática, la criopreservación espermática será menos eficaz en los portadores de polimorfismos de GST, el varicocele será

más lesivo en los portadores de GST, el calor influirá más negativamente en los SOD y la fragmentación espermática será superior en los NOS y GPX (25).

**c) La administración de los antioxidantes, posiblemente, no está exenta de riesgos (26, 27).** Se ha documentado que la suplementación con vitamina A aumenta la incidencia de mortalidad por cáncer de pulmón y enfermedad cardiovascular (28) y que los suplementos con vitamina E aumentan la posibilidad de complicaciones cardíacas, cáncer de mama y de próstata (29, 30), sobre todo cuando se asocia con Selenio (31).

Los niveles plasmáticos elevados de L-carnitina incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular (32) y, a largo plazo, el tratamiento con antioxidantes en general puede alterar los niveles de FSH, testosterona e inhibina B (33).

## BIBLIOGRAFÍA

- 1. Grand View Research.** Dietary Supplements Market Analysis By Ingredient (Botanicals, Vitamins, Minerals, Amino Acids, Enzymes), By Product (Tablets, Capsules, Powder, Liquids, Soft Gels, Gel Caps), By Application (Additional Supplement, Medicinal Supplement, Sports Nutrition), By End-Use (Infant, Children, Adults, Pregnant Women, Old-Aged) And Segment Forecasts To 2024. <https://www.grandviewresearch.com> 2016:0-200.)



2. **Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ.** Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 12. Art. No.: CD007411.
3. **Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG.** Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 14;3:CD007411. doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub4
4. **Buhling K, Schumacher A, Eulenburg CZ, Laakmann E.** Influence of oral vitamin and mineral supplementation on male infertility: a meta-analysis and systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2019 Aug;39(2):269-279. Doi
5. **MacLeod J.** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943;138:512-8.
6. **de Lamirande E, Gagnon C.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl 1):15-21
7. **Tremellen K.** Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reproduction Update* 2008;14(3): 243-58.
8. **Atashi F, Modarressi A, Pepper MS.** The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev.* 2015 May 15;24(10):1150-63.)
9. **Jones R, Mann T.** Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1973;184:103-7.)
10. **Shukla, S., et al.,** Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 331(2): p. 476-83
11. **Zini A, de Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993;16:183-8.
12. **Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A. et al.** Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reprod Biol Endocrinol* 16, 87 (2018) doi:10.1186/s12958-018-0406-2).
13. **Arenas-Ríos E.** Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2015,1(7):73-81).
14. **Aitken RJ, Clarkson JS.** Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;81:459-69
15. **Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E.** Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Apr;32(4):509-20. doi: 10.1007/s10815-014-0425-7.)
16. **Darbandi M, Darbandi S, Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D, Henkel R, Sadeghi MR.** Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Sep 11;16(1):87.
17. **Meucci E, Milardi D, Mordente A, Martorana GE, Giacchi E, De Marinis L, et al.** Total antioxidant capacity in patients with varicoceles. *Fertil Steril.* 2003;79:1577-83.
18. **Mancini A, Leone E, Festa R, Grande G, Silvestrini A, Marinis L, et al.** Effects of testosterone on antioxidant systems in male secondary hypogonadism. *J Androl.* 2008;29(6):622-9.
19. **Richthoff J, Spano M, Giwercman Y, Frohm B, Jepson K, Malm J, et al.** The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod.* 2002;17(12):3162-9
20. **Meeker JD, Singh NP, Hauser R.** Serum concentrations of estradiol and free T4 are inversely correlated with sperm DNA damage in men from an infertility clinic. *J Androl.* 2008;29(4):379-88.
21. **Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR.** Aging and the brown Norway rat leydig cell antioxidant defense system. *J Androl.* 2006;27(2):240-7.
22. **Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D.** Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod BioMed Online.* 2003;7(1):65-70.
23. **Agarwal A, Said TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003;9(4):331-45.)
24. **Yao DF, Mills JN.** Male infertility: lifestyle factors and holistic, complementary, and alternative therapies. *Asian J Androl.* 2016 May-Jun;18(3):410-8)
25. **Yu B, Huang Z.** Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int.* 2015;2015:513196
26. **Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A.** Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril.* 2014 Dec;102(6):1518-27
27. **Henkel R, Sandhu IS, Agarwal A.** The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? *Andrologia.* 2019 Feb;51(1):e13162
28. **Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL Jr, Omenn GS, et al.** The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1743-50.
29. **Lawson KA, Wright ME, Subar A, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A, et al.** Multivitamin use and risk of prostate cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:754-64.
30. **Kabat GC, Kim M, Adams-Campbell LL, Caan BJ, Chlebowski RT, Neuhouser ML, et al.** Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women. *WHI Investigators. Am J Clin Nutr* 2009;90:162-9.
31. **Albanes D, Till C, Klein EA, Goodman PJ, Mondul AM, Weinstein SJ, et al.** Plasma tocopherols and risk of prostate cancer in the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Cancer Prev Res (Phila)* 2014;7:886-95.
32. **Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al.** Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19:576-85.
33. **Nematollahi-Mahani SN, Azizollahi GH, Baneshi MR, Safari Z, Azizollahi S.** Effect of folic acid and zinc sulphate on endocrine parameters and seminal antioxidant level after varicocelectomy. *Andrologia.* 2014;46(3):240-5.