

Antioxidantes y fertilidad masculina

Antioxidants for male infertility

Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara

Clínica MARGEN. Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Granada. España

RESUMEN

En la última década, la Medicina Reproductiva ha avanzado de forma considerable en el conocimiento de la fisiología y la fisiopatología espermática, descubriendo otras causas de esterilidad, entre ellas el estrés oxidativo. Aunque se necesita precisar cómo se diagnostica y cuál es el límite que marca lo anómalo, se proyectan interesantes perspectivas de tratamiento en forma de antioxidantes que pudieran hacer reversibles algunas de estas alteraciones.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012, 137-144; 29 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Palabras clave: *infertilidad masculina, estrés oxidativo, antioxidantes*

SUMMARY

In the last decade, the Reproductive Medicine has advanced in the knowledge of the sperm physiology and pathophysiology, discovering other causes of infertility, mainly the effect of the oxidative stress. Although it needs to specify the diagnosis and limit of the normality, interesting perspectives of treatment are projected, especially in form of oral antioxidants, which could make reversible some of these changes.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012, 137-144; 29 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *male infertility, oxidative stress, antioxidants*

Aceptado 21 Marzo 2012

Correspondencia: Maestro Montero, 21, 18004 Granada, Spain. Tlf: (34) 958120206 .

nicomendoza@telefonica.net

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

INTRODUCCIÓN

Descartando las razones sociales -principalmente la edad de la mujer- que influyen en el presente aumento de la esterilidad, se puede afirmar que la principal causa se localiza en la función espermática. El análisis epidemiológico puede confirmar esta tendencia y su afirmación lleva tiempo levantando suspicacias acerca del posible deterioro en la calidad seminal y su relación con el estilo de vida o a la contaminación ambiental. Sin embargo, puede que esa supuesta reducción de la fertilidad masculina obedezca más a criterios metodológicos que al efecto de otros factores, pues la divisoria que marca un semen normal de otro patológico es ciertamente subjetiva y se mantiene en continuo ajuste (1).

¿Ha disminuido la capacidad fértil del varón?

La constatación de que la capacidad fértil del varón estaba disminuyendo en la segunda mitad del siglo XX despertó en su última década las alarmas del mundo científico, fundamentalmente el anglosajón, y pronto los análisis epidemiológicos y los ensayos de laboratorio apuntaron a los contaminantes vertidos al medio ambiente en esos años (2). Respaldaba estas tesis el hecho de que ciertas patologías testiculares relacionadas con la espermatogénesis (hipospadias, criptorquidia o cáncer de testículo) también mostraran esta tendencia. Además, se encontró un paralelismo en la mujer con un aumento en la incidencia de cánceres de mama. Aproximadamente desde ese momento se comienzan a extender y justificar términos como disruptores endocrinos o estrés oxidativo (EO) (3). Sin embargo, la mayoría de los estudios que intentaban verificar este hallazgo solo se habían fijado en la disminución de la densidad seminal (concentración de espermatozoides), incluso aceptando desde el principio que su impacto real sobre la fertilidad era mínimo y pronto surgieron réplicas de otros países donde no se observó esta tendencia (4,5).

Desde la perspectiva actual, en la valoración global de todos estos trabajos observamos una gran heterogeneidad metodológica, no sólo a nivel poblacional sino en otras cuestiones más elementales relacionadas con los parámetros recogidos en el estudio del semen y los valores de normalidad otorgados a cada uno de ellos (6). Paralelamente, tampoco tenemos datos que aseguren el sospechado incremento en el registro de hipospadias o criptorquidias, y solo el cáncer testicular mostró un ligero aumento, limitado a la última década del siglo pasado. ¿Por qué sigue existiendo controversia si se hace difícil seguir sosteniendo la tesis del declive en la fertilidad masculina? (7)

A pesar de no confirmarse una disminución en los registros de los seminogramas, sí que observamos un aumento del número de parejas con problemas de fertilidad y se siguen implicando a los factores relacionados con la contaminación ambiental o el estilo de vida (8). Algunas revisiones y comentarios recientes proponen que ese aumento en la dificultad de concebir obedece más a causas espermáticas que ovocitarias y que el mismo EO que daña a los espermatozoides es también el responsable de las pérdidas reproductivas tempranas y las malformaciones observadas en nuestra especie (3). En este sentido, la hipótesis de que los agentes químicos medioambientales pueden causar un daño en la calidad seminal es una propuesta interesante, pero desconocemos mucho sobre su origen y su manera de actuar (9-16). Además, Como ocurre con otros procesos complejos, los datos actuales apuntan a una predisposición genética para que esos condicionantes ambientales puedan ejercer sus acciones deletéreas (17).

En consecuencia, no deja de ser preocupante que los registros de normalidad hayan menguado en las últimas décadas. Aunque no se ha demostrado una disminución de la calidad seminal, al menos si utilizamos como medida los valores del seminograma estándar, la esterilidad está en aumento y el factor masculino se vislumbra como su principal causa no social. Muchos de los motivos que se argumentan se apoyan en el efecto deletéreo del EO como nueva causa de esterilidad.

Estrés oxidativo y esterilidad masculina

En Biología se habla de EO cuando se produce un desbalance entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y la acción correctora de los antioxidantes presentes en los tejidos y sus secreciones. Los ROS son productos generados en el metabolismo del oxígeno y se caracterizan por presentar un electrón libre que les imprime su poder reactivo. Por su potencia reactiva destacan el radical hidroxilo (OH⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻). Es obvio que el oxígeno, e incluso sus ROS en niveles bajos, son necesarios para las funciones celulares básicas, sin embargo, un exceso de producción de ROS supone un aumento en la disponibilidad de los radicales libres, lo que provoca una reacción en cadena dañando a todas las moléculas celulares, y comoquiera que la presencia normal de ROS en la célula debe mantenerse durante brevísimos instantes de tiempo a dosis mínima, su efecto dañino tiene una relación directamente proporcional a la dosis y al tiempo de exposición.

Al EO que producen los ROS se le ha implicado en la génesis de enfermedades conocidas como la diabetes, la

TABLA 1

Origen del estrés oxidativo

- Idiopático
- Iatrogénico: Quimioterapia, fármacos, centrifugación del semen en el laboratorio
- Estilo de vida: Tabaco, alcohol, dieta, estrés, exceso de ejercicio físico
- Edad mayor de 45 años
- Causas ambientales: Contaminantes, metales pesados
- Infecciones Genitourinarias y sistémicas
- Procesos autoinmunes o inflamatorios: Prostatitis no bacteriana crónica
- Enfermedades testiculares: Criptorquidia, varicocele, torsión testicular
- Enfermedades crónicas: Diabetes, enfermedades renales, hemoglobinopatías, hiperhomocisteína

arteriosclerosis, la enfermedad de Alzheimer o el cáncer y ya se le considera como una entidad propia que altera la capacidad fértil. A grandes rasgos, cabría afirmar que gran parte de las causas que se engloban en el factor masculino proceden de un daño en la función o génesis de los espermatozoides provocados por EO. Tremellen et al lo cuantifican entre un 30 y un 80% (18) y empezamos a descubrir los principales mecanismos que enlazan la EO con la infertilidad: el daño proteico, la peroxidación lipídica, la disfunción de las membranas y la fragmentación del ADN (19-20).

Precisando una idea apuntada, se necesitan pequeñas cantidades de estos radicales en breves instantes de tiempo para cumplir varias etapas de la fisiología espermática, en concreto para la fosforilización de la tirosínquinasa y el aumento de AMPc, antesala de la hipermotilidad, la reacción acrosómica y la capacitación. Pero el espermatozoide necesita un continuo aporte energético y su citoplasma es muy rico en mitocondrias, lo que lo hace muy sensible al exceso de los ROS (21-22).

Existen dos mecanismos que protegen al ADN espermático del daño de los ROS, uno es la compacta configuración de la cromatina y el otro la presencia de determinados antioxidantes naturales. Como los niveles intracelulares de antioxidantes son bajos, es el líquido seminal el que le brinda esta protección. En él se vierten importantes agentes con capacidad de reducir a los ROS, en concreto las enzimas superóxido dismutasas, catalasas y glutatión peróxido reductasas, más otras sustancias no enzimáticas como el glutatión, la taurina, e hipotaurina, la coenzima Q10 y las vitaminas A, C y E (23). También se ha descrito que el ovocito fecundado puede contrarrestarlos siempre que su sistema reparador esté intacto, o sea, que proceda de una mujer joven. Cuando estos sistemas fallan se activan fenómenos de apoptosis y se producen daños más

extensos en los ADN nuclear y mitocondrial. Se ha descrito que esta fragmentación puede incluso inducir mutaciones genéticas y ser transmitidas al embrión, lo que justifica el mayor riesgo de aborto, de malformaciones congénitas o de enfermedades en la descendencia (24-26).

Podemos afirmar entonces que lo que decide si un varón es fértil depende del frágil equilibrio entre la producción de ROS y la acción de los antioxidantes o mecanismos reparadores naturales. Determinados procesos disminuyen esa protección antioxidante natural, instaurando una situación de EO (ver tabla 1) pero en varones que no presentan estas patologías también se ha observado daño por EO (27-29). Por otra parte, el EO es la principal, pero no la única razón para la fragmentación del ADN espermático (30-31)

En resumen, el EO se produce cuando el exceso de ROS no es corregido por los antioxidantes naturales. Se estima que entre un 30 y un 80% de los varones infértiles presentan EO e incluso puede observarse en los que tienen un seminograma normal. La manera en cómo el EO produce esterilidad masculina es doble: bien dañando la movilidad espermática e impidiendo la fecundación del óvulo, o bien fragmentando el ADN, con lo que la alteración genética puede transmitirse al embrión y condicionar su evolución posterior.

Medida del daño espermático del EO.

La posibilidad de que puedan existir daños por el EO se sospecha desde la misma anamnesis y parece útil medirlo en parejas con esterilidad de origen desconocido, abortos de repetición o fallos de las técnicas de reproducción asistida (TRA) y en varones que hayan padecido procesos inflamatorios, varicocele, fiebre, exposición a tóxicos o radiaciones y los de edad superior a 45 años (32). Además, en la tabla 2 se incluyen otros datos de laboratorio que pueden alertarnos de un daño secundario al EO.

TABLA 2

Datos de sospecha de estrés oxidativo (18)

- Disminución de la movilidad espermática
- Teratozoospermia
- Aumento de células redondas (leucocitos)
- Aumento de la viscosidad
- Mala integridad de las membranas con test hipoosmótico
- Fallo de fecundación en FIV clásica
- Disminución de la movilidad espermática después de la incubación del ovocito
- Mal desarrollo embrionario en ausencia de factor femenino (edad elevada o reserva folicular disminuida)

TABLA 3

Métodos de análisis de la fragmentación del ADN espermático

1. Test que miden daño de cadena sencilla
 - COMET, Single Cell Gel Electrophoresis assay
 - CMA, Chromomycin A
 - Hibridación in situ
 - SCD, Sperm Chromatine Dispersion test
 - SCSA, Sperm Chromatine Structure Assay
2. Test que miden daño de cadena doble
 - TUNEL, Tdt mediated dUTP Nick-End Labeling
 - In situ nick translation

En cuanto a la manera en cómo hacerlo, una de las técnicas más extendidas y estandarizadas de medir el daño espermático por el EO es la valoración del grado de fragmentación de su ADN. Uno de los productos de esta fragmentación es el 8-OH-desoxiguanina, considerado como uno de los marcadores más fiables de que existe destrucción de ADN (33). En la tabla 3 se presentan las técnicas más utilizadas.

EO y TRA

La evidencia disponible es incierta, si bien inclinada hacia que se dan peores resultados cuando existe daño espermático por EO (34-40). Disponemos de dos metanálisis publicados en el año 2006: en el americano, los resultados de los ciclos de FIV empeoran cuando el porcentaje de fragmentación supera el 30%, pero no recogen suficiente evidencia para calificar la respuesta en ciclos de ICSI (34). En el trabajo chino, el grado de fragmentación del ADN no era argumento para empeorar los resultados ni de ciclos de FIV ni de ICSI (40). En este último sí se observa un mayor porcentaje de abortos cuando hay daño espermático.

Tratamiento del EO: el uso de antioxidantes

Se han recomendado varias medidas para aliviar el daño que el EO produce en los espermatozoides (18-20):

- Cambios en el estilo de vida: abandonar el tabaco, reducir el consumo de alcohol, mejorar la dieta y perder peso.
- Evitar la exposición a contaminantes ambientales.
- Tratamiento de las infecciones genitourinarias
- Cirugía del varicocele.
- Uso de antiinflamatorios.
- Extracción de los espermatozoides mediante biopsia testicular.
- Evitar maniobras iatrogénicas en el laboratorio de RA (centrifugación, congelación)
- Suplemento de vitaminas y antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias naturales que contrarrestan el efecto de los ROS en el metabolismo celular. Aparte de los que están presentes en el líquido seminal o los que se describen en la (tabla 4), las proteínas blindadoras de

TABLA 4

Antioxidantes con propiedades andrológicas

Antioxidante	Propiedades
Vitamina E (alfa tocoferol)	El mayor antioxidante y el más estudiado, evita la peroxidación lipídica
Vitamina C (ácido ascórbico)	El antioxidante más abundante en el líquido seminal, actúan como cofactor y dador de electrones para numerosas enzimas
Coenzima Q10	Evita la oxidación lipídica de las membranas
Selenio	Forma parte de la enzima glutatión peroxidasa
Zinc	Forma parte de la enzima superóxido dismutasa
L-Carnitina o su forma activa acetilcarnitina	Participa en el metabolismo energético: responsable del transporte de ácidos grasos hacia el interior de las mitocondrias
Vitaminas B6, B9 y B12	Participan en la reparación y síntesis del ADN
L-Arginina	Aminoácido esencial para la síntesis de ADN
Ácidos grasos poliinsaturados (omega 3, 6 y 9)	Evitan la peroxidación lipídica. A dosis altas aumentan la permeabilidad de las membranas

TABLA 5

Dosis de antioxidantes recomendadas (60)

Antioxidante	Propiedades
Vitamina C (mg)	200-1000
Vitamina E alfa tocoferol (mg)	200-1000
Acido fólico (mg)	100-500
Zinc (mg)	20-60
Selenio (µg)	200
L-Carnitina (g)	1-2
L-Acetil Carnitina (g)	0.5-1
Coenzima Q10 (mg)	200

metales como la albúmina, la ceruloplasmina, la ferritina o la transferrina también se comportan como poderosos antioxidantes. En la dieta, proceden sobre todo del consumo de flavonoides, betacarotenos, L carnitina y vitaminas C y E y casi todos ellos se pueden ingerir como suplementos. Disponemos de estudios de observación y ensayos clínicos que han mostrado el poder de los suplementos de antioxidantes en Andrología. La mayoría analiza las ventajas que supone la ingesta de vitamina C, vitamina E, la L-Carnitina o la coenzima Q10 sobre los estándares de la calidad espermática, observándose un estímulo de la movilidad espermática y una protección frente a la fragmentación de su ADN. En otras publicaciones se registran mejorías de la calidad espermática en situaciones especiales como en fumadores, en la reducción de los daños propios de la criopreservación, en la prevención de la maduración prematura y en las TRA (41-51).

Lo que se echa en falta en la mayoría de los diseños de estos estudios es no haberse marcado como objetivo principal el porcentaje de embarazos o de recién nacidos, para lo que, evidentemente se necesitan mayores poblaciones de estudio. Las revisiones sistemáticas publicadas (52-55) confirman esos satisfactorios resultados, pero todas hablan de la dificultad de realizar metaanálisis debido a la heterogeneidad de los trabajos revisados, lo que dice mucho sobre la diversidad de preparados y dosis disponibles para su uso en la clínica. En todas ellas, se ha verificado el aumento de la movilidad y la disminución del daño por EO en varones que tomaron algún tipo de antioxidantes. Otros parámetros del seminograma (concentración o morfología) no se modificaron, pero lo más relevante que observamos en las últimas es el aumento en el porcentaje de embarazos, tanto en los espontáneos como en los conseguidos mediante TRA. Comprometidos por los solventes resultados ob-

tenidos en estas revisiones, reflexionan sus autores que los pocos ensayos analizados donde no se observa mejoría en la movilidad espermática o en el aumento del porcentaje de embarazos pudieran ser debido a la insuficiente dosis o duración de los antioxidantes empleados.

Recientemente la Cochrane ha publicado un meta-análisis con resultados igual de positivos. En él, se analizan 34 ensayos aleatorios sobre un total de 2876 parejas con esterilidad y se prueba el aumento de embarazos y nacimientos a que apuntaban las revisiones previas.⁵⁶ Pero antes de destapar el baúl del entusiasmo, de la lectura de este y de los otros artículos se extraen dos reflexiones fundamentales que deben proyectar la investigación y la aplicación clínica futuras. Una es la falta de una técnica estandarizada que nos mida el daño espermático causado por el EO; la otra hace referencia a las diferencias encontradas entre individuos (e incluso intraindividuales), y las achacadas al propio observador que define el porcentaje de espermatozoides con daño de su ADN. Como las dos limitaciones son de tipo diagnóstico, esperemos que una mejor tecnología nos las perfiló pronto.

Existen otras cuestiones contradictorias que encontramos en algunos de los artículos revisados. En primer lugar las que hacen referencia a su uso *in vitro*, en tanto parece ser que suplementar los medios de laboratorio no se acompaña del mismo beneficio que con la administración oral. Algunos trabajos hablan incluso de un empeoramiento de los resultados de la TRA cuando se suplementan los medios. En la explicación a esta paradoja se argumenta un desequilibrio de la balanza entre ROS y antioxidantes, disminuyendo los ROS necesarios para la descompactación de la cromatina espermática (57-58). En segundo lugar están las dudas sobre la sobredosificación o los efectos secundarios de los antioxidantes administrados por vía oral. Se ha descrito que un exceso de antioxidantes altera la fluidez de la membrana del espermatozoide y lo expone a más ROS (59). Definir cuáles son sus efectos secundarios se nos antoja importante en tanto tenemos constancia de la auto-prescripción y empleo masivo en las sociedades de Occidente (55).

Además, hay otras dudas que se siguen proponiendo con respecto al uso de antioxidantes en sí, esencialmente en relación al quién, al qué y al cuánto. Comoquiera que su eficacia no se ha probado en varones sin daño espermático, no existe razón para su empleo generalizado, aunque no hayan resultado ser dañinos a las dosis recomendadas. Por eso se va cimentando el perfil del usuario en un varón con astenospermia. A partir de ahí se van incluyendo otras indicaciones como las demás alteraciones del seminograma, en fumadores, en los que padezcan o hayan padecido algún proceso testicular, en los que estén expuestos a tóxicos ambientales o al aumento de la temperatura genital, así como

en los casos de esterilidad sin causa o tras fallos con las TRA. En cuanto al tiempo, se propone un mínimo de nueve semanas, aunque se echan en falta investigaciones que delimiten este factor. También es necesario un ajuste de la dosis, y ni disponemos de estudios aleatorios que enfrenten a los diferentes antioxidantes entre sí ni tenemos certeza de que la combinación de ellos pueda tener un efecto aditivo. Un grupo gallego ha publicado un interesante análisis comparativo de dosis y tipos de antioxidantes comercializados en nuestro país (60). En la tabla 5 se recoge su propuesta con las ingesta adecuada diaria para cada uno de ellos. Aunque no hablan de tiempo, sí adelantan que el tratamiento óptimo podría contar con la suma de cada uno de los antioxidantes que han demostrado eficacia a la dosis que ellos recomiendan. Sin duda un interesante desafío para la clínica.

Recientemente, Comhaire y Decleer argumentan que las razones a que parte de los ensayos aleatorios analizados no haya obtenido mejores resultados con el uso de antioxidantes, están en su insuficiente dosis, duración o combinación de ellos. Mucho más interesante, y basándose en los metanálisis de Ross y Showell, hacen un estudio coste efectividad observando un aumento al cuádruple de embarazos y una reducción económica de hasta el 60% usando antioxidantes durante tres meses (61).

Conclusiones

En conclusión, en una gran parte de los varones con alteración de la función espermática y en un elevado número de parejas con esterilidad de causa desconocida, puede que el origen se localice en el daño ocasionado por el EO. En los últimos años se han ido perfilando los mecanismos íntimos que lo producen así como la manera de mejorarlos. Disponemos de datos que sugieren que el uso de antioxidantes mejora los casos de esterilidad por EO. Quedan tres cuestiones pendientes: la evaluación del daño por EO aun requiere de un aparataje sofisticado y caro, el nivel de normalidad no está claramente definido y se necesitan estudios de eficiencia para ajustar tipos, dosis y duración de la terapia con antioxidantes. Verdaderamente grandes retos para la Medicina Reproductiva moderna

BIBLIOGRAFÍA

1. **Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al.** World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231-45.
2. **Carlsen E, Giwerman A, Keiding N, Skakkebaek N.** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305: 609-13.
3. **Joffe M.** What happened to human fertility? *Hum Reprod* 2010; 25: 295-307

4. **Andolz P, Bielsa MA, Vila J.** Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999;14:731-5.
5. **Seo JT, Rha KH, Park YS, Lee MS.** Semen quality over a 10-year period in 22,249 men in Korea. *Int J Androl* 2000; 23:194-8.
6. **Ellekilde Bonde JP.** Semen analysis from an epidemiologic perspective. *Asian J Androl* 2010; 12:91-4.
7. **Merzenich H, Zeeb H, Blettner M.** Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* 2010; 10:24.
8. **Povey AC, Stocks SJ.** Epidemiology and trends in male subfertility. *Hum Fertil (Camb)* 2010; 13:182-8
9. **Sharpe RM, Skakkebaek NE.** Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993 May 29; 341(8857):1392-5.
10. **Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP.** Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007; 165:1372-9.
11. **Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, et al.** Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology* 2006; 17: 450-8
12. **Safe S.** Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health* 2002; 17: 253-62.
13. **Storgaard L, Bonde JP, Olsen J.** Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reprod Toxicol* 2006; 21: 4-15.
14. **López-Teijón M, Elbaile M, Alvarez JG.** Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. *Andrologia* 2008;40:318-28.
15. **Swan SH.** Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl* 2006;29:62-8
16. **Kamel RM.** Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Mar 6;8:21.
17. **Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P.** What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:197-209.
18. **Tremellen K.** Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 243-58.
19. **Makker K, Agarwal A, Sharma R.** Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009;129:357-67
20. **Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A.** Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 2007;33:603-21
21. **Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, et al.** Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 1997; 47 : 468-82.
22. **de Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; 13 : 379-86.
23. **Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H.** Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2005;6:495-501.
24. **Aitken RJ, Krausz C.** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122 : 497-506.
25. **Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B.** New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(198):99-115
26. **Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB.** Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011; 141: 139-50.
27. **Sikka SC.** Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001;8:851-62.
28. **Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS.** Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006; 12 : 630-3.
29. **Saleh RA, Agarwal A.** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23:737-52.
30. **Lewis SE, Aitken RJ.** DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 33-41.
31. **El-Melegy NT, Ali ME.** Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 2011; 37: 495-506.
32. **Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine.** The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril* 2008;90:S178-80.
33. **Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, et al.** DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 288-93.
34. **Evenson D, Wixon R.** Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12: 466-72.
35. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al.** Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004; 19:1409-17.
36. **Miciński P, Pawlicki K, Wielgus E, Bochenek M, Gogol P, Ficek B.** Total reactive antioxidant potential and DNA fragmentation index as fertility sperm parameters. *Reprod Biol* 2011; 11: 135-44.
37. **Alvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL, Evenson DP.** Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81:712-3.
38. **Bungum M, Bungum L, Giwercman A.** Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011; 13:69-75.
39. **Smith R, Vantaman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E** 1996 Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction* 11 1655-1660.
40. **Li Z, Wang L, Cai J, Huang H.** Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006;23(9-10):367-76.
41. **Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J.**

- Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26: 349-53.
42. **Alvarez JG, Storey BT.** Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; 42 : 334-46.
 43. **Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al.** ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005; 20 : 2590-4.
 44. **Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA.** Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17 : 530-7.
 45. **Lewin A, Lavon H.** The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med* 1997; 18 (Suppl): S213-9.
 46. **Wroblewski N, Schill WB, Henkel R.** Metal chelators change the human sperm motility pattern. *Fertil Steril* 2003; 79 (Suppl 3): 1584-9.
 47. **Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ.** Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl* 2005; 26:550-6.
 48. **Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM, Block G, Wyrobek AJ.** The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum Reprod* 2008; 23: 1014-22.
 49. **Lenzi A, Sgro P, Salacone P, et al.** A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004; 81: 1578-84.
 50. **Tarin JJ, Brines J, Cano A.** Antioxidants may protect against infertility. *Hum Reprod* 1998; 13 : 1415-6.
 51. **Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13 : 1240-7.
 52. **Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM.** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8 : 616-27.
 53. **Zhou X, Liu F, Zhai S.** Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16: 383-90.
 54. **Ross C, Morriss A, Khairy M, et al.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 711-23.
 55. **Gharagozloo P, Aitken RJ.** The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011; 26: 1628-40.
 56. **Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ.** Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(1):CD007411.
 57. **Donnelly ET, McClure N, Lewis SE.** Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril* 1999; 72 : 484-95.
 58. **Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G, et al.** Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 418-21.
 59. **Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ.** Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007; 77: 190-201.
 60. **Enriquez AS, Malnar A, Graña M.** Análisis comparativo entre dosis de antioxidantes con efecto positivo en la calidad seminal en los polivitamínicos comercializados en España. *Rev Ib Fert* 2009; 26: 415-20.
 61. **Comhaire F, Decler W.** Quantifying the effectiveness and cost-efficiency of food supplementation with antioxidants for male infertility. *Reprod BioMed Online* 2011; doi:10.1016/j.rbmo.2011.05.009