



Estudio piloto para la determinación de concentraciones del anión superóxido (O_2^-) en semen y su correlación con parámetros de espermatobioscopia

Alfredo Góngora-Rodríguez¹
Jaime Gosálvez⁴
Carolina González-Cortés²
Gabriela Capilla-González²
Lyda Yuliana Parra-Forero³

¹ Especialista en Ginecología y Obstetricia. Biólogo de la Reproducción.

² Química Farmacobióloga.

³ Médica veterinaria.

Centro de Fertilidad Humana en México.

⁴ Doctor en Inmunología, Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

Antecedentes: durante varios años se ha estudiado la incidencia de las especies reactivas de oxígeno en la calidad espermática, se necesita un sinergismo entre éstos para procesos determinantes, como la fecundación y la capacitación espermática.

Objetivo: evaluar la aplicación del equipo Oxisperm® en muestras de eyaculado de pacientes y donadores de un centro de reproducción asistida y correlacionar sus resultados con parámetros de espermatobioscopia básica.

Material y método: estudio observacional y descriptivo, en el que se aplicó el equipo Oxisperm®, basado en la reacción colorimétrica del azul de nitritotetrazolio (NBT), en 100 muestras de eyaculados escogidos al azar de donadores y pacientes de un centro privado de reproducción, se evaluaron según los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (2010). Los datos se analizaron con SPSS 11.0.

Resultados: hubo diferencias significativas ($p < 0.01$). Los niveles de concentración variaron entre las muestras realizadas: N1 34%, N2 36% y N3 30%. Hubo correlación negativa entre la motilidad y la concentración de anión superóxido ($r = -0.465$, $p = 0.0007$).

Conclusiones: el equipo Oxisperm® mostró diferencias en la concentración de anión superóxido y se correlacionó con parámetros relacionados con la calidad del eyaculado. Se necesitan estudios con una población más grande, porque cerca de 64% de las muestras pertenecía a pacientes fértiles sin alteraciones espermáticas evidentes. El equipo Oxisperm® es una prueba rápida y sencilla que puede realizarse en cualquier laboratorio de reproducción asistida.

Palabras clave: anión superóxido, especies reactivas de oxígeno, semen, equipo Oxisperm®.

A pilot study to determine the levels of superoxide anion (O_2^-) in semen and its correlation to spermatobioscopy parameters

ABSTRACT

Background: During several years the incidence of reactive oxygen species (ROS) on sperm quality has been studied; it is necessary a sin-

Recibido: 29 de julio 2014

Aceptado: 18 de septiembre 2014

Correspondencia: Dra. Lyda Yuliana Parra Forero
investigacion@centrodefertilidad.com

Este artículo debe citarse como

Góngora-Rodríguez A, Gosálvez J, González-Cortés C, Capilla-González G, Parra-Forero LY. Estudio piloto para la determinación de concentraciones del anión superóxido (O_2^-) en semen y su correlación con parámetros de espermatobioscopia. Reproducción (México) 2014;7:75-82.

ergism between them to determinant processes, such as fecundation and sperm capacitation.

Objective: To assess the application of Kit Oxisperm® on samples of ejaculation of patients and donors of an assisted reproduction center and to correlate their results with parameters of basic spermatobioscopy.

Material and method: An observational and descriptive study was done in which the Kit Oxisperm® was applied based on the colorimetric reaction of blue of nitritotetrazolio (NBT), on 100 samples from ejaculations chosen randomly from donors and patients from a private center of reproduction, they were evaluated according to the parameters of the World Health Organizations (2010). Data were analyzed with SPSS 11.0.

Results: There were significant differences ($p < 0.01$). Levels of concentrations varied among the samples performed: N1 34%, N2 36% and N3 30%. There was a negative correlation between the motility and level of superoxide anion ($r = -0.465$, $p = 0.0007$).

Conclusions: The Kit Oxisperm® showed differences in the level of superoxide anion and had a correlation with parameters related with the quality of ejaculation. More studies with a bigger population are needed, because near 64% of samples belonged to fertile patients without evident sperm disorders. The Kit Oxisperm® is a quick and simple test that may be done in any laboratory of assisted reproduction.

Key words: superoxide anion, reactive oxygen species, semen, Kit Oxisperm®.

ANTECEDENTES

En la última década se han incrementado los índices de infertilidad en hombres y, por ende, el estudio de las posibles causas con fines de tratamiento y control. Una de las causas más controvertidas y de alta repercusión es el aumento de especies reactivas de oxígeno, que se han estudiado no sólo en el ámbito reproductivo, sino también en enfermedades, como Alzheimer,^{1,2} diabetes^{3,4} y artritis reumatoide,^{5,6} entre otras.⁷

El estrés oxidativo es el desequilibrio del control de la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno, que son especies químicas con un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas,⁸ que reaccionan

con otras moléculas quitándoles electrones para lograr su estabilidad, éstos se encuentran en todos los sistemas biológicos que incluyen membranas celulares y nucleótidos en las cadenas del ADN y ARN.^{9,10} El daño puede ocasionar la muerte celular o generar daños irreversibles eliminando receptores de membrana importantes para el buen funcionamiento celular.¹¹

Los agentes antioxidantes son sustancias que previenen o demoran el daño causado por especies reactivas de oxígeno, por sus características químicas se dividen en dos grandes grupos: las enzimáticas donde se encuentra la superóxido dismutasa que elimina el anión superóxido (O_2^-) y está presente de manera activa en la mayor parte de los tejidos.^{12,13} Similar



a ésta se encuentra la catalasa, localizada en el citoplasma,^{14,15} la glutatión peroxidasa^{16,17} y la DT-diaforasa,¹⁸ de difícil evaluación en el espermatozoide debido a la baja cantidad de citoplasma en él. En cuanto al grupo de las no enzimáticas, está el α -tocoferol, β -caroteno, ácido áscórbico^{19,20} y recientemente se ha prestado atención en la adición de minerales como el cinc²¹ y el selenio porque son cofactores de las enzimas mencionadas.^{22,23}

El espermatozoide fue la primera célula en comprobarse que producía especies reactivas de oxígeno,²⁴ más tarde se definió que esta producción era esencial en la ocurrencia de fenómenos como la hiperactivación, la reacción acrosomal y la fusión de membranas para que se de la fecundación.²⁵ Por tener poco citoplasma, la cantidad de antioxidantes es menor que en otras células, por esta razón, es sumamente susceptible a los daños ocasionados por especies reactivas de oxígeno debido a la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados presentes en su membrana. Durante su maduración en el epidídimo los espermatozoides no entran en contacto con los antioxidantes del plasma seminal, dejándolos más vulnerables, por tanto, el plasma seminal podría ayudar a la eliminación de especies reactivas de oxígeno. En el hombre el periodo de licuefacción daría un tiempo prudencial para la protección temporal del espermatozoide antes de su criopreservación, es más, la bibliografía reporta el beneficio de realizar una incubación previa al choque térmico ocasionado por la criopreservación²⁶ y en animales se han reportado buenos resultados al adicionar plasma seminal homólogo al semen descongelado.²⁷

Se han desarrollado numerosas pruebas para la medición directa o indirecta de la cantidad de anión superóxido en las muestras seminales, como el método químico de Marklund y Marklund,²⁸ la quimioluminiscencia,²⁹ la prueba de la inhibición del nitrito,³⁰ la resonancia pa-

ramagnética electrónica,^{31,32} TBARS, usada en lipoperoxidación lipídica en espermatozoides de mamíferos^{33,34} y técnicas con sondas que emiten fluorescencia.^{35,36} Estas pruebas necesitan equipo especializado y reactivos que las hacen inaccesibles a la rutina en un centro de reproducción asistida.³⁷ El equipo Oxisperm® permite la obtención rápida y sencilla de la aproximación del nivel de afectación de la muestra por la cantidad de anión reaccionado.

El objetivo de este artículo es evaluar el paquete Oxisperm® para la determinación de anión superóxido presente en una muestra seminal, correlacionar sus resultados con los parámetros de espermatobioscopia y fragmentación de ADN espermático.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de semen

Estudio observacional y descriptivo, en el que se analizaron 100 muestras de eyaculados de pacientes y donadores, en un centro de fertilidad privado en México, siguiendo las normas de la Organización Mundial de la Salud (2010). Los pacientes se dividieron en cuatro grupos según su diagnóstico: normospermia, oligospermia (conteo espermático menor de $15 \times 10^6/\text{mL}$), astenospermia (espermatozoides con menos de 32% de motilidad progresiva), teratospermia (menos de 4% de los espermatozoides con morfología normal). Todas las muestras se colectaron por masturbación.

Determinación del anión superóxido en semen

El equipo Oxisperm® permite establecer el exceso de aniones superóxido presentes en los espermatozoides de cualquier eyaculado, se basa en la reacción del azul de nitrotetrazolio (NTB) que tiene la capacidad de solubilizar la sal nitrotetrazolio en agua para convertir la ac-

ción de los aniones superóxido reaccionando de manera colorimétrica en función de la concentración de éste, se forma un precipitado de color variable desde ligeramente rosado hasta morado o casi negro, como se muestra en la Figura 1. La intensidad de color se relaciona con la concentración del anión superóxido presente en la muestra.

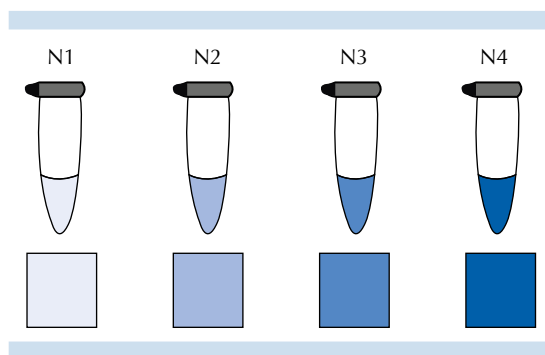


Figura 1. Niveles de coloración del equipo Oxisperm®.

Evaluación de la integridad del ADN

Se utilizó la prueba de dispersión de cromatina SCD Halosperm® para evaluar el daño producido en el ADN espermático, se desnaturaliza la molécula del ADN mediante una solución ácida y otra desproteinizante. Si no generan halo, se considera que el ADN está fragmentado.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete comercial SPSS (versión 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Se realizó el análisis de la variancia (ANOVA), el análisis de correlación se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los resultados de la reacción de Oxisperm® se dividieron según las instrucciones del equipo

en cuatro grupos de acuerdo con la coloración que se obtuvo después de la finalización del protocolo.

La actividad del anión superóxido mostró diferencias significativas en los grupos evaluados ($p < 0.05$) respecto de la diferencia de diagnóstico y resultados de espermato-bioscopia, como se muestra en la Figura 2, donde los pacientes normospermicos sobrepasaron 60% de la población evaluada. Los resultados de la espermato-bioscopia se encuentran en el Cuadro 1, los datos que tuvieron más de una alteración se incluyeron en el grupo con la alteración mayor. Respecto de los resultados de niveles, no hubo diferencias significativas entre diagnóstico, pero sí con la comparación entre el grupo, puede haber más de un nivel por grupo ($p < 0.05$, Figura 3); no obtuvimos ningún resultado con el nivel 4, por lo que no se incluyó en el análisis estadístico.

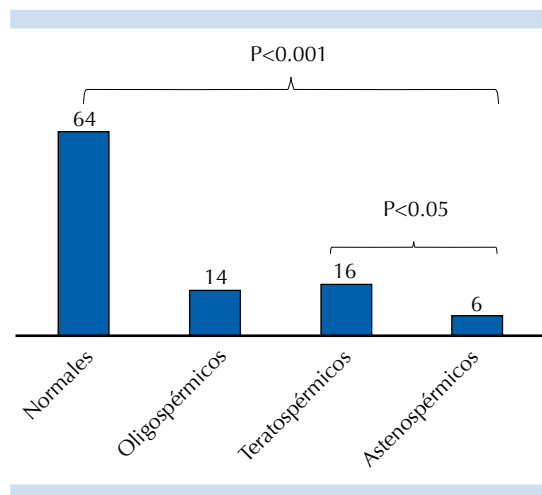


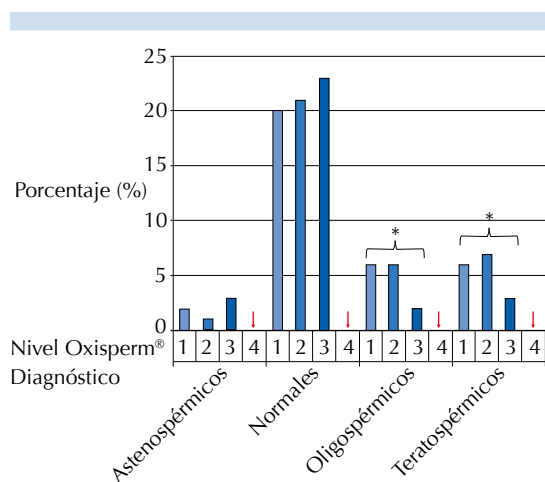
Figura 2. Porcentaje de pacientes evaluados en el estudio con el diagnóstico obtenido después de la espermato-bioscopia.

Pacientes oligospermicos (conteo espermático $< 15 \times 10^6/\text{mL}$), astenospermicos (espermatozoides con menos de 32% de motilidad progresiva), teratospermicos (menos de 4% de los espermatozoides con morfología normal).

**Cuadro 1.** Resultados de la espermatobioscopia por causa de infertilidad

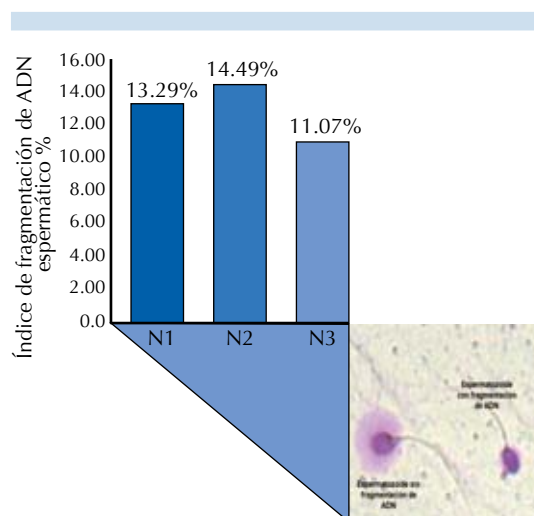
Parámetros de espermatobioscopia	Grupos de diagnóstico			
	Normospermia (m/EEM)	Oligospermia (m/EEM)	Teratospermia (m/EEM)	Astenospermia (m/EEM)
Edad	35.96/0.76	40.0/1.33	38.21/1.26	39.50/3.39
Volumen	2.92/0.16	3.12/0.30	2.75/0.52	2.80/0.64
Motilidad	23.39/1.32	14.73/0.62	2.85/0.17	13.17/3.47
Concentración	115.51/8.42	10.57/1.16	23.74/1.75	35.67/7.82
Morfología normal	4.94/0.20	1.76/0.37	1.94/0.19	35.67/7.82
Morfología de la cabeza	72.89/1.44	67.57/2.62	75.52/1.61	87.5/13.0
Morfología del cuello	12.94/1.41	17.76/2.60	15.06/1.50	29.83/2.39
Morfología del flagelo	7.71/0.98	11.57/2.21	6.29/0.81	34.83/1.58
Morfología de residuos de citoplasma	1.51/0.26	1.33/0.43	1.19/0.32	35.67/2.28

m: media; EEM: error estándar de la media.

**Figura 3.** Niveles de Oxisperm® en pacientes y donadores de espermatozoides

La flecha representa el nivel 4, que no se identificó en ningún grupo y se excluyó del análisis estadístico. * $p < 0.05$.

El índice de fragmentación de ADN espermático se determinó por la técnica de dispersión de cromatina, se realizó el análisis por nivel de ion superóxido reportado en la prueba con Oxisperm®, no mostró diferencias significativas, para el nivel 1 tuvo $13.2 \pm 7.9\%$; nivel 2: $14.4 \pm 10.9\%$ y nivel 3: $11 \pm 6.4\%$. No se encontró correlación importante con los demás parámetros de la espermatobioscopia (Figura 4).

**Figura 4.** Índice de fragmentación de ADN espermático con distinta concentración de ion superóxido en semen.

No hubo diferencias significativas. N1, N2, N3: niveles de evaluación del equipo Oxisperm®.

DISCUSIÓN

El espermatozoide tiene una membrana muy rica en ácidos grasos polinsaturados que son indispensables para que se de el proceso de fertilización; sin embargo, esta propiedad también lo hace vulnerable a sufrir el efecto degradante

de los radicales libres y la peroxidación lipídica que se ha considerado una de las principales casusas de infertilidad en el hombre.

La motilidad espermática está definida por la calidad estructural y funcional de sus mitocondrias; de hecho, se ha catalogado como un excelente marcador de estrés oxidativo, porque las mitocondrias disfuncionales aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno,^{38,39} al estar aumentados en el ambiente espermático incrementan la activación de apoptosis celular, produciendo alteraciones estructurales y funcionales en el espermatozoide que pueden conducir a su muerte.⁴⁰ Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en cuanto a la detección anormal de sustancias oxidantes en el ambiente espermático,^{41,42} pero no de una manera objetiva en la medición de éstos porque las técnicas usadas en la mayor parte de ellos se basan en la transformación enzimática con equipos especiales y la de Oxisperm® hace una aproximación directa de la cantidad de ion superóxido en la muestra analizada.

El índice de fragmentación de ADN espermático se correlaciona con el daño directo al ADN de la muestra analizada; aunque no encontramos diferencias significativas en nuestro estudio, la bibliografía reporta que durante la lipoperoxidación se generan productos altamente mutagénicos y genotóxicos que pueden alterar estructuralmente al ADN, como el 4-hidroxinonenal (HNE).⁴³ Los estudios recientes en ADN se han centrado en la integridad del ADN mitocondrial que, a diferencia del nuclear, su capacidad de reparación es mínima y su estructura carece de protaminas, lo que lo hace más susceptible a mutaciones o eliminaciones que se han identificado como causa de infertilidad y subfertilidad en el hombre.^{44,45} La producción alta de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria hace que ésta cambie su potencia de membrana y su estabilidad celular y, como resultado, disminuyen sustancialmente

sus funciones, entre ellas la motilidad, lo que concuerda con nuestros resultados. También se ha correlacionado el aumento de especies reactivas de oxígeno con alteraciones en la maduración epididimaria, de la composición del axonema del flagelo alterando directamente su estructura y disminuyendo, por ende, el porcentaje de motilidad espermática evaluada.^{46,47}

CONCLUSIONES

El aumento de producción o almacenamiento de especies reactivas de oxígeno en el eyaculado de pacientes y donadores afecta la motilidad espermática; sin embargo, deben realizarse más estudios con una población más grande y relacionarse con otros parámetros de importancia, como la estructura del acrosoma. Oxisperm® es una prueba rápida, muestra de una manera rápida y sencilla distintas concentraciones del anión superóxido, aunque debe cuantificarse la reacción para obtener la concentración total del anión. Se necesitan más estudios para determinar la influencia de estos resultados en una espermátobioscopia, esencial para la determinación del tratamiento que debe administrarse a los pacientes que desean una reproducción autóloga.

REFERENCIAS

1. Dumont M, Flint Beal M. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1014-1026.
2. Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, et al. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease* 2013;4:975.
3. Hur J, Sullivan KA, Schuyler AD, Yu Hong, et al. Literature-based discovery of diabetes- and ROS-related targets. *BMC Med Genomics* 2010;3:49.
4. Graham S, Gorin Y, Abboud HE, Ding M, et al. Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *Am J Physiol-Cell Physiol* 2011;301:304-315.
5. Datta S, Kundu S, Ghosh P, De S, et al. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2014;33:1557-1564.



6. Pizzolla A, Gelderman KA, Hultqvist M, Vestberg M, et al. CD68-expressing cells can prime T cells and initiate autoimmune arthritis in the absence of reactive oxygen species. *Eur J Immunol* 2011;41:403-412.
7. Sugamura K, Keaney Jr JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Rad Biol Med* 2011;51:978-992.
8. Ortega A, Córdova A, Hicks JJ, Olivares-Corichi IM, et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INCI* 2003;28:699-704.
9. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biol Med* 2010;48:749-762.
10. Taha EA, Ezz-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Smoking influence on sperm vitality, DNA fragmentation, reactive oxygen species and zinc in oligoasthenoteratozoospermic men with varicocele. *Andrologia* 2013; 46:687-691.
11. Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 2012;78:1700-1708.
12. de Lamirande Eve, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2:48-54.
13. Garratt M, Bathgate R, de Graaf SP, Brooks RC. Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and *in vivo* fertility. *Reproduction* 2013;146:297-304.
14. Buffone MG, Calamera JC, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil Steril* 2012;97:293-298.
15. Moubasher AE, El Din AME, Ali ME, El-sherif WT, Gaber HD. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 2013;45:135-139.
16. Puglisi R, Maccari I, Pipolo S, Conrad M, et al. The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J Cell Physiol* 2012;227:1420-1427.
17. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2013;1830:3289-3303.
18. Zappa F, Ward T, Pedrinis E, Butler J, McGown A. Cytology & Histology.
19. Gutiérrez Mosquera A, Pino Benítez N, Cuesta Lemos JA. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de varios extractos etanólicos de plantas medicinales. *Revista Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* 2011;30.
20. Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim* 2010;34:79-85.
21. Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S. Protective effects of *in vitro* treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:81.
22. Menezes Y, Evenson D, Cohen M, Dale B. Effect of antioxidants on sperm genetic damage. In: *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Springer, 2014:173-189.
23. Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int J Gen Med* 2011;4:99-104.
24. Tosic J, Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature* 1946;158:485.
25. Donà G, Fiore C, Tibaldi E, Frezzato F, et al. Endogenous reactive oxygen species content and modulation of tyrosine phosphorylation during sperm capacitation. *Int J Androl* 2011;34:411-419.
26. Ben WX, Fu MT, Mao LK, Ming ZW, Xiong WW. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. *Arch Androl* 1997;39:211-216.
27. de Andrade AFC, Gilli Zaffalon F, Carvalho Celeghini EC, Nascimento J, et al. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology* 2012;77:1866-1872.
28. Marklund St, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-474.
29. Marmunti M, Gutiérrez AM, Gavazza M, Williams S, Palacios A. Susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of fresh boar semen obtained from different hog farms. *Revista Veterinaria* 2012;23.
30. Bailly C, Kranner I. Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. In: *Seed Dormancy* 2011;343-367.
31. Hawkins CL, Davies MJ. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:708-721.
32. Ronit L, Ankri R, Sinyakov M, Eichler M, et al. The plasma membrane is involved in the visible light-tissue interaction. *Photomed Laser Surg* 2012;30:14-19.
33. Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, et al. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim* 2011;46:393-403.
34. Gvozdjakova A, Kucharska J, Lipkova J, Bartolcicova B. Importance of the assessment of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and oxidative stress for the diagnosis and therapy of infertility in men. *Bratisl Lek Listy* 2012;114:607-609.
35. Laguerre M, Decker EA, Lecomte J, Villeneuve P. Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2010;13:518-525.

36. Krumova K, Cosa G. Fluorogenic probes for imaging reactive oxygen species. *Photochemistry* 2013;41:279.
37. Aitken RJ, De Luliis GN, Baker MA. Direct methods for the detection of reactive oxygen species in human semen samples. In: *Studies on Men's Health and Fertility*. Springer, 2012:275-299.
47. Nabil A, Tamer S, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction* 2007;22:1413-1419.
38. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:509-517.
39. Urata K, Narahara H, Tanaka Y, Egashira Toru, et al. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. *Fertil Steril* 2001;76:163-166.
40. Koppers AJ, De luliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3199-3207.
41. Plante M, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 1994;62:387-393.
42. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reprod Update* 2004;10:387-399.
43. Henkel R. ROS and semen quality. In: *Studies on Men's Health and Fertility*. Springer, 2012:301-323.
44. Wojciech L, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett* 2003;8:391-413.
45. May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F, Vasseur C, et al. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum Reprod* 2003;18:550-556.
46. El-Taieb M, Herwig R, Nada EA, Greilberger J, Marberger M. Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144:199-203.