



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINAS C Y E  
SOBRE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE TESTÍCULO Y  
EPIDÍDIMO EN CARNEROS**

**Ignacio Andrés Ceppi Matus**

Memoria para optar al Título Profesional de  
Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales

**PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA**

Universidad de Chile

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1130181

SANTIAGO, CHILE



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINAS C Y E  
SOBRE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE TESTÍCULO Y  
EPIDÍDIMO EN CARNEROS**

**Ignacio Andrés Ceppi Matus**

Memoria para optar al Título Profesional de  
Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales

Nota Final .....

Prof. Guía: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ .....

Prof. Corrector: DR. LUIS ALBERTO RAGGI .....

Prof. Corrector: DRA. MÓNICA DE LOS REYES .....

## ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	3
2.	ABSTRACT.....	4
3.	INTRODUCCIÓN .....	5
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
4.1.	Generalidades de la función reproductiva del carnero.....	7
4.2.	Anatomía microscópica del testículo y epidídimo.....	10
4.3.	Estrés oxidativo como causa de subfertilidad/infertilidad.....	12
4.4.	Efectos de la administración de antioxidantes en diferentes funciones o tejidos reproductivos .....	14
5.	HIPÓTESIS .....	16
6.	OBJETIVOS .....	16
6.1.	Objetivo general .....	16
6.2.	Objetivos específicos .....	16
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1.	Localización .....	17
7.2.	Animales .....	17
7.3.	Toma de muestras .....	17
7.4.	Análisis de muestras.....	18
7.5.	Análisis estadístico.....	18
8.	RESULTADOS .....	19
8.1.	Densidad células de Sertoli .....	19
8.2.	Densidad células de Leydig .....	20
8.3.	Altura epitelio seminífero .....	221
8.4.	Altura epitelio epididimario .....	22
9.	DISCUSIÓN .....	23
10.	CONCLUSIÓN.....	26
11.	BIBLIOGRAFÍA .....	27

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Uno de los factores que influye en la capacidad reproductiva y que posee un impacto a nivel testicular, es el desbalance entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes. Se ha visto que la suplementación con antioxidantes no-enzimáticos (vitaminas C y E) permite mejorar el estatus antioxidante endógeno de los machos, previniendo la peroxidación lipídica, el daño celular y otros eventos de daño oxidativo a nivel reproductivo que tienen relación con pérdidas causadas por subfertilidad o infertilidad en sistemas productivos ovinos.

**Objetivos y métodos:** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de vitaminas antioxidantes (C y E) sobre la estructura microscópica de testículo y epidídimo en carneros. Este estudio se realizó en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se utilizaron 20 carneros híbridos de 1 año de edad aproximadamente, los cuales se distribuyeron en dos grupos; un grupo con tratamiento (LLV, n=10) y un grupo control sin tratamiento (LL, n=10). Se suplementó diariamente durante 60 días con vitaminas antioxidantes (600 mg. de vitamina C y 450 U.I. de vitamina E, vía oral). Se tomaron muestras de tejido provenientes de testículo y epidídimo a los 30 y 60 días posterior al inicio de la suplementación vitamínica. En cada tiempo muestral los grupos de muestreo estuvieron formados por 5 animales de cada grupo. Se obtuvieron cortes de 6  $\mu\text{m}$  de grosor, los que fueron procesados mediante procedimientos histológicos estándares de rutina y teñidos con Hematoxilina-Eosina. El estudio histológico se llevó a cabo mediante la obtención y observación de imágenes microscópicas tomadas con un aumento de 100x y 400x para su posterior análisis.f

**Resultados y conclusiones:** Los resultados muestran que la suplementación con vitaminas C y E promueve la proliferación de células de Leydig y de Sertoli en el testículo de carneros suplementados. Por otra parte, la suplementación antioxidante no posee efectos a nivel histológico en el epidídimo. En conclusión, estos efectos a nivel testicular influyen de manera directa sobre un mayor desarrollo de células espermatozógenas en el epitelio germinativo y, en consecuencia, en una mayor capacidad reproductiva y fertilidad potencial de carneros suplementados.

## 2. ABSTRACT

**Background:** One of the main factors that influences the reproductive capacity and that has an impact at a testicular level, is the imbalance between the reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant mechanisms. It has been shown that a supplementation with non-enzymatic antioxidants (vitamins C and E) improves the endogenous antioxidant status, preventing lipid peroxidation, cellular damage and other events of oxidative damage at a reproductive level, which are related with losses caused by subfertility or infertility in sheep production systems.

**Aims and methods:** The aim of this study was to evaluate the effect of antioxidant vitamins (C and E) upon the microscopic structure of testis and epididymis in rams. This study was carried out at the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile. Twenty hybrid rams of 1 year old were used, which were divided into two groups; one treated group (LLV, n=10) and an untreated control group (LL, n=10). The rams of the LLV group were supplemented daily during 60 days with the antioxidant vitamins (600 mg. of vitamin C and 450 IU of vitamin E, orally). Tissue samples from testis and epididymis were taken at 30 and 60 days after beginning the vitamin supplementation. At each sampling time, the sample groups were composed of 5 animals per group. Cuts of 6 microns thick were obtained, which were processed using routine histological methods and stained with hematoxylin-eosin. Histological study was carried out by obtaining and the observation of microscopic images taken with a 40x and 10x magnification for later analysis.

**Results and conclusions:** The results shown that supplementation with antioxidant vitamins (C and E) promotes the proliferation of Leydig and Sertoli cells in the testis of supplemented rams. Moreover, antioxidant supplementation has no effects on a microscopic level in the epididymis. In conclusion, these effects at a testicular level have a direct influence on the further development of spermatogonial cells in the germinal epithelium and, consequently, in a greater reproductive capacity and potential fertility in supplemented rams.

### 3. INTRODUCCIÓN

La eficiencia y el comportamiento reproductivos de los carneros juegan un rol trascendental en la producción ovina. El éxito reproductivo y, por ende, productivo de las explotaciones ovinas, depende de factores como por ejemplo, la edad de los reproductores, el estatus nutricional y sanitario del rebaño, la adecuada selección de la época de encaste, el mejoramiento genético, el diagnóstico temprano de preñez, la adecuada selección de los reemplazos, entre otras. Sin embargo, uno de los factores más importantes a considerar es la adecuada selección de los carneros reproductores, los que deben ser evaluados mediante un examen andrológico completo, en donde se comprende el examen físico del animal, el examen específico del tracto reproductivo y una evaluación completa de la calidad seminal, lo que realizado de forma adecuada permite reducir las pérdidas causadas por subfertilidad e infertilidad (Gimenez y Rodning, 2007).

Uno de los factores que influye en la capacidad reproductiva y que reduce la fertilidad a nivel testicular, es la pérdida del equilibrio que existe entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes que los neutralizan, los que buscan mantener la homeostasis intracelular entre la interacción de las moléculas prooxidantes y las antioxidantes (Agarwal *et al.*, 2014).

En un animal sano, las ROS y los mecanismos antioxidantes debieran permanecer en equilibrio. Cuando este equilibrio se rompe, predominando la generación ROS por sobre los sistemas antioxidantes, se produce un estado de estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2014).

Un adecuado estatus antioxidante se asocia con la viabilidad, integridad de las membranas y motilidad de los espermatozoides, y con la viabilidad y el desarrollo de células reproductivas en diversas especies. El efecto protector de los mecanismos antioxidantes frente al estrés oxidativo se vuelve aún más importante cuando las condiciones higiénicas son deficientes, tal como ocurre frecuentemente en el campo (Luo *et al.*, 2011).

Los antioxidantes son el mecanismo más importante involucrado en la defensa contra la disminución de la fertilidad causada por ROS. Estos antioxidantes actúan captando radicales libres o reduciendo la formación de ROS mediante la interrupción de la reacción oxidativa en cadena, lo que permite disminuir los fenómenos de daño peroxidativo,

protegiendo a la membrana plasmática y al ADN del daño inducido por ROS (Vernet *et al.*, 2004). La suplementación con antioxidantes no-enzimáticos, tales como vitamina E y C, permite neutralizar radicales libres, previniendo el daño oxidativo a nivel celular y la peroxidación lipídica causada por las ROS, preservando la viabilidad de las células reproductivas, la morfología espermática y su motilidad, aumentando su viabilidad y desarrollo y, por ende, su fertilidad (Agarwal *et al.*, 2014).

Dada la importancia de la disminución del daño causado por estrés oxidativo en procesos reproductivos de los ovinos y del aumento en el estatus antioxidante endógeno total mediante la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E (Parraguez *et al.*, 2011) y su impacto a nivel reproductivo, en este estudio se evaluará el efecto de la suplementación y el tiempo de tratamiento con vitamina C y E, sobre características microscópicas de testículo y epidídimo en carneros.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Generalidades de la función reproductiva del carnero**

En un sistema ganadero, la fertilidad del macho incide de manera importante en la capacidad reproductiva del rebaño. La mejora de los índices productivos y reproductivos mediante la disminución de las pérdidas por subfertilidad o infertilidad, juegan un rol preponderante en el desarrollo de estos sistemas. Existe una serie de variables reproductivas cuantificables que permiten evaluar el éxito reproductivo de los machos, sin embargo, la evaluación andrológica específica del sistema reproductor y, específicamente, la evaluación de los testículos y epidídimo es la que posee mayor importancia (Amann y Schanbacher, 1983).

La aparición de los espermatozoides y la activación del comportamiento sexual (conducta de apareamiento) que dan inicio a la pubertad en los carneros, ocurre alrededor de los 5-6 meses de edad. Posterior a esta maduración sexual, el tamaño testicular, la calidad seminal e incluso el crecimiento de la lana se ven afectados por la estacionalidad en adultos sexualmente maduros. Esta estacionalidad está regulada principalmente por el fotoperiodo, sin embargo, la actividad testicular y su función como productor de gametos fértiles no cesa totalmente durante la estación no reproductiva, sino que solo disminuye (Fitzgerald y Morgan, 2007).

Puede considerarse que el testículo posee tres compartimentos funcionales. El compartimento de tejido intersticial, que incluye las células de Leydig, células mioideas, fibroblastos, leucocitos y vasos sanguíneos, rodea a los túbulos seminíferos y los baña con un fluido rico en testosterona. Los otros dos compartimentos están dentro de los túbulos seminíferos y componen el epitelio seminífero, el que se divide funcionalmente en un compartimento basal y un compartimento adluminal. El compartimento basal del túbulo seminífero contiene espermatogonias que se dividen por mitosis, mientras que el compartimento adluminal contiene un entorno aislado especial, donde los espermatocitos experimentan meiosis y las espermátidas se diferencian en espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983).

El testículo posee dos funciones principales: la primera, conocida como función endocrina, tiene relación con la biosíntesis y secreción de andrógenos, tales como testosterona y otras



hormonas, fenómeno conocido como esteroidogénesis. La segunda y no menos importante, se conoce como función exocrina, la que consiste en la producción de espermatozoides a partir de células germinales (espermatogonias), mediante el proceso conocido como espermatogénesis. Estas dos funciones ocurren en las células intersticiales (células de Leydig) y en los túbulos seminíferos, respectivamente, y aunque estén segregadas anatómicamente, existe comunicación intercelular entre ellas (Amann y Schanbacher, 1983).

La espermatogénesis es el proceso que involucra la suma de las transformaciones que resultan en la formación de espermatozoides a partir de espermatogonias, manteniendo el número basal de éstas. El número de células germinales se mantiene gracias a que las espermatogonias tipo-A se dividen por mitosis, generando espermatogonias que no entran en el ciclo productivo de espermatozoides, manteniendo la población de células indiferenciadas (Amann y Schanbacher, 1983). Las espermatogonias que sí entran en el ciclo productivo se dividen por mitosis dando origen a los espermatocitos primarios. Estos espermatocitos primarios posteriormente entran en meiosis originando espermatocitos secundarios, los que gracias a una segunda división meiótica inmediata originan a las espermatidas, las que finalmente se diferencian en espermatozoides, proceso que ocurre de manera cíclica durante toda la vida del individuo (Amann y Schanbacher, 1983). La producción continua de espermatozoides ocurre gracias a que no todas las células germinales inician el ciclo al mismo tiempo, si no que la división celular de los grupos de células de cohorte ocurre cada ciertos días. Junto a lo anterior, la producción de espermatozoides está directamente relacionada con el peso y el tamaño de los testículos, donde particularmente los carneros producen altas cantidades de espermatozoides por gramo de tejido testicular (Fitzgerald y Morgan, 2007).

Luego de completado todo el ciclo de espermatogénesis, finalizando la fase de producción y diferenciación testicular, el espermatozoide que sale del testículo está morfológicamente completo pero no tiene motilidad ni la propiedad para fecundar el ovocito, por lo que los espermatozoides aún inmaduros que se ubican en el compartimento adluminal de los túbulos seminíferos deben dirigirse hacia el epidídimo a través de los conductos eferentes que emergen desde la rete testis (Dacheux y Dacheux, 2014). El compartimiento luminal

almacena los espermatozoides hasta la eyaculación y prepara específicamente el semen para la fertilización, proporcionando los elementos esenciales en términos de temperatura, tensión de oxígeno, pH y un sustrato de energía disponible (Dacheux y Dacheux, 2014).

La secreción de esteroides y la producción de espermatozoides dependen de las acciones separadas de dos gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Sin embargo, ambas requieren de niveles adecuados de testosterona, los cuales son esenciales para la producción normal y la maduración de los espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983).

La espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. En este eje funcional, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida por el hipotálamo estimula la producción de FSH y LH en la glándula hipófisis anterior (Cheng y Mruk, 2010). La FSH regula la función de las células de Sertoli en los testículos, las cuales sostienen el desarrollo de células germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos, mientras que la LH regula la actividad androgénica de las células de Leydig, las que producen y secretan testosterona y estradiol-17 $\beta$  en el intersticio. La FSH actúa principalmente para optimizar la espermatogénesis y para apoyar el desarrollo de células germinales actuando sobre las células de Sertoli. Por otra parte, la testosterona es crucial para la realización de la meiosis y el desarrollo de la espermátida, siendo ambos procesos muy importantes para la fertilidad del individuo (Cheng y Mruk, 2010).

Los espermatozoides que ingresan al epidídimo son infértiles, pero adquieren la capacidad fecundante durante el proceso de maduración dentro del epidídimo. El segmento medio del epidídimo, que se compone de las partes principales de la cabeza y cuerpo, es el sitio de maduración de los espermatozoides. El segmento terminal, esencialmente la cola del epidídimo, junto con el conducto deferente proximal, están implicados en el almacenamiento de espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983). La etapa de maduración de los espermatozoides está fuera del control del epitelio germinal y, por lo tanto, es la consecuencia de sus interacciones con el fluido del epidídimo, sobre todo con las proteínas específicas presentes en el lumen del tubo epididimario (Dacheux y Dacheux, 2014).

Desde la rete testis al conducto deferente, el aumento de la concentración de espermatozoides varía de  $10^8$  a  $10^9$  espermatozoides/mL, con un máximo en la primera porción del epidídimo. Este aumento es el resultado de la resorción de fluido testicular dado por un movimiento significativo de agua que se produce principalmente en el conducto eferente y en el segmento inicial del epidídimo (Dacheux y Dacheux, 2014).

La maduración del espermatozoide es un proceso que implica cambios morfológicos y de su membrana plasmática, la adquisición de la motilidad y capacidad fecundante, la capacidad de reconocer, unirse a la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito, junto con cambios en su metabolismo. Estas diferentes propiedades se adquieren de manera progresiva y simultáneamente mientras los espermatozoides viajan por el epidídimo. Este tránsito en carneros dura alrededor de 13 días (Amann y Schanbacher, 1983).

#### **4.2. Anatomía microscópica del testículo y epidídimo**

A nivel microscópico, el testículo está compuesto por alrededor de 250 compartimentos piramidales conocidos como lobulillos testiculares. Está rodeado por una cápsula fibrosa gruesa de tejido conectivo denso llamada túnica albugínea (TA). La TA está cubierta por el mesotelio de la hoja visceral de la túnica vaginal del testículo. En la superficie interna de la TA, el tejido conectivo denso es sustituido por tejido conectivo laxo con abundantes vasos sanguíneos, conocido como túnica vasculosa del testículo (TV) (Arrotèia *et al.*, 2012; Leeson y Leeson, 1982). Desde la cápsula fibrosa de la TA se desprenden trabéculas de tejido conectivo hacia el interior del parénquima y dividen al testículo en los lobulillos testiculares. Cada lobulillo contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos y a las células intersticiales (de Leydig) entre ellos. Cada túbulo seminífero es muy contorneado y revestido por el epitelio germinativo seminífero, caracterizado por ser estratificado y rodeado por tejido intersticial compuesto por fibras de tejido conectivo laxo que presenta células epitelioides, células intersticiales de Leydig y vasos sanguíneos (Arrotèia *et al.*, 2012; Leeson y Leeson, 1982). El compartimento basal contiene células diploides, espermatogonias tipo A y B, y espermatocitos que se dividen por mitosis. El compartimento adluminal contiene espermatocitos más diferenciados que experimentan meiosis y las espermátidas se diferencian en espermatozoides (Angulo *et al.*, 2011).

Las células de Sertoli son células cilíndricas altas, unidas periféricamente a la lámina basal del túbulo seminífero y proporcionan sostén mecánico y nutricional a las células espermatogénicas, participando también en la liberación de espermatozoides hacia el interior del lumen, proceso conocido como espermiación (Cheng y Mruk, 2010; Leeson y Leeson, 1982). Las células de Sertoli se extienden desde el compartimento basal hasta el compartimento adluminal, separando los dos compartimentos tubulares mediante complejos de unión estrecha (*tight junctions*) entre células de Sertoli vecinas, lo que funciona como el mayor componente de la barrera hematotesticular, permitiendo crear el microambiente químico ideal para finalizar la meiosis y mantener una espermatogénesis normal (Angulo *et al.*, 2011).

Las espermatogonias están ubicadas directamente sobre la lámina basal y poseen un núcleo redondo u ovalado. Por sobre las espermatogonias se ubican los espermatoцитos primarios. Las espermátidas forman una o más capas cerca del interior del conducto y son células más pequeñas. Los espermatoцитos secundarios raramente se observan debido a que se dividen rápidamente para producir espermátidas (Leeson y Leeson, 1982).

Los túbulos seminíferos se continúan en los túbulos rectos, en donde sólo hay células de Sertoli. Los túbulos rectos desembocan en una malla de conductos anastomosados dentro del hilio del testículo (mediastino testicular) llamada rete testis o red de Haler. La rete testis luego se comunica distalmente con el conducto epididimario, mediante 10 a 15 conductillos eferentes dependiendo de la especie (Arrotèia *et al.*, 2012; Leeson y Leeson, 1982).

El epidídimo es un conducto en espiral alargado suspendido en el mesorquio y unido a la túnica albugínea. Se divide en 4 segmentos anatómicos: el segmento inicial, la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo. El espesor del epitelio del epidídimo varía desde la porción más gruesa, ubicada en la región proximal (segmento inicial y cabeza) hasta la región más delgada ubicada en la cola (Arrotèia *et al.*, 2012). Está constituido por un epitelio polarizado, compuesto en su mayoría por células principales, células basales y ocasionalmente por linfocitos y macrófagos intra-epiteliales, con el fin de crear un entorno especial alrededor de los espermatozoides (Dacheux y Dacheux, 2014). El epitelio es pseudoestratificado y presenta una altura uniforme con células basales esparcidas y células cilíndricas altas, mientras que el conducto está rodeado por la lámina basal y una delgada

capa de células de músculo liso (que aumenta hacia el conducto deferente), e incluido en tejido conectivo celular laxo (Leeson y Leeson, 1982).

En la cabeza del epidídimo encontramos un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con microvellosidades o cilios, en donde se distingue la presencia de células principales cilíndricas y células basales piramidales (Orostegui, 1999), con una baja concentración de espermatozoides en el lumen, similar a la de los túbulos seminíferos (Leeson y Leeson, 1982). En el cuerpo del epidídimo encontramos también un tejido pseudoestratificado cilíndrico pero a diferencia de la cabeza, los cilios se han diferenciado en estereocilios. En la cola del epidídimo, en donde se almacenan los espermatozoides esperando el momento de la eyaculación, se encuentra un epitelio pseudoestratificado bajo, no es cilíndrico ni secretor, con una baja cantidad de estereocilios y un lumen muy amplio (Orostegui, 1999).

#### **4.3. Estrés oxidativo como causa de subfertilidad/infertilidad**

La producción de ROS en el semen ocurre como un proceso fisiológico normal. Estudios señalan que a niveles bajos y controlados, las ROS juegan un papel importante para la maduración espermática, tales como la capacitación, hiperactivación, reacción del acrosoma y la fusión espermatozoide-ovocito, con el fin de garantizar la fertilización apropiada. Las principales fuentes de ROS endógenas son los leucocitos (principalmente neutrófilos y macrófagos) y espermatozoides anormales o dañados (Agarwal *et al.*, 2014).

Por otro lado, también es sabido que los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño inducido por ROS en un estado de estrés oxidativo. La susceptibilidad de los espermatozoides está dada debido a que su membrana plasmática contiene altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, su citoplasma contiene una baja concentración de enzimas captadoras de radicales libres y el ADN posee una capacidad limitada para repararse, haciéndolos altamente susceptibles al daño inducido por ROS (Agarwal *et al.*, 2014; Vernet *et al.*, 2004). Sumado a esto, estudios previos señalan que la producción de testosterona se reduce de forma aguda en condiciones asociadas a una alta producción de ROS y a un estado de estrés oxidativo, como por ejemplo, la criptorquidia, el envejecimiento y la lesión por isquemia/reperfusión (Turner y Lysiak, 2008).

Las ROS más importantes son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el ión hidroxilo ( $OH^-$ ) (Turner y Lysiak, 2008). En un estado de estrés oxidativo, las ROS y sus metabolitos pueden atacar el ADN, lípidos y proteínas; alterar los sistemas enzimáticos; producir alteraciones irreparables e incluso afectar parámetros seminales asociados a infertilidad del macho (Agarwal *et al.*, 2014). Las ROS también pueden iniciar una serie de reacciones en cadena que finalmente conducen a la apoptosis, dado que niveles altos de ROS se asocian positivamente con la apoptosis en espermatozoides maduros. Este proceso de apoptosis se ve acelerado por daño en el ADN inducido por ROS lo que conduce a una disminución en el recuento de espermatozoides y, por ende, a una disminución de la fertilidad del individuo (Agarwal *et al.*, 2014).

Sin embargo, el tracto reproductivo, incluyendo el plasma seminal y epididimario, contiene una completa gama de biomoléculas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, que actúan en conjunto para proteger a los espermatozoides contra las ROS. Las enzimas antioxidantes superóxido-dismutasa (SOD), catalasa, glutatión-peroxidasa (GPX) y glutatión-reductasa (GRD) en el semen son parte de la primera línea de defensa contra las ROS (Agarwal *et al.*, 2014). Sumado a esto, el plasma seminal contiene una variedad de antioxidantes no enzimáticos tales como ascorbato (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), urato, piruvato, glutatión, taurina e hipotaurina. Estos antioxidantes se adquieren mediante la ingestión de alimentos que los contengan o mediante una suplementación de ellos. Estudios han demostrado que los antioxidantes protegen a los espermatozoides de la producción de ROS inducida por espermatozoides anormales, neutralizan las ROS producidas por leucocitos, evitan la fragmentación del ADN, mejoran la calidad del semen, reducen el deterioro criogénico de los espermatozoides y bloquean la maduración prematura de los espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2014).

El ácido ascórbico (vitamina C) es capaz de reaccionar con los radicales libres hidrosolubles rompiendo la reacción oxidativa en cadena y, además, posee el potencial de proteger tanto componentes citosólicos, como de membranas celulares del daño oxidativo (Agarwal *et al.*, 2005). El  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) tiene la capacidad de eliminar los radicales hidroperóxidos lipídicos, lo que previene la propagación de los radicales libres en las lipoproteínas plasmáticas y de membrana, y permite romper la cadena de peroxidación

lipídica. Junto con lo mencionado anteriormente, la vitamina E al reaccionar con los radicales peroxilos, forma el radical tocoferilo (Vit. E-O<sup>-</sup>), el cual es reducido por la vitamina C, lo que permite reciclar la vitamina E para que continúe ejerciendo su acción (Traber y Stevens, 2011).

#### **4.4. Efectos de la administración de antioxidantes en diferentes funciones o tejidos reproductivos**

Se ha demostrado que la terapia antioxidante con 500 mg. de vitamina C y 350 U.I. de vitamina E por oveja al día resulta en un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E, alcanzando prácticamente el triple de la concentración de vitamina E y el doble de la concentración de vitamina C en ovejas suplementadas. Esta suplementación resultó ser efectiva en aumentar en el estatus antioxidante endógeno total de los animales suplementados, disminuyendo significativamente los biomarcadores de estrés oxidativo a nivel sanguíneo en ovejas expuestas a la altura (Parraguez *et al.*, 2011).

Angulo *et al.* (2011) señala que una alta concentración de vitamina C a nivel sanguíneo se correlaciona con un aumento en la concentración de espermatozoides en el epidídimo y con un aumento de las concentraciones de testosterona en plasma, lo que indica que la suplementación con vitamina C mejora la calidad del semen. Chinoy *et al.* (1986), demostraron que la vitamina C es esencial para el mantenimiento de la integridad fisiológica de los órganos reproductivos que son objetivo de los andrógenos. Dado que la vitamina C es un cofactor importante para la hidroxilación de colágeno (componente importante de la matriz extracelular), el mal funcionamiento de la interacción célula-célula de la barrera hemato-testicular se traduce en anormalidades durante la espermatogénesis, causando infertilidad. Sumado a lo anterior, el peso de los testículos y de los órganos sexuales accesorios, se ven significativamente disminuidos por algunas sustancias tóxicas y que la administración de vitamina C invierte esta reducción (Angulo *et al.*, 2011).

Se ha observado que el tratamiento con vitamina E ha resultado ser eficaz en el tratamiento de hombres infértiles con altos niveles de ROS, disminuyendo las concentraciones de malondialdehído-MDA-(marcador de la peroxidación lipídica) en el semen hasta niveles normospérmicos, mejorando la motilidad y la probabilidad de lograr el embarazo (Agarwal y Sekhon, 2010).

En un estudio realizado por Luo *et al.* (2011) se demostró que el espesor del epitelio germinal, el diámetro de los túbulos seminíferos y la densidad de células espermatogénicas, células de Sertoli y células de Leydig en carneros suplementados con vitamina E fueron mayores que en el control. Esto sugiere que la suplementación de vitamina E posee un efecto positivo sobre la capacidad reproductiva y en el desarrollo de los testículos.

Estos antecedentes indican que la terapia antioxidante no solo ha mostrado ser eficaz en la prevención de alteraciones de los índices de fertilidad, sino que también en incrementar los índices de calidad y conservación seminal. Esto hace suponer una mejora en las estructuras histológicas de los tejidos que dan origen a los espermatozoides funcionales en animales suplementados con vitaminas antioxidantes.



## **5. HIPÓTESIS**

El incremento del estatus antioxidante endógeno, mejora características histológicas del testículo y epidídimo de los carneros.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Estudiar el efecto de la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E, sobre la estructura microscópica de testículo y epidídimo en carneros.

### **6.2. Objetivos específicos**

- I.** Establecer el efecto sobre la estructura microscópica testicular de la suplementación con vitaminas C y E, durante 30 y 60 días consecutivos en carneros de un año de vida.
- II.** Establecer el efecto sobre la estructura microscópica epididimaria de la suplementación con vitaminas C y E, durante 30 y 60 días consecutivos en carneros de un año de vida.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y del Comité Asesor de Bioética de la Comisión Nacional Científica y Tecnológica (Conicyt).

### **7.1. Localización**

El estudio se realizó en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **7.2. Animales**

Los animales considerados para este estudio correspondieron a 20 carneros híbridos, de aproximadamente 1 año de edad, de características fenotípicas similares entre sí y de semejante peso corporal (50-60 kg.). Los animales se distribuyeron en un grupo tratado con vitaminas antioxidantes (LLV, n=10) y un grupo control sin tratamiento (LL, n=10).

Los animales fueron alimentados con heno de alfalfa y alimento balanceado, de acuerdo a sus requerimientos nutricionales (NRC, 1985) y dispusieron de agua *ad libitum* durante todo el estudio. La suplementación con vitaminas antioxidantes del grupo tratado correspondió a una administración diaria de 600 mg. de vitamina C y 450 U.I. de vitamina E vía oral, desde 30 días previo al inicio del período de toma de muestras hasta la finalización del estudio (60 días totales de tratamiento con vitaminas) (Parraguez *et al.*, 2011).

### **7.3. Toma de muestras**

Se tomaron muestras de tejido provenientes de testículo y epidídimo a los 30 y 60 días posterior al inicio de la suplementación vitamínica, tanto en el grupo tratado como en el grupo control. Los grupos de muestreo estuvieron formados por 5 animales tratados y 5 controles en cada tiempo muestral.

El procedimiento para la obtención de la muestra de testículo y epidídimo fue la hemicastración, realizada bajo sedación con Xilacina vía intramuscular (0,2 mg /kg) y uso de anestesia local con Lidocaína al 2% en la zona de incisión y el cordón espermático mediante la administración de 1 a 2 mL en cada lugar. Luego de la ablación testicular y

epididimaria, cada carnero fue tratado con 12.000 UI de Penicilina G Procaína + 15 mg de Dihidroestreptomicina (Pencidrag®) por Kg. de peso, una vez al día, durante 3 días.

En cada animal, se tomó una muestra de 1 cm<sup>3</sup> de tejido provenientes de la zona ecuatorial del testículo y cola del epidídimo. Las muestras de tejidos fueron fijadas mediante la inmersión en una solución Bouin durante 12 horas e incluidas en parafina. Se obtuvieron cortes de 6 µm de grosor, los cuales fueron procesados mediante procedimientos histológicos estándares de rutina y posteriormente teñidos con Hematoxilina-Eosina.

#### **7.4. Análisis de muestras**

El estudio histológico de testículo y epidídimo se llevó a cabo mediante la observación y obtención de imágenes microscópicas en 6 campos tomados al azar de cada corte de cada estructura reproductiva, tomadas con un aumento de 100x y 400x. Las imágenes fueron analizadas mediante la utilización del software Leica Application Suite v.1.8.0 con el fin de comparar la estructura microscópica de los tejidos, considerando la altura del epitelio seminífero y epididimario, la densidad numérica de células de Sertoli en el epitelio seminífero y densidad numérica de células de Leydig en el tejido intersticial.

#### **7.5. Análisis estadístico**

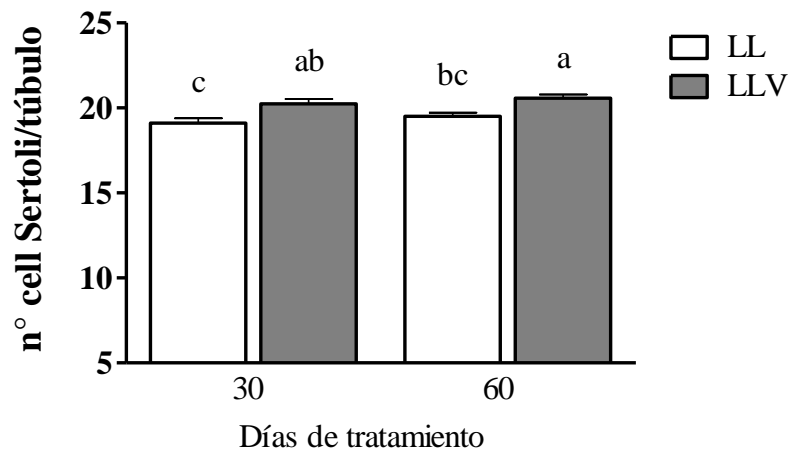
Los resultados se compararon utilizando el análisis de varianza del modelo lineal general (GLM), para establecer los efectos del tratamiento, del tiempo de aplicación del mismo y la interacción entre éstos. Cuando el ANOVA resultó significativo, se realizó la prueba de Duncan para establecer cuáles fueron los grupos distintos. Se consideraron diferencias significativas cuando  $P \leq 0,05$ . Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  SEM.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Densidad células de Sertoli

En la Figura 1 se observa que los grupos de animales suplementados (LLV-30 y 60) registraron los valores más altos, obteniendo un promedio de células de Sertoli/túbulo seminífero de  $20,23 \pm 1,63$  y  $20,56 \pm 1,25$  respectivamente, para ambos tiempos de tratamiento. Por otro lado, los animales de los grupos no suplementados (LL) obtuvieron promedios de  $19,1 \pm 1,6$  y  $19,5 \pm 1,19$  células de Sertoli/túbulo seminífero, respectivamente. Al comparar los resultados se observa un promedio significativamente mayor de células de Sertoli/túbulo seminífero en los grupos LLV con respecto a los grupos LL ( $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, al comparar los resultados para el tiempo de aplicación del tratamiento (30 ó 60 días), se observa que la duración del tratamiento antioxidante no posee efectos sobre el desarrollo de células de Sertoli en el epitelio seminífero ( $P \geq 0,05$ ).

**Figura 1.** Efecto de la suplementación con vitaminas C y E sobre la densidad numérica de células de Sertoli

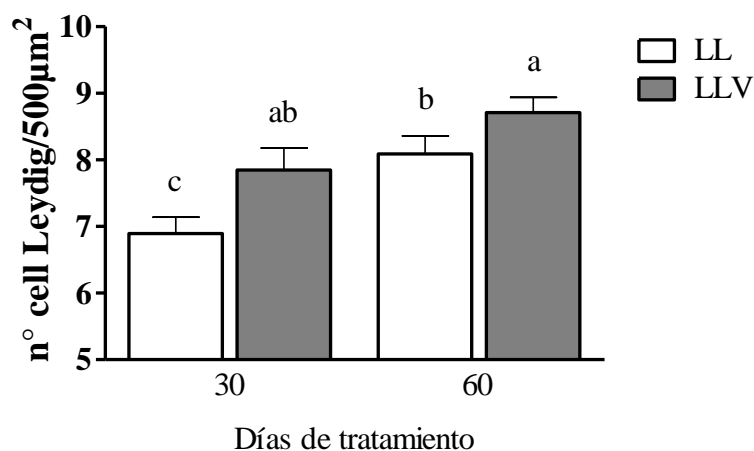


\*Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).

## 8.2. Densidad células de Leydig

En la Figura 2 se observa que los grupos LL-60 y LLV-60 presentaron los promedios más altos con respecto a la densidad de células de Leydig en el intersticio, registrando valores de  $8,09 \pm 1,59$  y  $8,71 \pm 1,35$  células de Leydig/ $500\mu\text{m}^2$  de tejido intersticial, respectivamente, mientras que los grupos LL-30 y LLV-30 obtuvieron los valores más bajos, registrando promedios de  $6,89 \pm 1,45$  y  $7,85 \pm 1,96$  células de Leydig/ $500\mu\text{m}^2$  de tejido intersticial, respectivamente. Al comparar los resultados para el tipo de tratamiento (suplementados v/s no suplementados), se observa que los grupos LLV obtuvieron promedios significativamente mayores de células de Leydig/ $500\mu\text{m}^2$ , con respecto a los grupos LL ( $P \leq 0,05$ ). Por otro lado, al comparar el tiempo de duración de la terapia antioxidante, se observa que los grupos de 60 días de tratamiento presentaron una mayor proliferación de células de Leydig en el intersticio con respecto a los carneros de los grupos de 30 días de tratamiento ( $P \leq 0,05$ ). Este aumento en los promedios de células de Leydig en ambos grupos de 60 días es directamente proporcional y semejante en magnitud, en comparación con los animales de ambos grupos a los 30 días de tratamiento.

**Figura 2.** Efecto de la suplementación con vitaminas C y E sobre la densidad numérica de células de Leydig

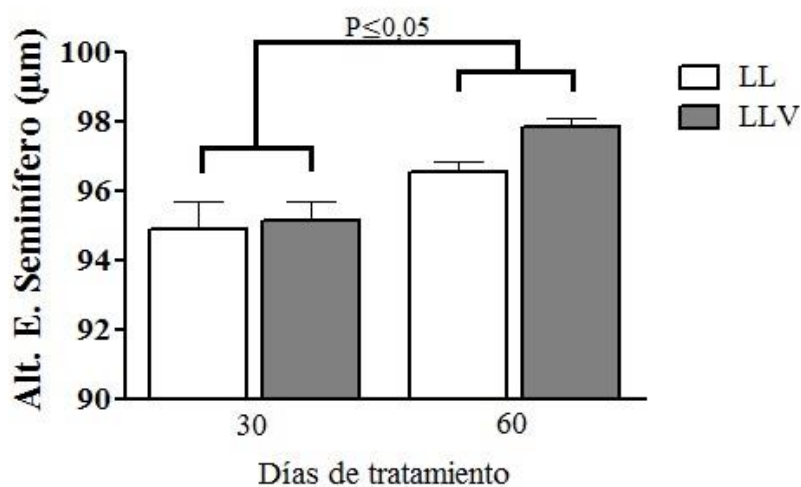


\*Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).

### 8.3. Altura epitelio seminífero

En la Figura 3 se observa que los animales de los grupos de 60 días (LL-60 y LLV-60) obtuvieron los promedios más altos, registrando valores de altura del epitelio seminífero de  $96,52 \pm 1,62 \mu\text{m}$  y  $97,82 \pm 1,34 \mu\text{m}$ , respectivamente, mientras que los grupos de 30 días (LL-30 y LLV-30) registraron promedios de altura del epitelio seminífero de  $94,86 \pm 4,54 \mu\text{m}$  y  $95,12 \pm 3,11 \mu\text{m}$ , respectivamente. Al comparar los resultados, no se observan diferencias significativas para el efecto de las vitaminas ( $P \geq 0,05$ ). Por otro lado, los resultados muestran que el tiempo posee efectos sobre la altura del epitelio seminífero para ambos grupos a los 60 días ( $P \leq 0,05$ ).

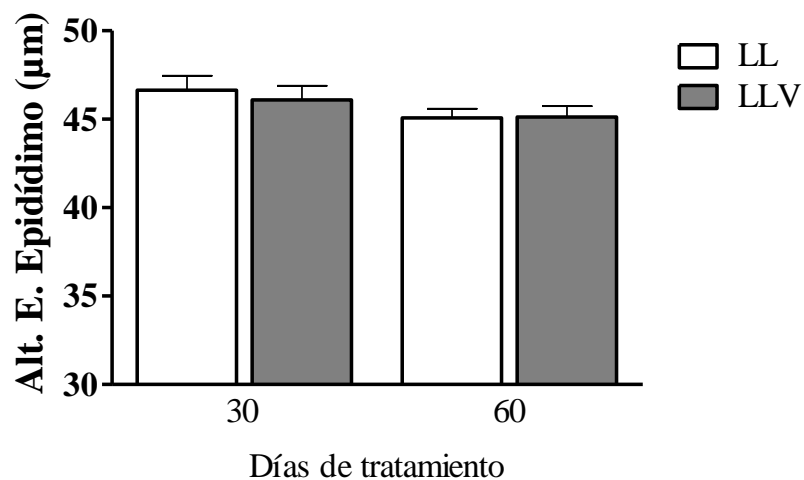
**Figura 3.** Efecto de la suplementación con vitaminas C y E sobre la altura del epitelio seminífero



#### 8.4. Altura epitelio epididimario

Con respecto a la altura del epitelio epididimario, los resultados muestran que los grupos LL (30 y 60) obtuvieron promedios de altura del epitelio epididimario de  $46,64 \pm 4,42$  y  $45,08 \pm 2,61$   $\mu\text{m}$  respectivamente, mientras que los grupos LLV (30 y 60) obtuvieron promedios de  $46,08 \pm 4,39$  y  $45,12 \pm 3,43$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. En la Figura 4 se observa que la altura del epitelio epididimario no presentó variaciones ni por el efecto de las vitaminas ni por el tiempo de tratamiento ( $P \geq 0,05$ ).

**Figura 4.** Efecto de la suplementación con vitaminas C y E sobre la altura del epitelio epididimario



## 9. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el efecto de vitaminas C y E sobre características microscópicas del testículo y epidídimo de carneros jóvenes sometidos durante 30 y 60 días consecutivos al tratamiento con vitaminas antioxidantes.

La densidad de células de Sertoli en el epitelio seminífero de animales suplementados (LLV) fue significativamente mayor en comparación con animales que no fueron suplementados (LL), lo que indica que la suplementación con vitaminas antioxidantes promueve la proliferación de células de Sertoli en los túbulos seminíferos. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Luo *et al.* (2011) quién concluyó que la suplementación con vitamina E posee un rol positivo en la mejora en el desarrollo de los testículos de ovinos de lana fina, ya que promueve el crecimiento de células de Sertoli. Estas células son esenciales para que se lleve a cabo el proceso de espermatogénesis en el epitelio seminífero, ya que son capaces de sostener el desarrollo completo de entre 30 a 50 células germinales simultáneamente. Sumado a lo anterior, un mayor número de células de Sertoli determina un límite superior mayor para el desarrollo de células germinales. Esto tiene como consecuencia eventual una densidad final mayor de espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos, influyendo de manera directa en el desarrollo y maduración posterior de espermatozoides en el epidídimo, conllevando potencialmente a una concentración espermática total mayor en animales suplementados, lo cual indicaría una mejora en la capacidad reproductiva y en el potencial de fertilidad de estos animales.

Con respecto a la densidad de células de Leydig en el intersticio, esta fue significativamente mayor en el grupo LLV con respecto al grupo LL. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Mather *et al.* (1983) quién reportó que la vitamina E puede prolongar la sobrevivencia y función de células de Leydig porcinas cultivadas *in vitro*, lo que se podría relacionar con una mayor densidad y funcionalidad final de células de Leydig en el intersticio de animales suplementados con vitamina E.

Chen *et al.* (2005) declara que las células de Leydig de ratas suplementadas con vitamina E producen niveles significativamente mayores de testosterona que las células de Leydig de animales no suplementados, y es sabido que las células de Leydig son la principal fuente productora de testosterona en machos (Cheng y Mruk, 2010). Por otra parte, Angulo *et al.*



(2011) señala que una alta concentración de vitamina C a nivel sanguíneo se correlaciona con un aumento en las concentraciones de testosterona en plasma. Estos resultados señalados se correlacionan con una mayor densidad de células de Sertoli, ya que una concentración mayor de testosterona a nivel local y sanguíneo otorgada por un mayor número de células de Leydig en el intersticio, permite mantener una mayor funcionalidad y densidad de células de Sertoli y, en consecuencia, permite incrementar consistentemente una serie de funciones en las que se incluyen la transferencia de nutrientes a las células germinativas, la maduración de espermatocitos, la meiosis y la espermiación, lo que en conjunto permite sostener un mayor desarrollo y una maduración óptima de espermatogonias a espermátidas a nivel testicular (Cunningham y Klein, 2007) lo que le confiere una mayor capacidad reproductiva a los animales suplementados con vitaminas C y E.

En cuanto a la altura del epitelio seminífero, los resultados muestran que la suplementación con vitaminas C y E posee un efecto positivo sobre el desarrollo del epitelio seminífero al evidenciar una altura epitelial promedio en animales suplementados, principalmente en el grupo LLV-60, en comparación con los grupos LL. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Soleimani *et al.* (2009), quién señala que el espesor del epitelio seminífero de ratas sometidas al tratamiento con vitamina E fue mayor en comparación con el grupo control.

Una mayor densidad de células de Leydig en conjunto con una mayor proliferación de células de Sertoli en carneros suplementados, permiten inferir que el epitelio germinativo seminífero tiene la facultad de sostener un mayor desarrollo de células espermatogénicas en los túbulos seminíferos en animales suplementados. Por otra parte, este mayor desarrollo de células espermatogénicas en el epitelio germinativo en conjunto con una densidad mayor de células de Sertoli, permiten explicar la altura promedio mayor del epitelio seminífero en animales suplementados con respecto a animales no suplementados, altura la cual, tal como lo señala Luo *et al.* (2011), está determinada por el número de células espermatogénicas y de Sertoli presentes en el epitelio seminífero.

Con respecto a la altura del epitelio epididimario, no se observaron diferencias a nivel microscópico en el epidídimo de animales suplementados en comparación con animales no

suplementados. Sin embargo, mayores concentraciones de testosterona a nivel local y sanguíneo y, por ende, mayores concentraciones a nivel testicular y epididimario, se relacionan con un mayor desarrollo y maduración de espermátidas y espermatozoides, a medida que se producen en el epitelio seminífero y posteriormente, luego del proceso de espermiación se dirigen hacia cola del epidídimo. Por otro lado, existe evidencia de que un adecuado estatus antioxidante a nivel celular de los espermatozoides presentes en el epidídimo otorgada por mayores concentraciones de vitamina E a nivel celular, permiten disminuir eventos de apoptosis, los que se ven acelerados por el daño en el ADN inducido por una mayor producción de ROS a nivel mitocondrial (Agarwal, 2014), lo que permitiría preservar una mayor densidad de espermatozoides maduros y funcionales, aumentando el recuento final y, en consecuencia, incrementando la concentración espermática total y la fertilidad potencial en carneros suplementados.

## **10. CONCLUSIÓN**

La suplementación con vitaminas antioxidantes (C y E) en carneros posee un efecto positivo en la capacidad reproductiva de los animales suplementados ya que favorece un incremento en la densidad de células de Sertoli y de Leydig en los testículos, acompañada de una mayor altura del epitelio seminífero. Lo señalado previamente tiene una relación directa con una mayor fertilidad potencial de los carneros suplementados, ya que en conjunto con mayores niveles de testosterona, influirían directamente al incrementar el umbral en la densidad, el desarrollo y proliferación de células espermatogénicas en el epitelio germinativo y su posterior maduración en el epidídimo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. 2005.** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:28.

**AGARWAL, A.; SEKHON, L. 2010.** The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fert*, December 2010, 13(4):217-225.

**AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. 2014.** Effect of Oxidative Stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 2014 April. 32 (1):1-17.

**AMANN, R.; SCHANBACHER, B. 1983.** Physiology of male reproduction. *Jour Anim Sci* 57: Suppl. 2. pp. 380-403.

**ANGULO, C.; MALDONADO, R.; PULGAR, E.; MANCILLA, H.; CÓRDOVA, A.; VILLARROEL, F.; CASTRO, M.; CONCHA, I. 2011.** Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. *Biol Res* 44:169-180.

**ARROTÉIA, K.; GARCIA, P.; BARBIERI, M.; JUSTINO, M.; PEREIRA, A. 2012.** The Epididymis: Embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. **In:** Pereira, L. (Ed.). *Embryology - Updates and highlights on classic topics.* Rev Embry. Universidad Estatal de Campinas, Brasil. Intech (3):41-66.

**CHEN, H.; LIU, J.; LUO, L.; BAIG, M.; KIM, J.; ZIRKIN, B. 2005.** Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 40:728–736.

**CHENG, Y. C.; MRUK, D. 2010.** A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* (6):380–395.

**CHINOY, N.; MEHTA, R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J.; CHINOY, M 1986.** Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *Int J Fertil* 31:232-239.

**CUNNINGHAM, J.; KLEIN, B. 2007.** Textbook of Veterinary Physiology. Elsevier Incorporated. 4 Ed. Chapter 40 pp:517-525.

**DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. 2014.** New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147:27–42.

**FITZGERALD, J.; MORGAN, G. 2007.** Reproductive Physiology of the Ram. **In:** Youngquist, R.; Threlfall, W. (Eds.). *Current therapy in large animal theriogenology.*

Segunda edición. Ed: Saunders Elsevier. St. Louis, Mo., United States of America. pp. 617-620.

**GIMENEZ, D.; RODNING, S. 2007.** Reproductive management of sheep and goats. The Alabama Cooperative extension system. Alabama A&M University and Auburn University. [en línea]. <<http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1316/ANR-1316.pdf>> [consulta: 03-07-2014].

**LEESON, T.; LEESON, R. 1982.** Atlas de Histología. Ed. Interamericana, Saunders Co. México DF, México. pp. 237-249.

**LUO, H.; GE, S.; YUE, D.; YAN, L.; XU, X.; LIU, K.; YUAN, F. 2011.** Effect of vitamin E on the development of testis in Sheep. **In:** Manafi, M. (Ed.). Artificial Insemination in Farm Animals. Intech (8) pp. 123-130.

**NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1985.** Nutrient Requirements of Sheep. National Academy of Sciences. Subcommittee on Sheep Nutrition. Committee on Animal Nutrition. Washington DC, USA.

**OROSTEGUI, C. 1999.** Sistema Reproductor Macho. **In:** Fernandez, S.; Orostegui, C.; Cepeda, R. Lecciones de Histología Veterinaria, Vol. II. 2ª Ed. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp. 80-100.

**PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCIA, C.; MUNOZ, A.; DE LOS REYES, M.; URQUIETA, B. 2011.** Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: Comparative study in high and low altitude native sheep. *Reprod Fertil Dev.* 23[2]:285-296.

**SOLEIMANI, M.; NOORAFSHAN, A.; MOMENI, H.; ABNOSI, M.; MAHMOODI, M.; ANVARI, M.; HOSEINI, SM. 2009.** Stereological study of the effects of Vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J. Androl*, 11:508-516.

**TRABER, M.G.; STEVENS, J.F. 2011.** Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med.* 51[5]: 1000-1013.

**TURNER, T.; LYSIAK, J. 2008.** Oxidative Stress: A common review factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008; 29:488-498.

**VERNET, P.; AITKEN, R.; DREVET, J. 2004.** Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol*, 216 (1-2):31-39.

**YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; JIN, X.; XU, X. 2010.** Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim. Reprod. Sci*, 118:217-222.