

PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE RATAS ADULTAS DEPOIS DE LESÃO MÚSCULO-ESQUELÉTICA

PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO MÚSCULO-ESQUELÉTICA

MALE ADULT RAT SPERM PARAMETERS AFTER SKELETAL MUSCLE INJURY



ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

Macon Borges Moraes¹
(Profissional de Educação Física)

Cassio Noronha Martins¹
(Fisioterapeuta)

Melina Hauck¹
(Fisioterapeuta)

Douglas Dalcin Rossato³
(Fisioterapeuta)

Carine Dhal Corcini⁴
(Médica veterinária)

Antonio Sergio Varela Junior¹
(Médico veterinário)

Luis Ulisses Signori²
(Fisioterapeuta)

1. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

2. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

3. Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria, RS, Brasil.

4. Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, RS, Brasil.

Correspondência:

Luis Ulisses Signori.
Centro de Ciências da Saúde,
Curso de Fisioterapia, Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM).
Av. Roraima, 1000, Cidade
Universitária, Bairro Camobi,
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900.
l.signori@hotmail.com

RESUMEN

Introducción: Las lesiones músculo-esqueléticas estimulan una respuesta inflamatoria sistémica que puede interferir en la reproducción de las especies. **Objetivo:** Evaluar los efectos causados por las lesiones músculo-esqueléticas sobre la respuesta inflamatoria y los parámetros espermáticos de ratas macho adultas. **Métodos:** El grupo de la muestra fue compuesto por 30 ratas Wistar distribuidas uniformemente en los grupos control y grupo lesionado. La lesión muscular fue inducida por medio de contusión, causada al soltarse un peso de 200 g desde una altura de 30 cm sobre el músculo gastrocnemio. Fueron colectadas muestras de sangre (hemograma completo y marcadores de daños e inflamación muscular), músculo (estrés oxidativo) y gónadas (parámetros espermáticos) 72 horas después de la lesión. **Resultados:** La lesión muscular aumentó los monocitos, creatina quinasa, proteína C reactiva, concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación. Por otro lado, la lesión redujo la capacidad antioxidante contra los radicales peróxido (ACAP), la integridad de la membrana (36%) y el acrosoma espermático (33%). La integridad de la membrana y el acrosoma ($p < 0,05$) se correlacionan directamente con ACAP ($p = 0,602$; $p = 0,513$ respectivamente) e inversamente con los monocitos ($p = -0,703$; $p = -0,635$, respectivamente), creatina quinasa ($p = -0,450$; $p = -0,603$), proteína C reactiva ($p = -0,511$; $p = -0,703$) y parámetros de estrés oxidativo (ROS $p = -0,703$; $p = -0,635$; lipoperoxidación $p = -0,494$; $p = -0,559$). **Conclusión:** La respuesta inflamatoria sistémica aguda proveniente de la lesión músculo-esquelética interfiere en los orgánulos de las células reproductivas masculinas (membrana y acrosoma). **Nivel de evidencia V; Estudio experimental.**

Descriptores: Reproducción; Espermatozoides; Músculo esquelético; Inflamación; Estrés oxidativo.

RESUMO

Introdução: As lesões músculo-esqueléticas estimulam uma resposta inflamatória sistêmica que pode interferir na reprodução das espécies. **Objetivo:** Avaliar os efeitos causados pelas lesões músculo-esqueléticas sobre a resposta inflamatória e os parâmetros espermáticos de ratos machos adultos. **Métodos:** O grupo da amostra foi composto por 30 ratos Wistar uniformemente distribuídos nos grupos controle e grupo lesionado. A lesão muscular foi induzida por meio de contusão, causada ao se soltar um peso de 200 g de uma altura de 30 cm sobre o músculo gastrocnêmio. Foram coletadas amostras de sangue (hemograma completo e marcadores de danos e inflamação muscular), músculo (estresse oxidativo) e gônadas (parâmetros espermáticos) 72 horas após a lesão. **Resultados:** A lesão muscular aumentou os monócitos, creatina quinase, proteína C-reativa, concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e lipoperoxidação. Por outro lado, a lesão reduziu a capacidade antioxidante contra os radicais peróxido (ACAP), a integridade da membrana (36%) e o acrossoma espermático (33%). A integridade da membrana e o acrossoma ($p < 0,05$) se correlacionaram diretamente com ACAP ($p = 0,602$; $p = 0,513$ respectivamente) e inversamente com os monócitos ($p = -0,703$; $p = -0,635$, respectivamente), creatina quinase ($p = -0,450$; $p = -0,603$), proteína C-reativa ($p = -0,511$; $p = -0,703$) e parâmetros de estresse oxidativo (ROS $p = -0,703$; $p = -0,635$; lipoperoxidação $p = -0,494$; $p = -0,559$). **Conclusão:** A resposta inflamatória sistêmica aguda decorrente da lesão músculo-esquelética interfere nas organelas das células reprodutivas masculinas (membrana e acrossoma). **Nível de evidência V; Estudo experimental.**

Descritores: Reprodução; Espermatozoides; Músculo esquelético; Inflamação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Skeletal muscle injuries stimulate a systemic inflammatory response which may interfere in species reproduction. **Objective:** To evaluate the effects caused by skeletal muscle injuries on the inflammatory response and sperm parameters of male adult rats. **Methods:** The sample group was composed of 30 Wistar rats distributed evenly across control and injury groups. Muscle injury was induced by bruising, caused by the release of a 200 g weight from a height of 30 cm onto the gastrocnemius muscle. Blood (CBC and damage/muscle inflammation markers), muscle (oxidative stress) and gonad (sperm parameters) samples were collected 72h after the injury. **Results:** The muscle injury increased monocytes, creatine kinase, C-reactive protein, reactive oxygen species (ROS) concentration and lipid peroxidation. In contrast, the injury reduced antioxidant capacity against peroxyl radicals (ACAP), membrane integrity (36%) and sperm acrosome (33%). Membrane integrity and acrosome ($p < 0.05$) correlate directly with ACAP ($p = 0.602$; $p = 0.513$ respectively) and inversely with monocytes ($p = -0.703$; $p = -0.635$, respectively), creatine kinase ($p = -0.450$; $p = -0.603$), C-reactive protein ($p = -0.511$; $p = -0.703$) and parameters of oxidative stress (ROS $p = -0.703$; $p = -0.635$; lipid peroxidation $p = -0.494$; $p = -0.559$). **Conclusion:** The acute systemic inflammatory response arising from skeletal muscle injury interferes in the male reproductive cell organelles (membrane and acrosome). **Level of Evidence V; Experimental study.**

Keywords: Reproduction; Spermatozoa; Muscle, skeletal; Inflammation; Oxidative Stress.



INTRODUCCIÓN

La señalización de la testosterona presente sobre las espermatogonias en los túbulos seminíferos, en sincronía con la actividad paracrina de diferentes sustancias, promueve la proliferación y diferenciación de los espermatozoides¹. La espermatogénesis difiere del desarrollo de otras células por la ocurrencia de meiosis, remodelado de la cromatina y la formación de estructuras especializadas, como la acrosoma y el flagelo^{2,3}. En el epidídimo, esas células maduran y son subsecuentemente impulsadas por el conducto deferente, donde son bañadas por el plasma seminal, que es caracterizado por intensa actividad antioxidante. Mientras tanto, ese proceso puede sufrir alteraciones en sus mecanismos como resultado de un proceso inflamatorio, resultando en un desequilibrio en los parámetros del estrés oxidativo (EO) de esa región y consecuentemente disfunción y disminución de la capacidad de fertilización⁴⁻⁹.

La fase inflamatoria de las lesiones musculoesqueléticas generalmente ocurre en los tres primeros días, desencadenando una serie de eventos físicos y químicos que promueven la reparación tisular¹⁰. Ese proceso activa leucocitos circulantes¹¹, aumenta la permeabilidad vascular, la quimiotaxis y la diapedesis de los leucocitos para el tejido lesionado^{10,12}, con consecuente aumento en la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la lipoperoxidación (LPO). Los daños musculares son generalmente observados sistémicamente por el aumento en las concentraciones plasmáticas de la creatina quinasa (CK), de la lactato deshidrogenasa (LDH)^{13,14} y de proteínas de fase aguda, como la proteína C-reactiva (PCR)¹⁵.

Cambios en la capacidad de fertilización puede ocurrir como resultado de efectos sistémicos, donde el EO resultante es señalado como un factor en el escenario de la infertilidad⁴⁻⁹. Concentraciones excesivas de ERO pueden causar deficiencia de esperma durante la espermatogénesis y/o a través del conducto deferente. La fase inflamatoria de las lesiones musculoesqueléticas puede causar efectos sistémicos, como resultado de un estado de EO, causado por la liberación de mediadores inflamatorios y de la leucocitosis^{10,12,13,16}, lo que puede interferir en la estructura y en la función de los espermatozoides. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de la lesión musculoesquelética sobre la respuesta inflamatoria y parámetros espermáticos de ratas adultas.

MÉTODOS

Animales y grupos experimentales

El estudio utilizó ratas Wistar adultas, machos, con 30 semanas de vida y peso entre 300 y 400g. Los animales fueron mantenidos en jaulas con tres animales en ciclos claro/oscuro de 12h con la temperatura entre 21°C y 24°C. Comida y agua fueron dadas *ad libitum* durante todo el protocolo experimental. La muestra fue estimada en 30 animales para el estudio.¹⁶ El cálculo muestral se basó en los resultados de la CK y tuvo una tasa de detección de 90% para una diferencia entre medias de 100% y desviación estándar de 110% para $\alpha=0,05$. Después de la anestesia, los animales fueron randomizados en Grupo Control (GC, n = 15) y Grupo Lesión (GL, n=15).

Protocolo de lesión

El músculo gastrocnemio derecho fue lesionado por aplastamiento mecánico¹⁶. Antes del procedimiento, todos los animales fueron tricatomizados para mejor exposición muscular y anestesiados con inyecciones intraperitoneales de clorhidrato de cetamina (80mg/kg) y xilazina (15mg/kg). Enseguida, los animales fueron colocados en la base del equipo en decúbito ventral para el máximo de extensión de la rodilla y tobillo. La lesión fue inducida por una masa de metal (200g) liberada desde una altura de 30cm.¹⁶ Las ratas del GC fueron anestesiadas y manipuladas de la misma manera, pero sin inducción de lesión. Ninguna fractura ósea fue verificada en el momento de la lesión o después de protocolo experimental y disección.

Muestra de tejido

Los animales fueron eutanasiados por decapitación 72h después del protocolo de lesión y fueron recolectados sangre, músculo, gónadas y epidídimo. La sangre fue recolectada en vacutainer heparinizado y centrifugada a 3000xg por 15min a 4°C para separar las células sanguíneas del plasma, las cuales fueron transferidas para microtúbulos que fueron almacenados en Ultrafreezer -80°C hasta los análisis. Para evaluación de los parámetros seminales, el epidídimo y una porción de conducto deferente fueron recolectados. Para facilitar la salida de los espermatozoides, el tejido fue inmerso en 1mL en medio M2 e interrumpido con el auxilio de una aguja (18G) en 24 placas de cultivo estériles. La evaluación de la calidad espermática fue realizada después de incubación de las muestras por 10min a 37 °C¹⁷.

Evaluación de los hemogramas, marcadores de inflamación, daño muscular y parámetros del estrés oxidativo

Los recuentos de eritrocitos y leucocitos totales fueron realizadas en un contador automático de células veterinarias (Sysmex®, modelo poch-100iV Diff). El diferencial leucocitario fue obtenido a partir de la confección de frotis sanguíneos frescos, los cuales fueron teñidos para análisis microscópicos posteriores¹¹. Las actividades plasmáticas de CK y LDH, así como la concentración plasmática de PCR fueron espectrofotométricamente determinadas.¹⁶

La concentración total de las ERO y la capacidad antioxidante contra los radicales peroxil (ACAP) fueron determinadas usando un medio reactivo conteniendo (30 mM HEPES, 200mM KCl y 1mM MgCl₂ ajustado para pH 7,2). Para el análisis de las ERO, fue utilizado el diacetato de 2',2'-diclorofluoresceína (H₂DCF-DA; Invitrogen TM) en una concentración final de 40µM. La producción total de fluorescencia fue calculada integrando las unidades de fluorescencia (UF) a lo largo del tiempo y los resultados fueron expresados como ERO=área relativa. El análisis de ACAP usó el diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (20mM ABAP; Aldrich TM) como un generador de las ERO después de la descomposición térmica a 37°C usando 488nm (absorción) en 60min y los resultados fueron expresados como 1/(área relativa con/sin ABAP)¹⁸.

El ensayo Fox (ferrous oxidation/xylene orange method) fue realizado para medir la lipoperoxidación (LPO).¹⁶ Los tejidos congelados fueron homogeneizados en metanol (5:1) y centrifugados a 1000xg durante 10min a 4°C. La lipoperoxidación fue determinada utilizando un medio reactivo conteniendo 1mM de FeSO₄, 0,25 M de H₂SO₄ y 1mM de xileno naranja. La absorbancia fue medida a 550nm en un lector de microplacas después de 4h de incubación a 37°C. El hidroperóxido de cumeno (1,75nM) fue empleado como estándar. Los valores de la LPO fueron expresados en nmol CHP/g de tejido.

Análisis de los parámetros espermáticos

La motilidad espermática total fue evaluada en una alícuota de 10µL de semen por medio de una ampliación de 200x en un microscopio óptico calentado de campo claro (Olympus BX41-PH-III, SP, Brasil). La motilidad fue determinada por el porcentaje de células móviles identificadas en tres campos distintos del microscopio con escala de 0 a 100%¹⁷.

La integridad de la membrana fue evaluada por sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (IP)¹⁹. La evaluación fue realizada con un microscopio de epifluorescencia con una ampliación de 400x (Olympus BX 51, SP, Brasil). Después de 200 espermatozoides por lámina, los espermatozoides con fluorescencia verde fueron considerados intactos.

La funcionalidad mitocondrial fue evaluada usando Rodamina 123 juntamente con sonda IP. Doscientas células fueron analizadas con una ampliación microscópica de epifluorescencia de 400x (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP, Brasil). Las células que presentaban la pieza intermedia con intensa fluorescencia verde fueron consideradas con mitocondrias funcionales, células que presentaban fluorescencia verde opaca fueron consideradas no funcionales²⁰.

La evaluación de la integridad del acrosoma fue basada en la técnica previamente descrita²¹ con modificaciones. Inicialmente, 20µL de semen fueron adicionados y una lámina de frotis. Después del secado, una alícuota IP 20µL fue adicionada y después secada. Las láminas fueron sumergidas en alcohol etílico absoluto a 95,55% (Sigma Chemical Company, MO, EUA) por 5min y después lavadas en PBS. En una sala oscura, 20µL de Lectina del *Arachishypogaea* FITC Conjugate (20mg/mL) (Sigma Chemical Company, MO, EUA) fue adicionada a las muestras por 10min. Posteriormente, las láminas fueron lavadas en agua desionizada y drenadas. Las láminas fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia por inmersión con una ampliación de 1000x (Olympus BX 51, SP, Brasil). Después de que fueron contados 200 espermatozoides por lámina, las células con fluorescencia verde en el acrosoma fueron consideradas con acrosomas íntegros.

La evaluación de la morfología espermática consistió en la verificación de todas las alteraciones del espermatozoide: acrosoma, cabeza, pieza intermedia y cola. Para este propósito, una doble coloración fue realizada por eosina y nigrosina, adicionando una gota de la solución de coloración de 10µL en una gota de semen de 10µL. Después de 1min, algunos frotis fueron hechos y, cuando estuvieron secos, un recuento de 200 células fue realizado en microscopio óptico con contraste de fase en inmersión (Olympus BX41-PH-III, SP, Brasil).²²

La integridad del ADN fue verificada por sonda naranja de acridina, siendo las evaluaciones realizadas por un microscopio de epifluorescencia con aumento de 400x. Doscientos espermatozoides fueron evaluados por muestra. Las células que presentaron fluorescencia verde fueron consideradas con ADN normal (cadena doble), mientras que células rojas o naranja fueron consideradas con ADN desnaturalizado (monocatenario).²³

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Universidad Federal de Rio Grande (CEUA / FURG # P034 / 2012 aditivo 002/2013).

Análisis estadístico

Las variables continuas están presentadas como medias (X) ± desviación estándar (DE). Todas las variables continuas fueron testeadas para distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos de la distribución normal fueron comparados por "t" y los de distribución no paramétrica por el test de Mann Whitney. Las correlaciones de Pearson (r) y Spearman (ρ) fueron aplicadas cuando eran apropiadas. p<0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los resultados de los parámetros hematológicos en los grupos control y lesión 72h después de la aplicación del protocolo son presentados en la Tabla 1. El hematocrito, los eritrocitos, la hemoglobina, las plaquetas y las proteínas plasmáticas totales fueron semejantes entre los grupos. Los animales sometidos al protocolo de lesión aumentaron en 17% los leucocitos totales (p=0,013). Este resultado ocurrió por el aumento de los

Tabla 1. Variables hematológicas al final del protocolo experimental.

Variables hematológicas	Unidad	Grupo Control (n=15) X ± DE	Grupo Lesión (n=15) X ± DE	p
Hematocrito	%	46,1 ± 1,6	46,1 ± 1,5	0,764
Eritrocitos	x10 ⁵ /mm ³	8,82 ± 0,39	8,84 ± 0,35	0,878
Hemoglobina	g/dL	15,7 ± 0,6	15,8 ± 0,5	0,766
Plaquetas	x10 ³ /mm ³	661 ± 109	611 ± 125	0,301
PPT	g/dL	6,62 ± 0,31	6,64 ± 0,26	0,846
Leucocitos Totales	x10 ³ /mm ³	5710 ± 1042	6667 ± 961	0,013
Neutrófilos	x10 ³ /mm ³	1254 ± 649	1876 ± 735	0,021
Monocitos	x10 ³ /mm ³	77 ± 44	202 ± 99	<0,001
Eosinófilos	x10 ³ /mm ³	134 ± 94	141 ± 103	0,842
Linfocitos	x10 ³ /mm ³	4245 ± 936	4451 ± 865	0,536

Datos presentados en media (X) ± desviación estándar (DE). PPT: Proteínas Plasmáticas Totales.

neutrófilos (p=0,02) y de los monocitos (p<0,001), que presentaron un aumento relativo de 50% y 160%, respectivamente. Eosinófilos, linfocitos y basófilos (<1%, datos no presentados) fueron semejantes entre los grupos.

Los resultados de los parámetros EO y las concentraciones plasmáticas de los marcadores inflamatorios musculares son mostrados en la Figura 1. El GL mostró un aumento en las concentraciones de las ERO (p<0,001, Figura 1A), de la LPO (p<0,001, Figura 1B) y una reducción en la ACAP (p<0,001, Figura 1C) en relación al GC. Las lesiones musculoesqueléticas aumentaron en 45% los niveles plasmáticos de la CK (p<0,001, Figura 1D)

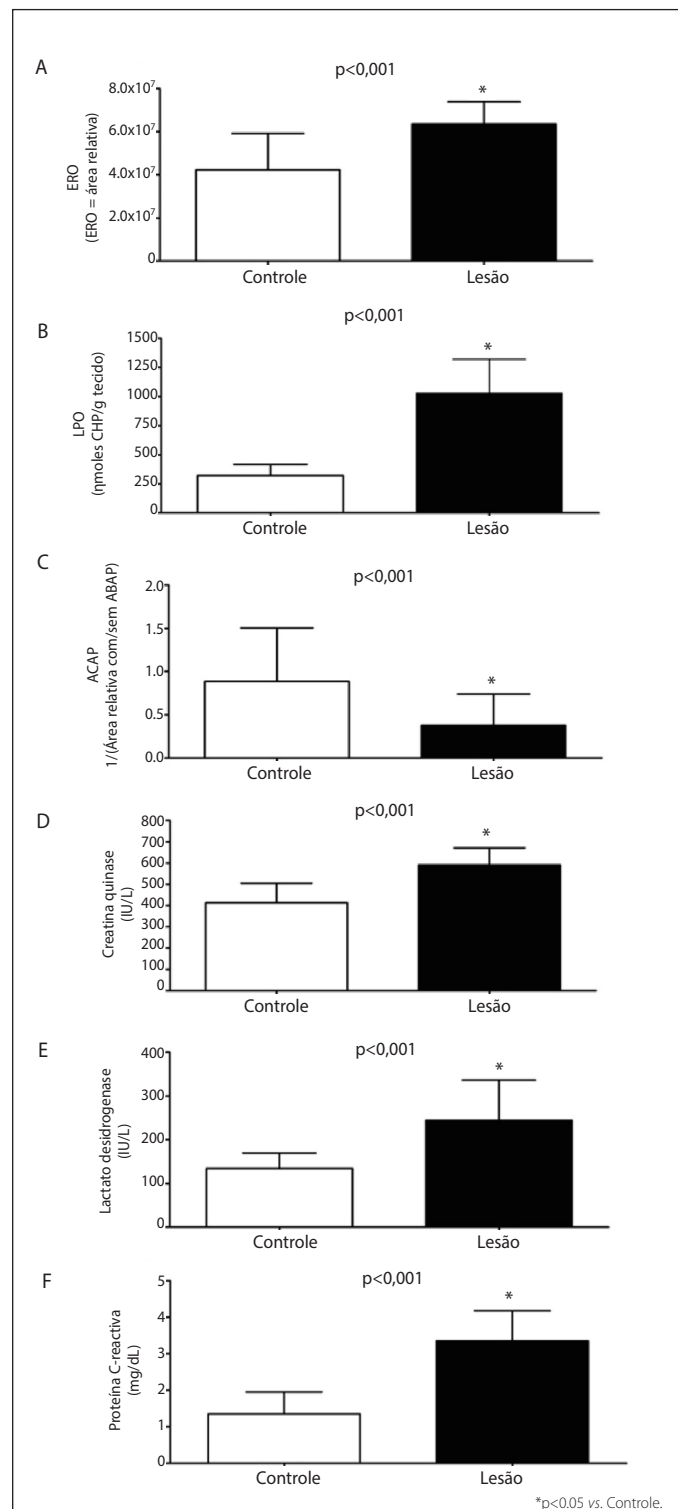


Figura 1. Parámetros del estrés oxidativo, daño e inflamación muscular. Los datos están presentados en la forma de media ± desviación estándar (DE). ERO: especies reactivas de oxígeno; LPO: liperoxidación; ACAP: capacidad antioxidante contra radicales peroxil.

y 82% en relación al LDH ($p < 0,001$, Figura 1E) en relación al GC. En el GL la PCR ultrasensible dobló ($p < 0,001$, Figura 1F) los valores en relación al GC.

Las variables de parámetros espermáticos 72h después del protocolo experimental son presentadas en la Tabla 2. Los parámetros de la motilidad, morfología espermática, función mitocondrial y la integridad del ADN fueron semejantes entre los grupos. El GL presentó reducción en la integridad de la membrana ($p = 0,002$) y en el acrosoma ($p < 0,001$) en relación al GC.

El peso de los animales fue semejante entre los grupos al final del estudio ($p = 0,208$, GC: 363 ± 23 g vs. GL: 353 ± 24 g). La concentración de las ERO se correlacionó negativamente con la integridad de la membrana (Figura 2A) y con el acrosoma (Figura 2B). El LPO también presentó ese comportamiento (Figura 2C y 2D) en relación a los parámetros espermáticos. La ACAP se correlacionó positivamente con las alteraciones en la integridad de la membrana (Figura 2E) y con el acrosoma (Figura 2F). La CK (Figura 2G y 2H), la PCR (Figura 2I y 2J) y los monocitos (Figura 2K y 2L) se correlacionaron inversamente con la integridad de la membrana y el acrosoma.

Tabla 2. Parámetros espermáticos.

Variabes	Unidad	Grupo Control (n=15) X ± DE	Grupo Lesión (n=15) X ± DE	P
Motilidad (%)	%	85,6 ± 9,6	85 ± 7,3	0,838
Membrana (%)	%	66,8 ± 27,4	31,2 ± 29,4	0,002
Mitocondria (%)	%	84,1 ± 9,2	79,9 ± 22,2	0,491
Acrosoma (%)	%	83,9 ± 17,7	51,2 ± 18,5	0,001
Morfología (%)	%	95,7 ± 4,1	97,6 ± 1,5	0,091
ADN (%)	%	98,2 ± 4,3	99,1 ± 3,5	0,562

Datos presentados en media (X) ± Desviación Estándar (DE). ADN: Ácido desoxirribonucleico.

DISCUSIÓN

El principal descubrimiento del estudio es que lesiones musculoesqueléticas interfieren en los parámetros espermáticos (reducción de la integridad de la membrana y acrosoma). Esas alteraciones están relacionadas a los parámetros del EO, marcadores plasmáticos de daño muscular e inflamación sistémica. Alteraciones en las concentraciones hematológicas de los leucocitos y de los marcadores plasmáticos de lesión muscular 72h después del protocolo de lesión ya fueron demostrados en estudios previos^{11,16}. Esas alteraciones ocurren debido a la rápida necrosis de las miofibrillas y a la producción de citocinas proinflamatorias que activan la respuesta inmune innata²⁴. La neutrofilia ocurre inmediatamente después de la lesión con esas células migrando hacia el tejido dañado²⁵, donde desempeñan un papel esencial en la reparación, pues estimulan la producción de las ERO y la liberación de citocinas que estimulan proteasas específicas que facilitan la fagocitosis y el reclutamiento de los monocitos circulantes²⁶. Los monocitos, a su vez, también migran hacia el tejido lesionado, donde se diferencian en macrófagos (aumentando la concentración de esas células ya residentes en el tejido) y realizan la fagocitosis de las miofibrillas dañadas^{25,26}, donde eventualmente fagocitan las células dañadas viables, causando un daño muscular secundario²⁶.

La CK y la LDH son biomarcadores de daños musculares que aumentan en respuesta a la lesión primaria (estructura muscular comprometida directamente por el trauma) y los efectos del EO, demostrados por el aumento excesivo en la generación de ERO^{14,16,27}, reducción de la ACAP y el aumento de la LPO16, causando daños a las estructuras macromoleculares. La interacción de esos mecanismos resulta en la lipoperoxidación o daño a la membrana del miocito, provocando la salida de las enzimas metabólicas mitocondriales y sarcoplasmáticas a la sangre¹⁴. La PCR es un marcador inflamatorio inespecífico de fase aguda; en los hepatocitos²⁸, su producción es estimulada por la IL-6. En el tejido adiposo y en las células sanguíneas mononucleares, su producción es estimulada por el TNF- α y IL-1 β ¹⁵. Esos mecanismos explican en parte, la correlación de esos marcadores con las alteraciones en el acrosoma y en la membrana espermática encontradas en el presente estudio.

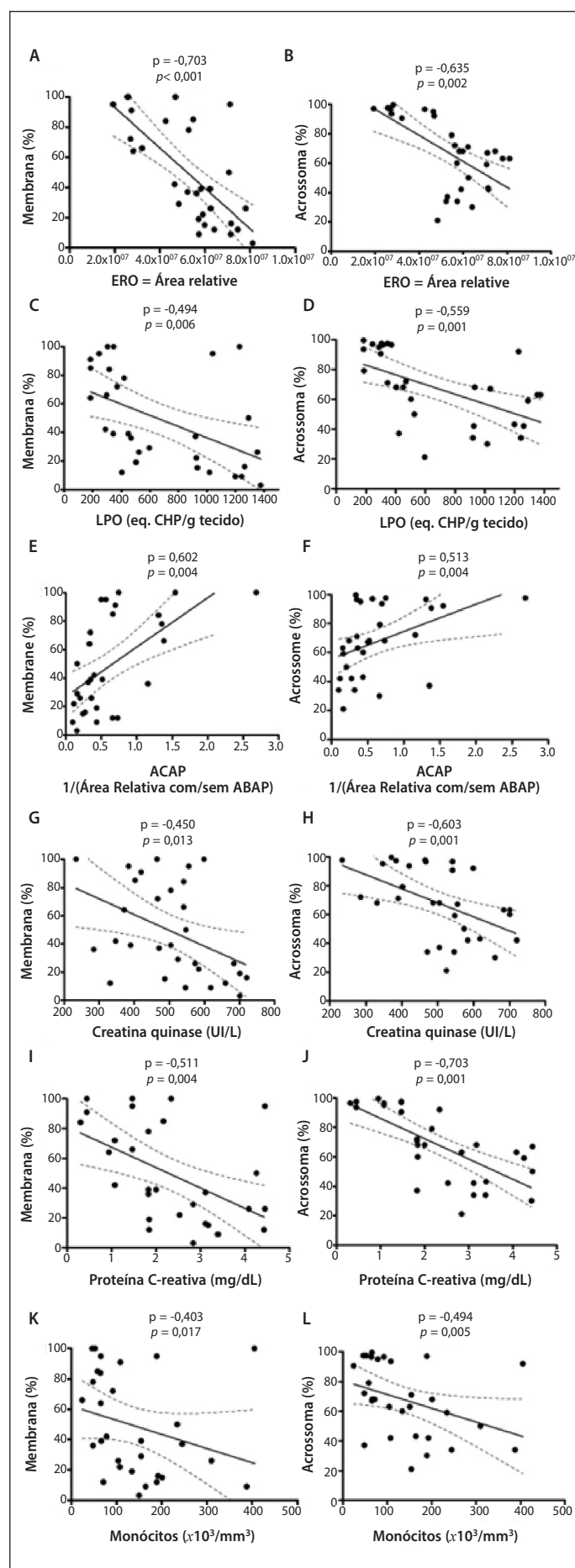


Figura 2. Correlaciones entre los parámetros espermáticos y los marcadores de estrés oxidativo, inflamatorios y la leucocitosis. ERO: Especies Reactivas de Oxígeno; LPO: Lipoperoxidación; ACAP: Capacidad antioxidante contra radicales peroxyl.

La inflamación sistémica ejerce efectos inhibitorios sobre la espermatogénesis debido a la acción de citocinas inflamatorias y de las ERO sobre el eje hipotalámico-hipofisario-Leydig, ejes circulares y en el epitelio seminífero interfiriendo en la capacidad de fertilización⁴. Esos efectos pueden ser más pronunciados en el epitelio seminífero durante las fases VIII-IX, por la sensibilidad específica de ese estadio y por la acción de mediadores inflamatorios en la actividad de las células de Sertoli, inhibiendo la expresión de proteínas esenciales para la estructura del espermatozoide⁵. La inflamación sistémica aumenta la expresión de IL-6, que interactúa con el TNF- α y disminuye la secreción de testosterona por las células de Leydig y células de Sertoli interfiriendo en la señalización de la espermatogénesis⁶. La fase de citocinas inflamatorias también modula la expresión de la ciclooxigenasa-2 y de las prostaglandina por las células de Leydig y Sertoli, interfiriendo en la producción de andrógenos y en la captación de la glucosa por esas células, afectando la señalización y el metabolismo energético del proceso espermatogénico⁷. De esa forma, las disfunciones en esa fase pueden ser atribuidas a la alta producción de genes relacionados a la inflamación presentes en la circulación sistémica y, por lo tanto, en los testículos y epidídimos, ejerciendo efectos adversos sobre el desarrollo y la maduración de los espermatozoides⁸. En este estudio, la inflamación sistémica resultó de la interacción de diferentes mecanismos evaluados alterando así la calidad de la membrana y del acrosoma.

Modificaciones de esos parámetros espermáticos y la interacción con las moléculas evaluadas también ocurren debido al alto grado de conformación de esos marcadores en sus sitios de ligación con esas moléculas que poseen cisteínas altamente reactivas cuando están en la presencia de EO¹⁵. Ese estado está potencialmente presente en los órganos reproductivos, donde los leucocitos y los espermatozoides son considerados los principales productores de las ERO en ese lugar^{2,3}. En contraste con los efectos de la ERO, el plasma seminal posee sistemas antioxidantes que mantienen la funcionalidad de los espermatozoides⁹. En el presente estudio, ese equilibrio fue posiblemente afectado por el aumento de las concentraciones de ERO en el epidídimo, como resultado

de la interacción de la inflamación sistémica en el local, que puede causar daños a la membrana espermática vía lipoperoxidación. Mientras tanto, esas células son incapaces de restaurar su membrana después del daño²⁹. El EO también activa la señalización de la proteína quinasa C, resultando en una disfunción en la actividad de los canales de Ca²⁺, generando acrosomas prematuros y/o exocitosis³⁰. En ese contexto, la acción sistémica de los marcadores inflamatorios y la optimización de las concentraciones de las ERO en el tejido, pueden llevar a un desequilibrio entre los sistemas oxidante/antioxidante que afectan la estructura espermática, con posible compromiso de su capacidad de fertilización.

La ausencia de medidas de las temperaturas centrales y periféricas, así como las evaluaciones de los niveles de cortisol, testosterona e interleucina plasmática (IL-6 y TNF α) son limitaciones de este estudio. Las medidas del sistema gonadal también contribuyen para una mejor comprensión de los resultados encontrados.

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la fase inflamatoria de las lesiones musculoesqueléticas por contusión provoca un estado de estrés oxidativo muscular y leucocitosis, aumenta los marcadores de inflamación sistémica y el daño muscular, así como reduce las variables espermáticas. La integridad de la membrana y del acrosoma espermático está disminuida, y esas medidas están relacionadas a parámetros del estrés oxidativo, a los marcadores plasmáticos de daño muscular y la inflamación sistémica.

AGRADECIMIENTOS

No nos gustaría agradecerle al Instituto de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Histología de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG) por su colaboración en el procesamiento y análisis de datos.

Todos los autores declaran ningún conflicto de intereses potencial con respecto a este artículo.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES: Cada autor contribuyó individual y significativamente para el desarrollo de este manuscrito. MBM (0000-0001-5085-7414)*, CNM (0000-0002-2344-6844)*, MH (0000-0001-9202-7574)* y DDR (0000-0003-2724-7567)* entrenaron a los animales y fueron los principales contribuyentes en la redacción del manuscrito. MBM, CDC (0000-0001-5683-7801)*, ASVJ (0000-0003-4901-5118)* y LUS (0000-0001-7784-9940)* establecieron las directrices para el trabajo y participarán en el análisis, discusión de resultados y elaboración del manuscrito. Todos los autores aprobaron la versión final del manuscrito y concordaron en asumir la responsabilidad por todos los aspectos del estudio. *ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*).

REFERENCIAS

- Riffell JA, Krug PJ, Zimmer RK. The ecological and evolutionary consequences of sperm chemoattraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4501-6.
- Gan H, Cai T, Lin X, Wu Y, Wang X, Yang F, et al. Integrative proteomic and transcriptomic analyses reveal multiple post-transcriptional regulatory mechanisms of mouse spermatogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(5):1144-57.
- Paronetto MP, Messina V, Barchi M, Geremia R, Richard S, Sette C. Sam68 marks the transcriptionally active stages of spermatogenesis and modulates alternative splicing in male germ cells. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(12):4961-74.
- Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335(1):60-8.
- Liew SH, Meachem SJ, Hedger MP. A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. *J Androl*. 2007;28(1):176-85.
- Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, et al. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur Cytokine Netw*. 2005;16(2):167-72.
- Frungieri MB, Calandra RS, Mayerhofer A, Matzkin ME. Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. *Reproduction*. 2015;149(4):R169-80.
- Hedger MP. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation—a perspective. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):130-41.
- Nenkova G, Alexandrova A. A review: oxidative stress and its role in reproduction. *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;4(1):37-43.
- Järvinen TA, Järvinen TLN, Kärräinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.
- Signori LU, Costa ST, Neto AF, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy*. The Chartered Society of Physiotherapy. 2011;97(2):163-9.
- Urso ML. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *J Appl Physiol*. 2013;115(6):920-8.
- Souza JD, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models. *Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(6):1253-60.
- Pierce A, de Waal E, McManus LM, Shireman PK, Chaudhuri AR. Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(12):1584-93.
- Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(1):118-27.
- Martins CN, Moraes MB, Hauck M, Guerreiro LF, Rossato DD, Varela AS Jr, et al. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. *Physiotherapy*. 2016;102(4):377-83.
- Aral F, Karaçal F, Baba F. The effect of enrofloxacin on sperm quality in male mice. *Res Vet Sci*. 2008;84(1):95-9.
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JL, et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ*. 2009;407(6):2115-23.
- Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane mammalian spermatozoa integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990;88(1):343-52.
- Grasa P, Pérez-Pé R, Báquena O, Forcada F, Abecia A, Cebrían-Pérez JA, et al. Ram sperm selection by a dextran / swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl*. 2004;25(6):982-90.
- Kawamoto A, Ohashi K, Kishikawa H, Zhu LQ, Azuma C, Murata Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril*. 1999;71(3):497-501.
- Juliano F, Serret CG, Schneider A, Rabassa VR, Nogueira CE, Vidor T, et al. Effect of pigpel extender on the boar semen quality stored at different temperatures. *Semin Ciências Agrárias*. 2009;30(4):899-906.
- Håkonsen LB, Spano M, Bonde JP, Olsen J, Thulstrup AM, Ernst E, et al. Exposures that may affect sperm DNA integrity: two decades of follow-up in a pregnancy cohort. *Reprod Toxicol*. 2012;33(3):316-21.
- Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:491497.
- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5):R1173-87.
- Lockhart NC, Brooks SV. Neutrophil accumulation following passive stretches contributes to adaptations that reduce contraction-induced skeletal muscle injury in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104:1109-15.
- Carvalho N, Puntel G, Correa P, Gubert P, Amaral G, Morais J, et al. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *J Sports Sci*. 2010;28(9):923-35.
- Michigan A, Johnson TV, Master VA. Review of the relationship between C-reactive protein and exercise. *Mol Diagn Ther*. 2011;15(5):265-75.
- den Daas N. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci*. 1992;28(1-4):87-94.
- Cardoso TF, Varela AS Jr, Silva EF, Vilela J, Hartmann A, Jardim RD, et al. Influence of mineral, olive or sunflower oils on male reproductive parameters in vitro—the wild rodent *Calomys laucha*. *Andrologia*. 2014;46(7):722-5.