



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Efecto del sobrepeso y la obesidad en los cambios de la morfología celular del epidídimo y parámetros espermáticos en la rata Wistar.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

**Biól. Exp. María Guadalupe Mendoza Delgado**

Ciudad de México a 19 de febrero del 2020.

## **COMITÉ DE TUTORES**

### **Directora**

**Dra. Ma. del Rosario Tarragó Castellanos**

Profesora titular "C"

Laboratorio W-212

Departamento de Biología de la Reproducción

Área de neurociencias

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

correo: mrtc@xanum.uam.mx

### **Asesora**

**Dra. Edith Arenas Ríos**

Profesora Titular "C"

Laboratorio M7

Departamento de Biología de la Reproducción

Área de Reproducción Animal Asistida

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

### **Asesora**

**Dra. Herlinda Bonilla Jaime**

Profesora Titular "C"

Laboratorio. Q3 No. 6

Departamento de Biología de la Reproducción

Área de Biología Conductual y Reproductiva

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

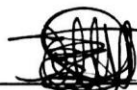
Correo: bjh@ xanum.uam.mx

## MIEMBROS DEL JURADO

"Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Efecto del sobrepeso y la obesidad en los cambios de la morfología celular del epidídimo y parámetros espermáticos en la rata Wistar, con fecha 19 de febrero de 2020

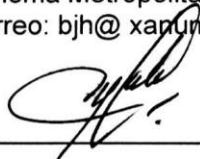
**Dra. Edith Arenas Ríos.**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Área de Reproducción Animal Asistida  
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.  
Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx



**Dra. Herlinda Bonilla Jaime**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Área de Biología Conductual y Reproductiva  
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.  
Correo: bjh@xanum.uam.mx




**Dra. Marcela Arteaga Silva**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Área de Biología Conductual y Reproductiva  
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.  
Correo: asma@xanum.uam.mx



**M en C. Pedro Cuapio Padilla**

Laboratorio de Andrología/Banco de Semen/Calidad/Investigación  
Hisparep, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español, CDMX  
Correo: cuapiopp@yahoo.com.mx



### **Lugar de realización:**

Este proyecto se realizó en su totalidad en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Edificio W, laboratorio W-212.

Departamento: Biología de la Reproducción.

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT (PNPC) 003797.”

Número de CVU 868822 con número de becario CONACyT 638438.

## No te rindas

No te rindas, aun estas a tiempo  
de alcanzar y comenzar de nuevo,  
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,  
liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.

No te rindas, por favor no cedas,  
aunque el frio queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se esconda y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños,  
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,  
porque lo has querido y porque te quiero.

Porque existe el vino y el amor, es cierto,  
porque no hay heridas que no cure el tiempo,  
abrir las puertas quitar los cerrojos,  
abandonar las murallas que te protegieron.

Vivir la vida y aceptar el reto,  
recuperar la risa, ensayar el canto,  
bajar la guardia y extender las manos,  
desplegar las alas e intentar de nuevo,  
celebrar la vida y retomar los cielos,

No te rindas por favor no cedas,  
aunque el frio queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se ponga y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños,  
porque cada día es un comienzo,  
porque esta es la hora y el mejor momento,  
porque no estás sola,  
porque yo te quiero.

**Mario Benedetti**

## **Dedicatorias**

A mi madre Marcelina Mendoza por hacerme una mujer fuerte y por brindarme los principios sólidos que me enseñó desde niña, para enfrentarme a los momentos más difíciles que he vivido y por hacerme sensible ante el dolor de las demás personas.

A mi marido, José Miguel Sagastizabal que siempre ha estado a mi lado apoyándome en todo momento, en lo bueno y no tan bueno, por enseñarme a no planear tanto y vivir más, por todas las sonrisas y la felicidad de la cual gozo hasta este momento junto a él.

A mis sobrinitas Romina y Naomi por sus sonrisas y travesuras, que desde que llegaron a este mundo cambiaron mi vida.

## **Agradecimientos**

A las doctoras Edith Arenas Ríos y Herlinda Bonilla Jaime, por ser parte de mi comité apoyándome siempre para enriquecer mi proyecto con sus conocimientos y observaciones.

En especial a la Dra. Rosario Tarragó Castellanos que siempre estuvo a mi lado apoyándome incondicionalmente, haciéndome ver esos pequeños grandes detalles para enriquecer este proyecto, por su enorme calidad humana y por ser un gran ser humano que apoya a las personas que se acercan a ella para pedir ayuda. Por su ética como persona y por ser una mujer de una sola pieza.

A mis sinodales, al Maestro en Ciencias Pedro Cuapio Padilla y la Dra. Marcela Arteaga Silva por su tiempo para enriquecer este trabajo con sus observaciones y sugerencias.

A mis amigos que desde hace muchos años nos conocemos y siempre me han apoyado en este camino de la ciencia, David Hernández Álvarez y su esposa Graciela, a Carol, Toñita y Amín, por esas pláticas divertidas y enriquecedoras llenas de risas, a mis compañeras de laboratorio Jocelyn y Dianita por su solidaridad, compañerismo y apoyo.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	9
<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1 Sistema reproductor masculino.....	15
1.2 Morfofisiología testicular.....	15
1.3 Morfofisiología epididimaria.....	16
1.4 Tipos de células epididimarias y sus funciones.....	19
1.5 Desregulación del eje Hipotálamo Hipófisis Testosterona inducido por el sobrepeso y la obesidad.....	24
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>27</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>30</b>
<b>5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>31</b>
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
9.1 Administración de las dietas.....	33
9.2 Peso corporal de las ratas.....	33
9.3 Obtención de las muestras.....	33
9.4 Obtención del epidídimo y peso epididimario.....	33
9.5 Extracción de espermatozoides .....	34
9.6 Parámetros espermáticos.....	34
9.7 Viabilidad espermática .....	34
9.8 Morfología espermática.....	35
9.9 Procesamiento histológico.....	35
9.9.1 Análisis histológico cualitativo.....	35

9.9.2 Análisis morfométrico del epidídimo .....	36
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>37</b>
<b>11. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
11.1 Peso corporal .....	38
11.2 índice de Lee.....	38
11.3 Grasa escrotal .....	39
11.4 Índice epididimario somático .....	40
11.5 Espermatobioscopias .....	40
11.6 Análisis histológico cualitativo del epidídimo .....	41
11.7 Análisis morfométrico del epidídimo.....	47
11.7.1 Área de los conductos.....	47
11.7.2 Porcentaje de la luz de los conductos.....	48
11.7.3 Porcentaje del área de los conductos ocupada por los espermatozoide .....	49
11.7.4 Altura del epitelio.....	50
<b>12. DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>13. CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>14. ANEXOS.....</b>	<b>61</b>
14.1 Medio Ringer para el lavado de espermatozoides.....	61
14.2 Solución para viabilidad y morfología espermática (EN) .....	61
14.3 Histología .....	61
14.3.1 Fijación del tejido.....	61
14.3.2 Procesamiento Histológico .....	62
14.3.3 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	62
14.3.4 Tinción Tricrómica de Masson .....	62
<b>15. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>



## Lista de abreviaturas

<b>ABP</b>	Hormona fijadora de andrógenos
<b>AMPC</b>	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>AMPK</b>	Por sus siglas en inglés, AMP activated protein kinase (proteína cinasa activada por AMP)
<b>BHE</b>	Barrera hematoepididimaria
<b>DHT</b>	Dehidrotestosterona
$\Delta^4$	Delta cuatro
$\Delta^5$	Delta cinco
<b>EN</b>	Eosina nigrosina
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>5<math>\alpha</math>-R</b>	Enzima 5 $\alpha$ reductasa
<b>FSH</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>H-E</b>	Tinción de Hematoxilina-Eosina
<b>HHT</b>	Hipotálamo hipófisis testículo
<b>IES</b>	Índice epididimario somático
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-1B</b>	Interleucina -1B
<b>IMC:</b>	índice de masa corporal
<b>LH:</b>	Hormona Luteinizante
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>RA</b>	Receptores de andrógenos
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Receptores a estrógenos-alfa
<b>SHBG</b>	Globulina fijadora de hormonas sexuales

<b>StAR</b>	Proteína de regulación de la esteroidogénesis
<b>T</b>	Testosterona
<b>TM</b>	Tinción tricrómica de Masson
<b>TGA</b>	Triacilglicéridos
<b>PPARs</b>	Factores de proliferación de los peroxisomas
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Factores de proliferación de los peroxisomas gama
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Factores de proliferación de los peroxisomas alfa

## RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad se caracteriza por, un exceso de tejido adiposo el cual induce efectos negativos, tales como: la aromatización de testosterona a estradiol, desbalance hormonal y la disminución de la fertilidad, siendo un problema que afecta a muchos hombres, estudios recientes lo relacionan con una disminución de los parámetros espermáticos. Los espermatozoides al salir de los túbulos seminíferos necesitan adquirir la capacidad para moverse, reconocer y fertilizar al ovocito, y es en el epidídimo, donde las adquieren (maduración espermática epididimaria). El epidídimo es un órgano andrógono dependiente, que puede verse afectado con el sobrepeso y la obesidad pudiendo alterar los parámetros espermáticos y la morfometría del epidídimo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del sobrepeso y obesidad en el análisis morfométrico epididimario y los parámetros espermáticos. En este trabajo se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar con una edad de tres meses, se dividieron en tres grupos con una n=6 por cada uno (sobrepeso, obesidad y control), el agua y el alimento estuvo disponible *ad libitum*, cada grupo recibió una dieta específica (10% para generar sobrepeso y 60% obesidad) TestDiet por un mes; se registró la medida naso anal y el peso de las ratas. Se obtuvo: la grasa gonadal y los epidídimos para el análisis espermático y para analizar la morfometría mediante la técnica histológica. La dieta hiperlipídica induce tanto sobrepeso como obesidad en ratas Wistar, disminuyendo el índice epididimario-somático. Tanto en sobrepeso como en la obesidad el epitelio epididimario se ve afectado en su altura, número y largo de los cilios, así como por la presencia de abundantes vacuolas, relacionado con estos cambios, se observan alteraciones en la calidad espermática, se reduce drásticamente la viabilidad espermática (32%) en animales con obesidad y de manera significativa con sobrepeso (70%). También se incrementa en estos grupos la presencia de malformaciones en la pieza media angulada, flagelo angulado y enrollado. En conclusión, el sobrepeso y la obesidad inducen cambios epididimarios tanto en las células que conforman al epitelio como en la maduración espermática.

## ABSTRACT

Overweight and obesity is characterized by an excess of adipose tissue that, in males, induces negative effects, such as: the aromatization of testosterone into estradiol, hormonal disorder and impaired fertility. Recent studies relate it to low sperm count and reduced sperm motility. When sperm leave the seminiferous tubules they need to go through epididymal maturation in the epididymis, where in 1 or 2 weeks they acquire the ability to move, to recognize and to fertilize the oocyte. The epididymis is an androgen-dependent organ that can be affected by overweight and obesity and alter the sperm parameters and morphometry of the epididymis. The objective of this study is to show the effect of overweight and obesity on epididymal morphometric analysis and sperm parameters. In this study, 18 three-month-old Wistar strain rats male were used. They were divided into three groups with an n=6 per group: overweight, obesity and control. Water and food were available ad libitum, each group received a specific diet (10% to generate overweight and 60% obesity) TestDiet for one month; naso-anal measure and the weight of the rats were recorded. The gonadal fat, the epididymis for the sperm analysis and the morphometry were obtained with histological technique to be analyzed. The *hyperlipidemic* diet induces both overweight and obesity in Wistar rats, decreasing the somatic epididymal index. In both overweight and obesity groups a *reduction* in seminiferous *epithelium height* and tubular diameter were observed, number and length of the cilia were affected, as well as the presence of abundant vacuoles. These changes led to alterations in sperm quality, sperm viability was drastically reduced (32%) in obese animals and significantly in overweight (70%). An increase on morphological abnormalities in the midpiece and tail were present in these groups. In conclusion, overweight and obesity induce epididymal changes both in the cells that make up the epithelium and in sperm maturation.

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la disminución de la fertilidad es un problema que afecta a muchos hombres, estudios recientes lo relacionan con una disminución de los parámetros espermáticos, lo cual puede ser ocasionado por múltiples factores, entre los que se encuentran: factores ambientales, estrés, una alimentación desbalanceada que puede ocasionar sobrepeso y llegar a la obesidad, sumado a una disminución en las concentraciones de testosterona (T) (Swan *et al.*, 2000; Guarnieri *et al.*, 2010; Barrera., 2013; Araya, 2014; de Souza *et al.*, 2017; WHO, 2017).

En el hombre el eje reproductivo, hipotálamo hipófisis testículo (HHT) es el responsable de regular la producción de T; a nivel hipotalámico, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se secreta de forma pulsátil para regular en la adenohipófisis la producción hormonal de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), ambas serán transportadas a través del torrente sanguíneo hasta llegar a su órgano blanco: el testículo. La FSH en las células de Sertoli se une a sus receptores, ocasionando que, estimulen la liberación de inhibina B y de activina, las cuales regulan la secreción de FSH, fundamentales para la espermatogénesis; la LH en las células de Leydig, regula y estimula la síntesis de T (González, 2017).

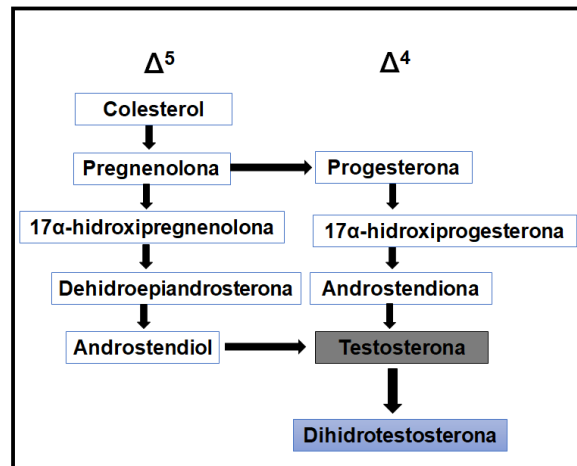
La liberación de GnRH en el eje HHT, es regulado por múltiples neurotransmisores y por diversas hormonas como por ejemplo la T, progesterona y prolactina, así como por hormonas que se secretan en situaciones de estrés que pueden disminuir la secreción de GnRH (Michalakis *et al.*, 2013; Hall, 2016). Cuando se presenta un desbalance energético relacionado con una ingesta inadecuada de alimento, se puede provocar una disfunción en el eje reproductivo, ocasionando una disminución en la concentración de la T (Michalakis *et al.*, 2013; Oliver y Mach, 2016).

Como ya se mencionó la síntesis de T se lleva a cabo en las células de Leydig, la cual se realiza tanto por la vía  $\Delta^4$  a partir de progesterona como por la vía  $\Delta^5$  a partir de pregnenolona; en el caso específico de los roedores predomina la primera, y la vía  $\Delta^5$  en el humano (Robaire y Hamzeh, 2011; Gómez-Chang, *et al.*, 2012).

En el testículo, las células de Leydig son estimuladas por LH, iniciándose así la cascada de señalización para la esteroidogénesis, la unión de LH con el receptor activa los receptores acoplados a las proteínas G que estimulan la síntesis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), esta, al acumularse en el espacio intracelular activa la proteína cinasa A (PKA) que fosforilará a la proteína de regulación de la esteroidogénesis aguda del transporte del colesterol (StAR).

StAR se encarga de regular la translocación del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, en donde ocurrirá la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450<sub>ssc</sub> (Orgebin-Crist *et al.*, 1976; Chang-Gómez *et al.*, 2012). Esta vía no es la única que puede activarse; en el testículo se presentan otras vías que pueden activar la esteroidogénesis independientes de AMPc y, en ciertos casos funcionan en correlación con LH para promover la esteroidogénesis testicular (Barret *et al.*, 2013).

Para que se lleve a cabo la síntesis de T, primero se da la conversión de colesterol a pregnenolona que se hidroxila en la posición 17 y posteriormente sufre un rompimiento de su cadena lateral para formar dehidroepiandrosterona y androstendiol para convertirse en T. Se puede también generar androstenediona a través de la progesterona y la 17-hidroxiprogestero, posteriormente, la dehidroepiandrosterona y la androstenediona se convierten en T (**Fig 1**) (Hu *et al.*, 2010; Barret *et al.*, 2013). La T sintetizada es transformada por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, para generar un metabolito más potente que la T, la dihidrotestosterona (DHT) (Hu *et al.*, 2010), necesaria para que se lleve a cabo la espermatogénesis y otro proceso fundamental para que los espermatozoides adquieran su capacidad fertilizante, ya que una vez que salen los espermatozoides del testículo aun no adquieren la movilidad y la capacidad para unirse y reconocer al ovocito (O'Donnell *et al.*, 2000).



**Fig 1.** Biosíntesis de la testosterona, modificado de: Hu *et al.*, 2010; Hall., 2016.

## 1.1 Sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino está formado por un par de testículos, un par de epidídimos adosados a los testículos, las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) y los genitales externos, como son pene y el escroto (donde se alojan testículos y epidídimos) (Challis *et al.*, 2005; Barret *et al.*, 2013).

## 1.2 Morfofisiología testicular

Los testículos contienen túbulos seminíferos, y en su interior se localiza el epitelio germinativo en el que se lleva a cabo la espermatogénesis, es decir, el desarrollo de las células sexuales masculinas o espermatozoides (Barret *et al.*, 2013). Fuera de los túbulos seminíferos, se encuentran las células de Leydig, encargadas de producir T (Wojciech, 2016). El epitelio seminífero es un epitelio estratificado, que está compuesto básicamente por dos tipos celulares:

- a) **Células de Sertoli.** Son las encargadas de dar soporte nutricional y estructural a las células precursoras de los espermatozoides, participan en la espermatogénesis, mientras se lleva a cabo la diferenciación celular de las espermatogonias a espermatozoides, así como, en la fagocitosis de los restos celulares. Estas células son las encargadas de formar la barrera hemato-testicular considerada como una frontera que

hay entre la circulación sanguínea de los vasos capilares de los testículos y los túbulos seminíferos; por medio de las uniones estrechas que se establecen entre las células de Sertoli se crea una barrera, que sirve para asegurar un microambiente ideal para el mantenimiento de las células germinales que darán lugar a los espermatozoides (Wojciech, 2016). Las células de Sertoli también se encargan de secretar la proteína fijadora de andrógenos (ABP) necesaria para el transporte de andrógenos y la inhibina B, esta última interviene en la retroalimentación negativa sobre el eje reproductivo HHT (Patton y Thibodeau, 2013).

- b) **Células germinales:** las espermatogonias se encuentran cercanas a la lámina basal de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis y meiosis, y presenta dos fases: la primera para formar a los espermatocitos secundarios y la segunda para formar espermátides que serán diferenciadas en espermatozoides inmaduros, mismos que serán liberados hacia la luz de los túbulos, que con ayuda del líquido luminal y por medio de los movimientos peristálticos que realiza el tejido liso que se encuentra en la túnica vaginal llegarán al epidídimo los espermatozoides (Hargrove *et al.*, 1977; Neill, 2006; Robaire y Hamzeh, 2011; Patton y Thibodeau, 2013).

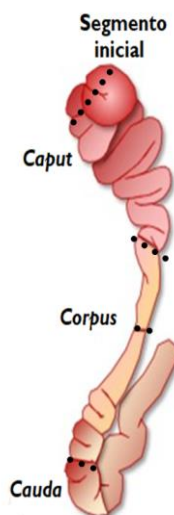
### 1.3 Morfofisiología epididimaria

El epidídimo es un conducto, altamente enrollado que varía en longitud dependiendo de la especie, en ratas llega a medir hasta 3 metros y en humanos de 3 a 6 metros (Robaire y Hinton, 2015). Está constituido por elementos hormonales, así como, de elementos estructurales como: el entorno intraluminal, matriz extra-tubular y las paredes vasculares, lo cual le confiere el peso al epidídimo (Brooks, 1983; Sullivan *et al.*, 2007). En este órgano se llevarán a cabo las siguientes funciones: el transporte de los espermatozoides, maduración, protección, almacenamiento, desarrollo de la movilidad espermática y de la capacidad fertilizante (Robaire y Hamzeh, 2011; Dacheux y Dacheux, 2013). El epidídimo se divide en segmentos y cada conducto contorneado está separado por un tabique (Turner *et al.* 2007; De Grava y Klinefelter, 2014; Robaire y Hinton, 2015), cada segmento tiene elementos



reguladores únicos y comunes de los eventos de señalización, expresión de genes y proteínas. Una de las funciones del epidídimo es contribuir a la formación de un microentorno luminal ideal, que es fundamental para que los espermatozoides testiculares lleguen maduros al momento de alcanzar la *cauda* (De Grava y Klinefelter, 2014).

Este órgano se divide en cuatro o más segmentos, según la especie (Cornwall, 2009), de forma general, la mayoría de los mamíferos, presentan: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*, y en cada región se organizan en lobulillos (**Fig 2**), en el caso de la rata se tienen cuatro regiones, pero en el humano solo se llegan a diferenciar solo tres (Challis *et al.*, 2005; De Grava y Klinefelter, 2014; Robaire y Hinton, 2015; Zhou *et al.*, 2018).



**Fig 2.** Esquema modificado de: Zhou *et al.*, 2018 se muestran las regiones de una sección longitudinal del epidídimo de rata; Segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*.

**a) Segmento inicial:** Es la continuación de los túbulos eferentes, se caracteriza por ser un conducto enrollado de diámetro amplio, con células epiteliales que tienen cilios largos, en este segmento se observa una red capilar caracterizada por un porcentaje bajo de capilares linfáticos en el intersticio de 0.69%, en comparación con las regiones distales. Su principal característica es una vascularización intensa la cual se refleja en un flujo sanguíneo mayor, con el resto del epidídimo, para su funcionamiento el

epidídimo requiere la presencia de andrógenos, factores lumicrinos y la síntesis de proteínas (Breton *et al.*, 2016; Domeniconi *et al.*, 2016).

- b) *Caput*:** Se encuentra formado por conductos eferentes que van de una forma regular a isodiamétrica, los conductos están revestidos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado (con un 80% de células principales), que presentan cilios grandes y abundantes que se encargan de ayudar a reabsorber los fluidos testiculares, el *caput* junto con el segmento inicial son las regiones donde se reciben a los espermatozoides inmaduros (De Grava y Klinefelter, 2014).
- c) *Corpus*:** Formado por conductos de forma irregular, presenta un epitelio columnar simple con cilio, en esta región secreta glucógeno que va a ayudar a la maduración de los espermatozoides. Las células principales presentan gran actividad ya que en esta región ocurre parte de la maduración y empiezan a adquirir la capacidad para moverse los espermatozoides. En esta región las células claras presentan abundantes lípidos en la región supranuclear, contribuyendo a la modificación de componentes lipídicos de la membrana plasmática de los espermatozoides (De Grava y Klinefelter, 2014).
- d) *Cauda*:** Contiene varias capas: capa mucosa revestida con epitelio columnar simple con cilios muy cortos, capa muscular lisa y una capa adventicia rodeada por tejido laxo y algo de cubierta de la túnica vaginal. Presenta conductos de irregular a anisodiamétricos, el lumen del conducto es ácido para evitar que los espermatozoides presenten movilidad y consuman energía innecesaria, lo cual ocurriría en un medio alcalino (Cooper, 2007; Robaire y Hinton, 2015). Además del pH del medio en esta región hay recambio de proteínas, el exceso de proteínas lumbinales es reabsorbido y a su vez se secreta la proteína inobilina para que se mantengan inmóviles los espermatozoides (De Grava y Klinefelter, 2014). Es la zona de almacenamiento de espermatozoides a la espera de ser expulsados en una eyaculación o ser reabsorbidos por las células claras (Breton *et al.*, 2016; Gervasi y Visconti, 2017).

## 1.4 Tipos de células epididimarias y sus funciones

Las células epididimarias que se encuentran en este órgano son: principales, basales, apicales, halo, claras y estrechas (Fig 3) (Domeniconi *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2018).

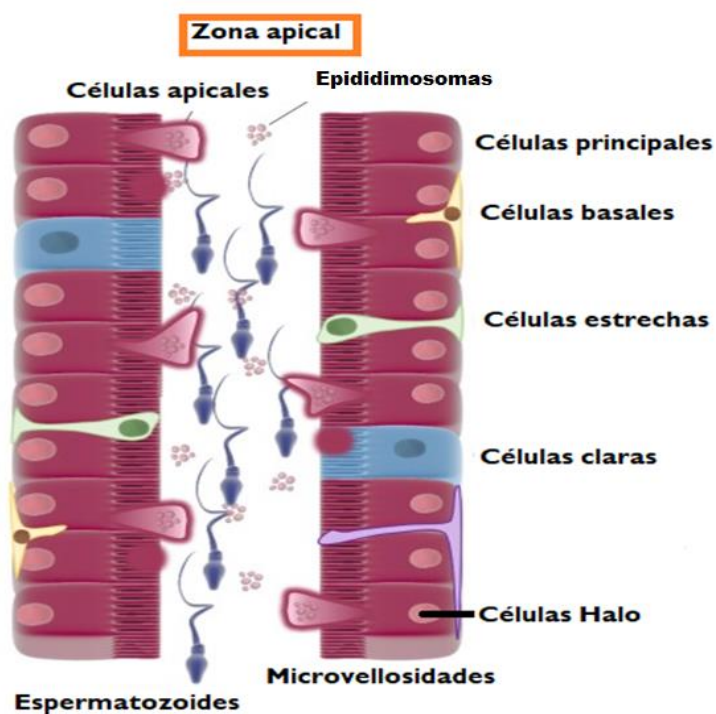


Fig 3. Células del epitelio epididimario, modificado de: Zhou *et al.*, 2018.

Tabla 1. Distribución de las células epididimarias a lo largo del órgano				
Tipo de células	Segmento inicial	Caput	Corpus	Cauda
Principales	Pe	Pe	Pe	Pe
Apicales	Pr	Pe	Pe	Pe
Estrechas	Pe	Pe	Pe	Au
Basales	Pr	Pe	Pe	Pe
Halo	Pe	Pe	Pe	Pe
Claras	Au	Pe	Pe	Pe
Pe: Presentes Au: ausentes Pr: Predominan				

### **a) Células basales**

Son células redondeadas o piramidales, presentan un núcleo finamente granular de cromatina, en el polo de la membrana celular, presentan pliegues profundos y estrechos, presentan estructuras similares a las de la membrana de las células principales, se encuentran situadas en la base de las células cilíndricas de la membrana basal y se comunican con el lado luminal del epitelio a través de proyecciones del cuerpo estrecho e interdigitaciones con las células principales, presentan plasticidad morfológica (Gregory y Cyr, 2014). En ratas adultas tienen alcance luminal solo en el *corpus* y la *cauda* proximal, pero no en otras regiones del epidídimo, siendo los andrógenos reguladores de esta función (Shum *et al.*, 2013), tienen la capacidad de cambiar de forma para ajustar tanto el volumen luminal; estas características sugieren un papel protector (inmunológico) (Zhou *et al.*, 2018).

Estas células solo se localizan en *caput*, *corpus* y *cauda*, y representan del 15 al 20% del epitelio a lo largo del epidídimo, pueden endocitar factores derivados de la sangre o las células principales, se consideran una fuente de renovación celular en el epitelio pseudoestratificado y como células madre de las células principales, según sean las necesidades del conducto epididimario (Challis *et al.*, 2005; Avenel *et al.*, 2011; Robaire y Hinton, 2015).

Dentro de las funciones de estas células se encuentran el control de la secreción de electrolitos con ayuda de las células principales, también regulan la acidificación del lumen de los conductos a través de la producción de óxido nítrico (Cooper, 2007; Robaire y Hinton, 2015). Se les pueden considerar como macrófagos maduros, similares en apariencia a los macrófagos peritubulares que son ocasionalmente localizados en muescas del epitelio epididimario, donde están ausentes las células basales (Breton *et al.*, 2016).

### **b) Células apicales**

Estas células se asemejan a las células principales, pero a diferencia de estas, tienen un característico núcleo esférico situado apicalmente y no tienen contacto con la membrana basal (Robaire y Hinton, 2015) y residen en la región apical del epitelio epididimario, principalmente se encuentran en el

segmento inicial, la región del *caput* y el *corpus*; aunque se sabe poco sobre las funciones específicas de estas células, (Adamali y Hermo, 1996; Challis *et al.*, 2005; Robaire y Hinton, 2015), se ha reportado que participan también en procesos de secreción y endocitosis, que modifican el ambiente luminal, ya que están involucradas en la degradación y eventualmente internalización de proteínas (Adamali y Hermo, 1996).

Tanto estas células como las células estrechas, participan conjuntamente en la acidificación de la luz de los conductos epididimarios (Robaire y Hinton, 2015). De esta forma, ya sea de manera individual o concertada, los elementos celulares del epitelio procuran las condiciones necesarias para que los espermatozoides alcancen su maduración, adquieran su movilidad, así como su habilidad para reconocer y fusionarse con el ovocito y fecundarlo (Adamali y Hermo, 1996; Challis *et al.*, 2005; Gregory y Cyr 2014; Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Mieusset, 2016).

### **c) Células principales**

Las células principales se encuentran en todo el epidídimo, presentan diferencias estructurales y funcionales en cada región de este órgano, que se reflejan en la apariencia y organización del aparato secretor (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gránulos secretores) y aparato endocítico (vesículas, endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas), la endocitosis que llevan a cabo de material existente en el lumen puede ocurrir por absorción o mediado por transportadores (Robaire y Hinton, 2015).

Representan aproximadamente entre el 65% y el 80% del total de las células del epidídimo, constituyen aproximadamente el 80% del total del segmento inicial, y hay una marcada síntesis de proteínas que se liberan al lumen del epidídimo (Challis *et al.*, 2005; Robaire y Hinton, 2015), dentro de las cuales se encuentra la inmovilina (que genera un entorno luminal viscoelástico para inmovilizar mecánicamente a los espermatozoides) (De Grava y Klinefelter, 2014), la secreción de diferentes proteínas intervienen generando un microambiente adecuado; ayudando así, a que se mantenga la composición iónica y el pH adecuados en el lumen; de estas células salen prolongaciones llamadas cilios que se extienden desde las membranas plasmáticas

apicales (Primiani *et al.*, 2007); participan también, en la absorción y secreción del epitelio del túbulo epididimario (Orgebin-Crist y Jahad, 1978; Adamali y Hermo, 1996; Leung *et al.*, 2004; Dacheux *et al.*, 2005; Challis *et al.*, 2005; Shum *et al.*, 2011; Arrotéia *et al.*, 2012; Shum *et al.*, 2013; Domeniconi *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2018).

Los principales andrógenos que intervienen en la regulación del epidídimo son: la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, la 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$  y 17 $\beta$ -estradiol. El mayor producto del metabolismo de la testosterona es la DHT, el cual es generado precisamente por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, la cual se encuentra en estas las células principales del epidídimo (Tekpetey *et al.*, 1989; Robaire y Viger, 1995; Robaire *et al.*, 2007). La zona más activa en la secreción de proteínas es el *caput* y es de aquí de donde las células principales empiezan a secretar a los epididimosomas (transportadores) y se propone como la principal forma de transferir proteínas y otras partículas al espermatozoide (Zhou *et al.*, 2018).

Las células principales, además de la síntesis de proteínas, absorben los fluidos que provienen de los túbulos seminíferos y secretan serotonina, prostaglandinas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y electrolitos (Sullivan *et al.*, 2007). Transportan sodio a su interior desde el lumen por medio de canales de sodio-potasio, por lo que se ha sugerido que desempeñan un papel en la maduración de los espermatozoides (Primiani *et al.*, 2007; Robaire y Hinton 2015).

#### **d) Células claras**

Se caracterizan por una región apical con numerosas depresiones revestidas, endosomas, cuerpos multivesiculares, y lisosomas, una región basal donde se ubica el núcleo y una cantidad variable de gotas lipídicas. La función endocítica de estas células es mucho mayor que la correspondiente realizada por las células principales adyacentes, sobre todo en la cola del epidídimo, además, participan junto con las células estrechas en la acidificación del fluido (Herme *et al.*, 1988; Robaire y Hinton, 2015). Se distinguen de las demás células epiteliales por la presencia de micropliegues en la superficie (Hamzeh y Robaire, 2008).

Se encargan de la absorción y digestión de los detritos de espermatozoides, intervienen en el recambio de la fase fluida de los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo, sin embargo estas células no se encuentran presentes en el segmento inicial del epidídimo de la rata (De Grava y Klinefelter, 2014; Akbarsha *et al.*, 2015), otras de las funciones son: estimular la secreción de protones, pueden ser responsables de la depuración de las proteínas del lumen y absorben el contenido de las gotas citoplasmáticas liberadas por los espermatozoides (Cooper, 2007; Robaire y Hinton, 2015).

#### **e) Células Estrechas (Oscuras)**

Las células estrechas, se encuentran solo en la etapa adulta de los mamíferos (rata) en el segmento inicial y la zona intermedia. Se caracterizan por sus numerosas vesículas apicales localizadas en forma de copa que están involucradas en la endocitosis (Hess *et al.*, 2000). Estas células se diferencian de las células principales y apicales por la expresión de diferentes proteínas, también se ha observado que pueden ser precursores de células claras, e intervienen en la secreción de iones H<sup>+</sup> hacia la luz del conducto epididimario y solo representan el 3% del epitelio epididimario (Adamali y Hermo, 1996; Challis *et al.*, 2005).

Al igual que las otras células del epidídimo estas forman parte de la Barrera Hemato-Epididimaria (BHE), al formar una red de uniones estrechas entre las células epiteliales adyacentes, dentro de sus funciones están la de regular el contenido del lumen al limitar el movimiento paracelular de iones entre la sangre y el epidídimo (Gregory y Cyr, 2014; Zhou *et al.*, 2018).

#### **f) Células Halo**

Estas células se localizan en todo el epidídimo y se distinguen por tener un núcleo denso con cromatina condensada periférica, así como un citoplasma de color pálido con un borde estrecho, normalmente se localizan en la base del epitelio, pero al ser células migratorias, se encuentran a diferentes alturas a lo largo del epitelio en espacios despejados; presentan gránulos que contienen cuerpos multivesiculares y un gran retículo endoplásmico (Challis *et al.*, 2005; Robaire y Hinton, 2015; Akbarsha *et al.*, 2015).

Desempeñan un papel inmunológico, y se ha descrito a estas células como linfocitos intraepiteliales que corresponden a los CD4<sup>+</sup> y CD8 (Seiler *et al.*, 2000; Robaire y Hinton, 2015; Akbarsha *et al.*, 2015).

Es importante tomar en cuenta que, la distribución, proporción y funciones de los diferentes tipos celulares, difiere entre los distintos segmentos del epidídimo, esta situación va a generar un microambiente controlado que provee a los espermatozoides de ambiente adecuado conforme van recorriendo al epidídimo (Robaire y Hinton, 2015).

### **1.5 Desregulación del eje Hipotálamo Hipófisis Testosterona inducido por el sobrepeso y la obesidad**

De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS), el sobrepeso se presenta cuando hay un aumento del peso corporal causado por una acumulación anormal de grasa por encima de los valores que indica el índice de masa corporal para normopeso (IMC) (WHO, 2017). En humanos se considera sobrepeso cuando los valores son de 25 a 30 kg/m<sup>2</sup>, mientras que para obesidad se considera >30 kg/m<sup>2</sup>, actualmente la obesidad se considera una “epidemia del siglo XXI” y un problema de salud pública presente a nivel mundial caracterizada por un exceso de tejido adiposo (Cabler *et al.*, 2010; Du Plessis *et al.*, 2010; WHO, 2017).

Actualmente no se cuentan con estudios del sobrepeso con alteraciones fisiológicas, la obesidad ha sido más estudiada y se reporta que es responsable de inducir un gran número de efectos negativos como, por ejemplo: la diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico, así como, la disminución en la fertilidad masculina y fecundidad (Barrera-Cruz *et al.*, 2013; Barqueira *et al.*, 2010; Guarnieri *et al.*, 2010; Cachofeiro *et al.*, 2006; Araya, 2013; Swan *et al.*, 2000; Chunghtai *et al.*, 2011).

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino del 2016 (ENSANUT-MC) reporta que, los adultos de 20 años o más, presentan una prevalencia de incremento de peso en un 75%, de los individuos en los cuales se combina tanto el sobrepeso como la obesidad. La Organización para



la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) el 32% de la población adulta presenta obesidad, ubicando a México como la segunda población a nivel mundial con más casos de obesidad, ya que, en la actualidad, más del 70% de los habitantes la padecen. Esto nos indica que, probablemente la obesidad y el sobrepeso pueden ser factores a considerar, en los problemas de fertilidad en parte de la población masculina mexicana (ENSANUT-MC, 2016; OCDE, 2016).

Anteriormente se mencionaron algunas alteraciones o padecimientos que se pueden presentar con la obesidad (Du Plessis *et al.*, 2010; Teerds *et al.*, 2011). A nivel reproductivo se ha encontrado en México un índice elevado de hombres que presentan obesidad y que a su vez son infértiles (Valderrama *et al.*, 2016).

Se considera infertilidad cuando una pareja no ha tenido éxito en procrear y después de haber tenido relaciones sexuales regularmente por 12 meses sin protección anticonceptiva sin que se logre el embarazo, la causa de este problema puede ser derivada de alguna alteración o enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino (Oliver y Mach, 2016; Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). En el caso específico de la infertilidad masculina las principales causas que se sugieren son: desequilibrio hormonal, problemas genéticos, vasculares y la obesidad (de Souza *et al.*, 2017; El Salam, 2018).

La obesidad afecta a la fertilidad, al inducir un desbalance hormonal al disminuirse los niveles de T e incrementarse los de estradiol ( $E_2$ ) (Chapin y Creasy, 2012). La elevación de  $E_2$  va ejercer una retroalimentación negativa en el eje HHT favoreciendo aún más la disminución de T, la cual a su vez va modificar los procesos de espermatogénesis (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2017; Ferramosca *et al.*, 2018). Por otro lado, la obesidad inducirá otra serie de cambios hormonales que tendrán como resultado el incremento de las concentraciones de leptina, insulina y  $E_2$ , y como se comentó antes, una disminución en los niveles plasmáticos de T (Du Plessis *et al.*, 2010; Farooqi, 2011). Estos cambios hormonales pueden generar diversos problemas como: oligozoospermia, azoospermia, un aumento en el índice de fragmentación del ADN del espermatozoide y una disminución del volumen seminal. La suma de todos estos cambios, y sus efectos, muestran unan clara

correlación entre la obesidad y la infertilidad masculina (Lolmède *et al.*, 2015; Oliver y Mach, 2016).

En humanos, se tienen ya estudios que reportan que el exceso de tejido adiposo periférico incrementa la conversión de T a E<sub>2</sub> generando un hipogonadismo inducido, por un lado, como consecuencia de una supresión del eje reproductivo, y por otro, por la reducción de los niveles totales de T unidos a globulina fijadora de las hormonas sexuales (SHBG), y la presencia de hiperestrogenismo por la aromatización de T (Chunghtai *et al.*, 2011).

Si bien la gran mayoría de los estudios han sido realizados en sujetos que presentan obesidad, pocos estudios se han realizado para determinar el impacto del sobrepeso en la salud, en particular en algunas alteraciones de la fertilidad masculina, por lo cual, el interés de este proyecto fue evaluar el impacto que tiene el sobrepeso y la obesidad en el análisis morfométrico epididimario histológico de la morfología celular del epidídimo y los parámetros espermáticos.

## 2. ANTECEDENTES

En la actualidad se cuenta con una serie de estudios que relacionan la obesidad con alteraciones reproductivas, sin embargo, la relación del sobrepeso con la reproducción no ha sido evaluada. Para el estudio de la obesidad se han realizado investigaciones utilizando modelos animales, a los cuales se les induce un desbalance energético, obteniendo animales con diferentes grados de obesidad (Luque *et al.*, 2015; Liu y Ding, 2017), en ninguno de los estudios se ha considerado el sobrepeso como un parámetro a investigar.

En esos estudios, se ha administrado una dieta alta en carbohidratos o lípidos, el incremento de peso que presentan las ratas, se asocia con un aumento en los niveles de leptina, lípidos, glucosa, etcétera (Zhang y Scarpace, 2009). En otro estudio realizado en ratas de la cepa Wistar, a los cuales se les administro una dieta con un 60% de grasa por 15 semanas, observando un incremento de peso corporal con relación al grupo que tuvo una dieta equilibrada y un incremento en las concentraciones de leptina.

En ratas Wistar, en un estudio de obesidad inducido con una dieta que contenía 60% de grasa administrada por tiempo prolongado, se obtuvo una ganancia rápida de peso con incremento significativo de la grasa corporal, los animales presentaron modificaciones hormonales del eje reproductivo, así como, en la maduración espermática, el aumento de grasa corporal ocasiona cambios en los niveles de algunas adipocinas como la leptina, reportándose incremento en la concentración, además del colesterol y triglicéridos.

Vigueras-Villaseñor y colaboradores (2011), mostraron en un estudio realizado también en ratas Ratas Sprague–Dawley, que, la obesidad induce cambios morfológicos en la estructura epididimaria al observarse: presencia de cuerpos apoptóticos en el lumen del *caput* del epidídimo, sugiriendo que los cambios en los niveles séricos de leptina, hormonas esteroides, insulina, colesterol y triglicéridos modifican la función testicular y epididimaria.

En un estudio reciente Zhao y colaboradores (2018) demostraron que la administración en roedores murinos con una dieta alta en grasa administrada desde la pubertad hasta la edad adulta, puede ocasionar un aumento en el daño de las células de Leydig, peroxidación de lípidos y aumento en la concentración de Leptina; así como, una disminución en el conteo y movilidad de espermatozoides, peso relativo de los testículos y T.

Recientemente Yan-Fei y colaboradores (2018) reportaron que las ratas con obesidad inducida (dieta alta en grasa) presentaban: disfunción del metabolismo de los lípidos, alteración de los niveles hormonales, aumento de los niveles de estrés oxidante en los tejidos del testículo, hipogonadismo primario leve, una función anormal del eje HHT; sin embargo, los efectos a largo plazo causados por la obesidad, pueden causar una disminución en la fertilidad masculina (Jia *et al.*, 2018).

En pacientes obesos se ha reportado la presencia de una gran cantidad de grasa en el escroto, la cual induce un incremento en la temperatura (Bellastella *et al.*, 2019), esto puede tener como consecuencia estrés oxidante como: oxidación de lípidos, aminoácidos y carbohidratos, así como, daño al ADN, induciendo daños en los espermatozoides almacenados en epidídimo, y como consecuencia cambios en los parámetros espermáticos (Aitken, 1997; Sullivan *et al.*, 2005; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2011; Michalakis *et al.*, 2013; Liu y Ding, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la obesidad va a tener una repercusión directa en el eje reproductivo HHT, la liberación de GnRH depende tanto de un balance energético como de una adecuada relación testosterona/estradiol. Al presentarse un balance energético positivo que va aumentar el tejido adiposo favoreciendo una mayor conversión de T a E<sub>2</sub>, causando problemas de fertilidad en los hombres (Michalakis *et al.*, 2013).

Es también importante señalar que, la secreción y actividad del epitelio epididimario, es andrógeno dependiente; funciones como la secreción de glicerofosfatilcolina, ácido siálico, compuestos de baja masa molecular que, junto con los cambios en la producción espermática y hormonal, crean un microambiente específico a lo largo del epidídimo (Turner *et al.*, 2003), pueden

ser modificados por la obesidad alterándose el proceso de maduración espermática epididimaria (Bilińska *et al.*, 2006) y la supervivencia de los espermatozoides (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017).

Hasta el momento la mayoría de los estudios se han realizado en animales o pacientes obesos, sin embargo, los cambios generados por el desbalance energético inician cuando se establece el sobrepeso en un individuo, lo cual no ha sido considerado hasta el momento. Debido a esto, en el presente trabajo se analizó el efecto del sobrepeso y la obesidad en los parámetros espermáticos relacionados con los cambios en la morfología epididimaria.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El abordar directamente el problema de sobrepeso y obesidad en el humano es complejo debido a una gran cantidad de variables que no son controlables, por esto se sugiere utilizar un modelo animal como la rata, como una alternativa viable y controlable para inducir sobrepeso y obesidad.

La información analizada sugiere un posible efecto de la obesidad en el proceso de maduración espermática epididimaria, hasta el momento, no se han realizado estudios que relacionen los cambios histológicos epididimarios con los parámetros espermáticos y la maduración espermática, conocimiento que se requiere para coadyuvar a un mejor manejo reproductivo en pacientes obesos.

### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial cada vez más generalizado en los varones y se ha relacionado con la infertilidad, al reducir los parámetros y la calidad del espermática, como es la viabilidad.

El mecanismo por el cual la obesidad puede tener un efecto negativo en los parámetros espermáticos, se tiene hasta el momento parcialmente descrito, en el caso del sobrepeso no se ha valorado, por esta razón, es importante estudiar cada uno de los factores que se pueden relacionar con la infertilidad, bajo estas dos condiciones.

Entre los factores que pueden contribuir a la reducción de la fertilidad, se encuentran: alteraciones hormonales generadas por el incremento de tejido adiposo, que se expresa en cambios del análisis morfométrico de los órganos dependientes de andrógenos que tiene como consecuencia cambios en los parámetros seminales. Debido al impacto negativo de la obesidad y muy probablemente del sobrepeso en la salud reproductiva, se requiere realizar estudios que permitan aportar nuevos elementos para plantear en un futuro, estrategias para prevenir o revertir en lo posible el problema de infertilidad.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo afecta el sobrepeso y la obesidad en la morfología epididimaria y los parámetros espermáticos en la rata Wistar?

## **6. HIPÓTESIS**

Si el aumento del peso corporal induce sobrepeso y obesidad, se modificará la histomorfología del epitelio epididimario entonces los parámetros espermáticos se verán modificados dependiendo del peso.

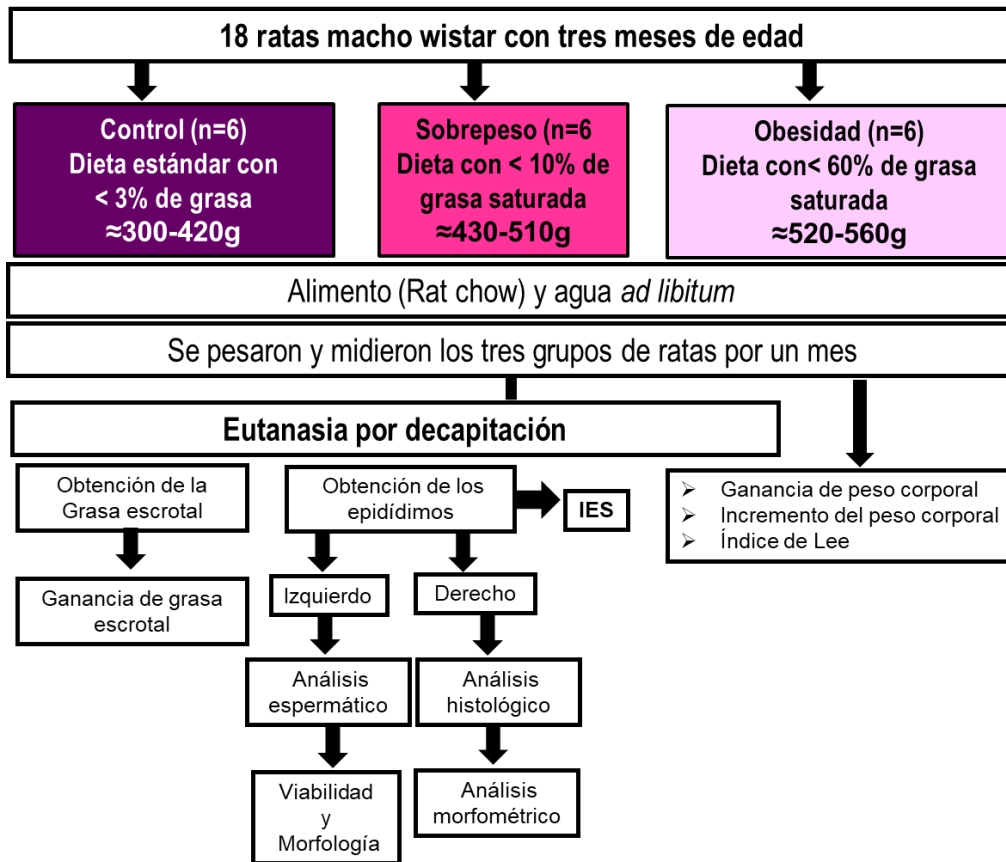
## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del sobrepeso y obesidad en el análisis morfométrico epididimario y los parámetros espermáticos.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Validar que la dieta alta en grasa induce sobrepeso y obesidad.
- 2) Determinar si la grasa epididimaria aumenta con el sobrepeso y obesidad.
- 3) Caracterizar los cambios en el epitelio epididimario inducido por el sobrepeso y la obesidad.
- 4) Identificar los cambios en los parámetros espermáticos (viabilidad y morfología espermática) en condiciones de sobrepeso y obesidad.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS



**Fig 4.** Diseño experimental

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar, con una edad de 3 meses y un peso aproximado de 300 g, divididos en tres grupos con igual número de animales (n=6). Las ratas se obtuvieron del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y se mantuvieron bajo condiciones estándar (temperatura controlada de  $20\pm 2$  °C y ciclo de 12/12 luz-oscuridad) y cama de aserrín, siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 que se indica en el artículo 5. El agua y alimento estuvo disponible *ad libitum*, cada grupo recibió una dieta específica; diariamente se registró el consumo de alimento y el peso de las ratas, durante 30 días consecutivos (Fig 4).



### 9.1 Administración de las dietas

Las dietas que se administraron a los grupos experimentales son las siguientes:

**Grupo 1 (Control):** recibieron, una dieta estándar: Alimento Purina rat Chow 5001 (3% de grasa) y agua *ad libitum*. Se esperaba mantener un peso aproximado de 300 a 420g.

**Grupo 2 (sobrepeso):** recibieron, Alimento rico en grasas, marca Test Diet, contenido de grasas 10% (Energy F/fat PD Yellow) (Molinar, 2015) y agua *ad libitum*. Se esperaba obtener un peso entre 430 y 510g.

**Grupo 3 (obesos):** recibieron, Alimento rico en grasas, marca Test Diet, contenido de grasas 60% (Energy F/fat PD y PD Blue) (Molinar, 2015) y agua *ad libitum*. Los animales debían de obtener un peso entre 520 a 600g.

### 9.2 Peso corporal de las ratas

Para reportar la ganancia de grasa corporal, se utilizó el índice de Lee parámetro antropométrico que relaciona el peso y la longitud corporal, este parámetro es un predictor de obesidad (Bernardis y Patterson, 1968).

**Índice de Lee**= raíz cúbica del peso corporal (g)/ longitud naso-anal (cm).

### 9.3 Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación (NOM--062-ZOO-1999 rubro 5.3.12). Los restos fueron colocados en bolsas de polietileno, y se llevaron al bioterio de la UAM Iztapalapa para ser congelados y posteriormente eliminados de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

### 9.4 Obtención del epidídimo y peso epididimario

Se extrajeron los epidídimos, haciendo una incisión a nivel ventral desde la región terminal del esternón hasta la sínfisis púbica, para tener acceso al aparato reproductivo, y así observar las estructuras perigonadales, al observar las gónadas, se separó la grasa que se encontraba alrededor de la región cefálica de los epidídimos, mismos que se pesaron para determinar el índice epididimario somático (IES) en una balanza analítica (250/0,0001 G PW254, ADAM) (Malafaia *et al.*, 2013). **IES** = (Peso epididimario/peso de la rata) (100)

El epidídimo derecho se disecó y fue fijado en formalina neutra al 10% y el izquierdo se seccionó en sus tres regiones anatómicas gruesas (*caput, corpus y cauda*) de acuerdo con el procedimiento descrito por Cervantes y colaboradores (2008), para realizar las espermatobioscopias.

### **9.5 Extracción de espermatozoides**

En cada una de las tres regiones del epidídimo izquierdo (*caput, corpus y cauda*), se extrajeron los espermatozoides, induciendo la liberación de los mismos, mediante un corte en las tres regiones del epidídimo (*caput, corpus y cauda*), y así poder separar el fluido con espermatozoides del tejido epididimario (León-Galvan *et al.*, 1999).

Una vez obtenida la muestra se determinaron los siguientes parámetros: viabilidad y morfología de los espermatozoides, basándonos en el método descrito en el Manual de Laboratorio para la examinación y procesamiento del semen humano (WHO, 2017), y manual para el análisis de la cópula y el eyaculado en la Rata Albina (*Rattus norvegicus*) (Lucio *et al.*, 2009).

### **9.6 Parámetros espermáticos**

Del fluido que se obtuvo de las tres zonas del epidídimo (*caput, corpus y cauda*) izquierdo, se extrajeron los espermatozoides, y se depositaron en una placa con cuatro pozos (una para cada zona), adicionados con solución de ringer (100 µl), una vez colocados los espermatozoides en la solución se resuspendieron y se realizaron los siguientes análisis:

### **9.7 Viabilidad espermática**

El análisis de viabilidad analizó el número de espermatozoides vivo y muertos expresado en porcentaje. Se colocaron 3 µl de los espermatozoides que se resuspendieron sobre un portaobjetos, previamente etiquetado y atemperado a 37°C. Posteriormente se adicionaron sobre la muestra 2 µl de eosina nigrosina (EN), se mezclaron y se realizó el frotis. El análisis se realizó en un microscopio de campo claro. Se contaron los espermatozoides que se tiñeron de rosa (espermatozoides que se consideraron muertos) y los que no se tiñeron (espermatozoides que se consideraron vivos), hasta completar un total de 200 espermatozoides. Se hizo un promedio y el resultado se expresó en porcentaje.

## **9.8 Morfología espermática**

La morfología de los espermatozoides se evaluó analizando la misma muestra que se utilizó para el reporte de la viabilidad. Se contaron 200 espermatozoides al azar en diferentes campos. Se cuantificó el número de espermatozoides que presentaban anomalías en la cabeza, pieza media y el flagelo, así como la presencia de la gota citoplasmática. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje como indica el manual de la OMS.

## **9.9 Procesamiento histológico**

Después de segmentar el epidídimo en *caput*, *corpus* y *cauda*, posteriormente fueron fijados en formalina neutra al 10%, y realizar los estudios histológicos utilizando las tinciones de Eosina-Hematoxilina y Tricrómica de Masson (TM).

Una vez fijados los epidídimos en formalina neutra al 10%, se lavaron en alcohol de 70° posteriormente se siguió la técnica histológica de rutina la cual consiste en:

- a) Deshidratación por medio de alcoholes graduales.
- b) Aclaramiento de los tejidos en xilol.
- c) Impregnación en parafina.
- d) Inclusión definitiva en parafina.

Se realizaron cortes de 4 $\mu$ , posteriormente se tiñeron por las dos técnicas anteriormente mencionadas, se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de cada región del epidídimo (Bancroft, 1995).

### **9.9.1 Análisis histológico cualitativo**

Para el análisis morfométrico y cualitativo se utilizó un analizador de imágenes KS 300 Zeiss. Se analizaron con un objetivo de 40X, un total de 120 imágenes por cada animal (30 conductos por cada región *caput*, *corpus* y *cauda*).

Para la descripción histológica se consideró forma del conducto, tipo de epitelio, cambios en el epitelio, así como distribución de espermatozoides en la luz del conducto.

La identificación de los tipos celulares se realizó siguiendo los siguientes criterios (Ross *et al.*, 2009).

Células principales: residen desde la membrana basal, presentan forma columnar con presencia de cilios que se extienden hasta la luz del túbulo epididimario

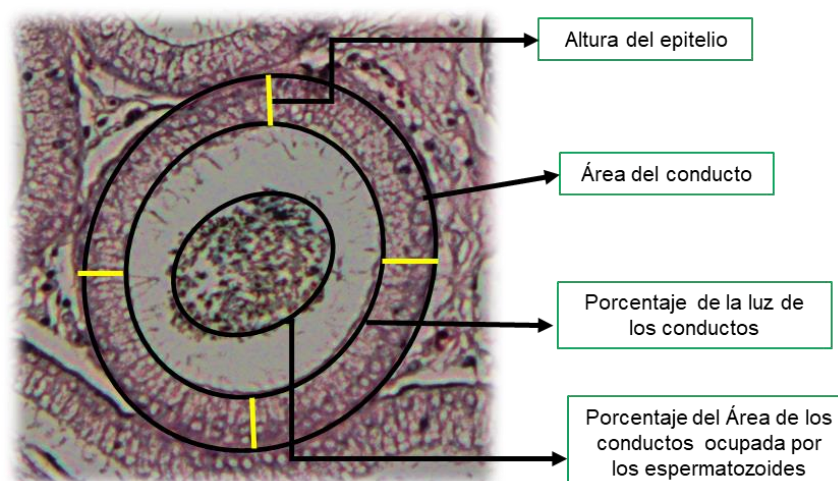
Células basales: se localizan sobre la lámina basal, son pequeñas y esféricas.

### 9.9.2 Análisis morfométrico del epidídimo

En el análisis morfométrico se determinó el área total del conducto, el área de la luz del conducto, el área ocupada por los espermatozoides dentro del conducto y por último la altura del epitelio epididimario (**Fig 5**) en 20 túbulos por cada región del epidídimo (*caput, corpus y cauda*) por cada animal.

Para determinar la altura del epitelio epididimario en cada conducto se tomaron cuatro medidas en forma de cruz (**Fig 5**).

A partir del área del conducto y el área de la luz se calculó el porcentaje que ocupa la segunda en relación a todo el conducto. El porcentaje del área ocupada por los espermatozoides se obtuvo en relación al área de la luz del conducto.



**Fig 5.** Morfometría epididimaria. Parámetros morfológicos analizados en los conductos epididimarios.

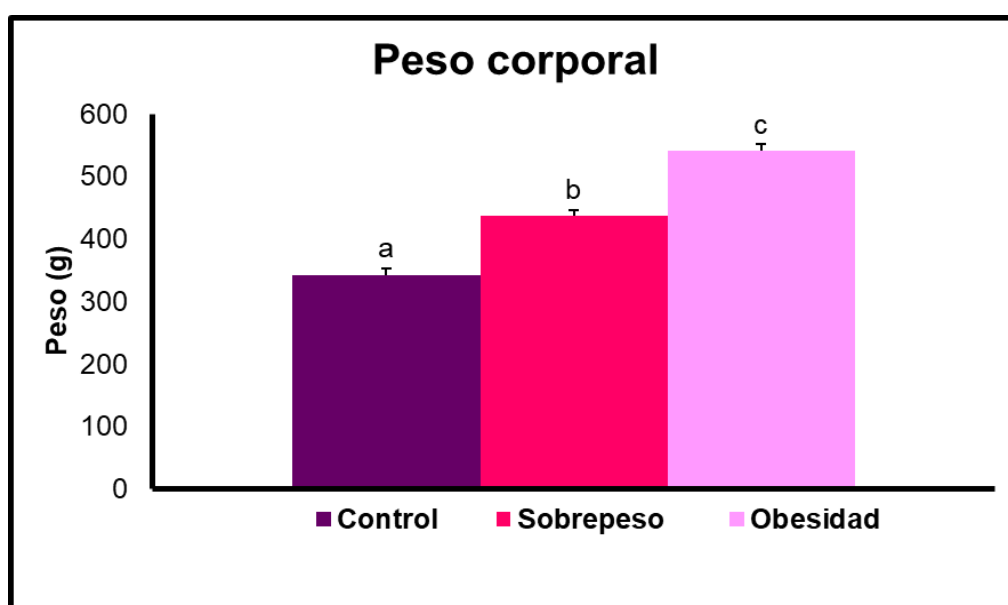
## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa NCSS 12. Los datos se expresan como la media más el error estándar (EE). Para determinar las diferencias estadísticas de los resultados analizados se realizó una ANOVA múltiple y una prueba pos hoc Newman Keuls, para el peso corporal, grasa escrotal, índice epididimario somático, espermatobioscopias, área de los conductos, altura del epitelio y el porcentaje del área de los conductos ocupada por los espermatozoides y el porcentaje de la luz de los conductos una prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ); para comparar las diferencias entre los grupos. Se consideraron diferencias a partir de una significancia de  $p < 0.05$ .

## 11.RESULTADOS

### 11.1 Peso corporal

La ganancia de peso corporal en las ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar y una dieta hiperlipídica de 10% y 60 %, indujeron sobrepeso con la primera dieta y obesidad con la segunda (**Fig 6**). El análisis estadístico muestra que la dieta hiperlipídica tanto del 10% como del 60% induce significativamente una mayor ganancia de peso comparado con el grupo Control (23.7% y 53.54 %), la diferencia entre sobre peso y obesidad también fue significativa (29.84%) ( $F_{2,18}=108.895$   $p < 0.001$ ).



**Fig 6.** Ganancia de peso corporal ( $\bar{X} \pm EE$ ) en las ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar y una dieta hiperlipídica durante 4 semanas. Letras diferentes, muestran diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ). ANOVA múltiple, prueba post hoc Newman Keuls.

### 11.2 índice de Lee

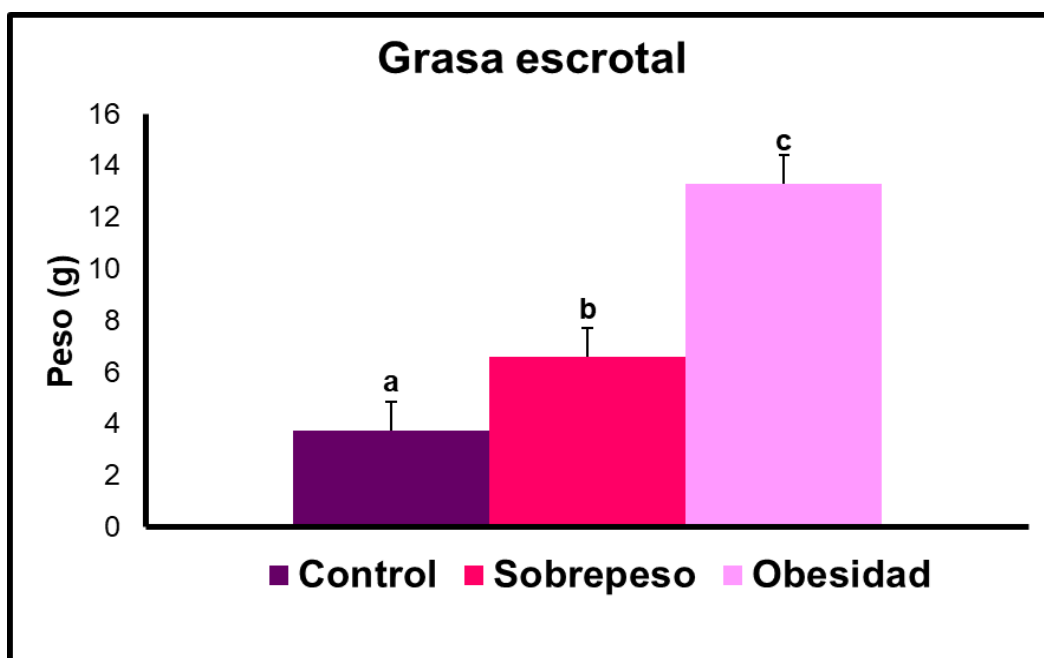
Al calcular índice de Lee (Bernardis y Patterson, 1968), se obtuvo un valor de 0.291 en las ratas control, en las ratas con 10% (sobrepeso) se obtiene un valor de 0.329, mientras que en el grupo con 60% con dieta hiperlipídica (obesos) es de 0.339 (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Índice de Lee en control y los grupos experimentales: sobrepeso y obesidad.

Tabla 2. Índice de Lee			
Grupos experimentales	Control	Sobrepeso (10%)	Obesidad (60%)
Índice de Lee	0.291	0.329	0.339
Valor en normo peso < 0.3			

### 11.3 Grasa escrotal

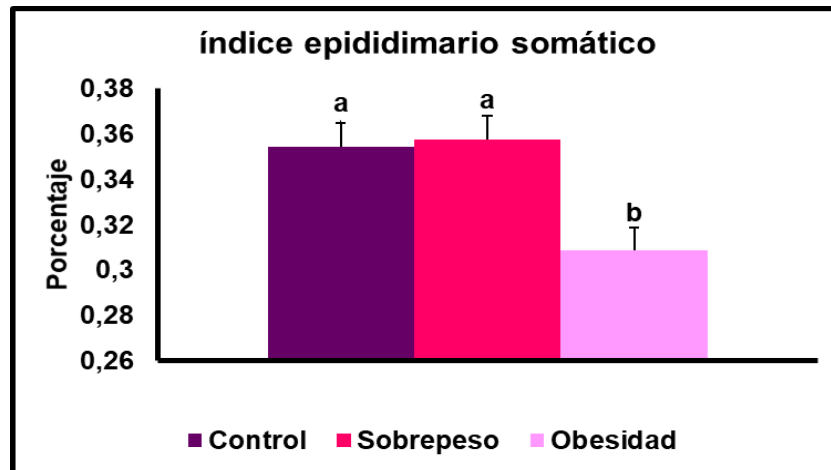
La grasa escrotal mostró un incremento del doble en el grupo con sobrepeso con relación al control y cuatro veces más en el grupo de obesidad con relación al control y el doble que el grupo de sobrepeso ( $F_{2,18} = 30.9046$   $p < 0.001$ )



**Fig 7.** Ganancia de grasa escrotal ( $\bar{X} \pm EE$ ), en ratas Wistar con sobrepeso y obesidad. Letras diferentes, muestran diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ). ANOVA múltiple, prueba post hoc Newman Keuls.

## 11.4 Índice epididimario somático

El análisis estadístico muestra una disminución en el tamaño del epidídimo sólo en las ratas obesas comparado con el grupo control y el de sobrepeso mostrando diferencias significativas ( $F_{2,18}=7.1273$   $p < 0.001$ )



**Fig 8.** Índice epididimario somático ( $\bar{X} \pm EE$ ), el grupo control y sobrepeso observan diferencias significativas con el grupo de obesidad. Letras diferentes, muestran significativas entre los grupos ( $p < 0.01$ ). ANOVA múltiple, prueba post hoc Newman Keuls.

## 11.5 Espermatobioscopias

En las espermatobioscopias se reportaron los parámetros obtenidos de las tres divisiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) en donde se observan las siguientes características de los espermatozoides: viabilidad, en el grupo control fue de 96% y en el grupo con sobrepeso disminuyó hasta 70% y en el de obesidad disminuyó hasta un 32%, ( $F_{2,18}=107.57$   $p < 0.001$ ). Las anomalías en la cabeza amorfa ( $F_{2,18} = 25.63$   $p < 0.001$ ), solo se observan diferencias significativas en el grupo con obesidad con respecto al control. En la pieza media angulada ( $F_{2,18}=50,02$   $p < 0.001$ ), y asimétrica ( $F_{2,18}=13,5395$   $p < 0.001$ ), así como en flagelo angulado ( $F_{2,18}=49,74$   $p < 0.001$ ) y enrollado ( $F_{2,18} = 9,41$   $p < 0.001$ ) se muestran diferencias significativas entre los tres grupos, control, sobrepeso y obesidad (**Tabla 3**).



Tabla 3. Reporte de espermatobioscopias			
Parámetro %	Control	Sobrepeso	Obesidad
Vivos	96 ± 3.1 <sup>a</sup>	70 ± 3.1 <sup>b</sup>	32 ± 3.1 <sup>c</sup>
<b>Anormalidades</b>			
Cabeza "Amorfa"	1 ± 0.2	2 ± 0.2	3 ± 0.2
<b>Pieza media</b>			
Angulada	7 ± 1.9 <sup>a</sup>	19 ± 1.9 <sup>b</sup>	34 ± 1.9 <sup>c</sup>
Asimétrica	0	1 ± 0.2	1 ± 0.2
<b>Flagelo</b>			
Angulado	13 ± 3 <sup>a</sup>	45 ± 3 <sup>b</sup>	52 ± 3 <sup>c</sup>
Enrollado	2 ± 3.4 <sup>a</sup>	14 ± 3.4 <sup>b</sup>	23 ± 3.4 <sup>c</sup>

**Tabla 3.** Viabilidad ( $\bar{X} \pm EE$ ), Anormalidades en la pieza media angulada, así como en el flagelo angulado y enrollado. Letras diferentes, muestran diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ). ANOVA múltiple, prueba post hoc Newman Keuls.

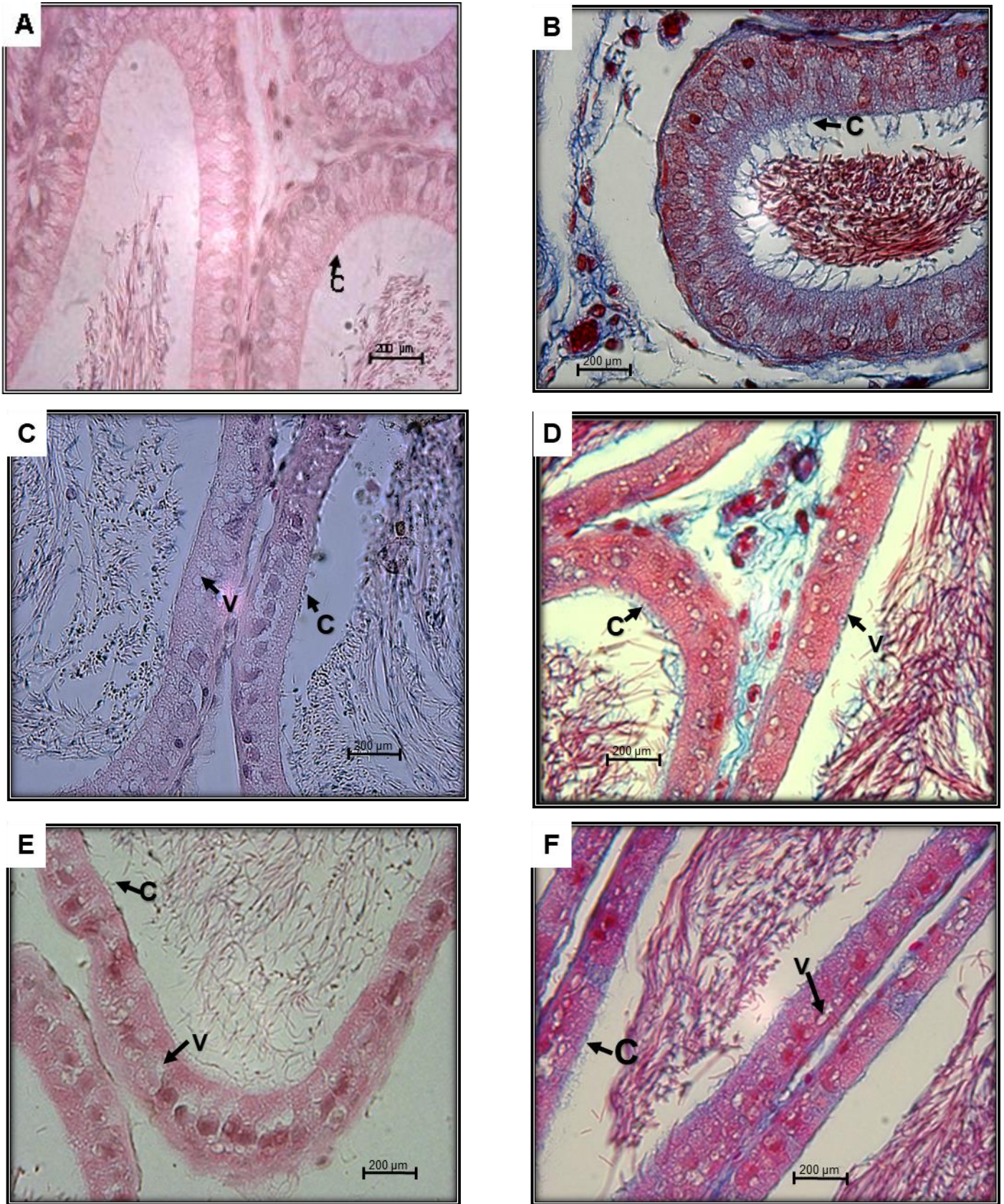
### 11.6 Análisis histológico cualitativo del epidídimo

#### Región del *Caput*:

**Control:** los conductos presentan una forma redonda, con una luz reducida, epitelio pseudoestratificado (células basales y principales) grueso con cilios largos y abundantes; en el centro del conducto se observan los espermatozoides agrupados (**Fig 9A y 9B**).

**Sobrepeso:** A diferencia del control los conductos se observan de forma ovalada con una mayor luz, el epitelio es más delgado y presenta vacuolas, los cilios son escasos y cortos. El área ocupada por los espermatozoides en la luz del conducto es mayor y no se observan tan agrupados como en el control (**Fig 9C y 9D**).

**Obesidad:** En este grupo los conductos se observan con formas irregulares, presentan una mayor luz en comparación con el grupo control, el epitelio pseudoestratificado es muy delgado y se observan menor número de cilios los cuales son pequeños. En el epitelio se observan vacuolas abundantes y de mayor tamaño que las que se observaron el grupo con sobrepeso. Los espermatozoides se encuentran más dispersos ocupado en algunos casos toda la luz del conducto (**Fig 9E y 10F**).



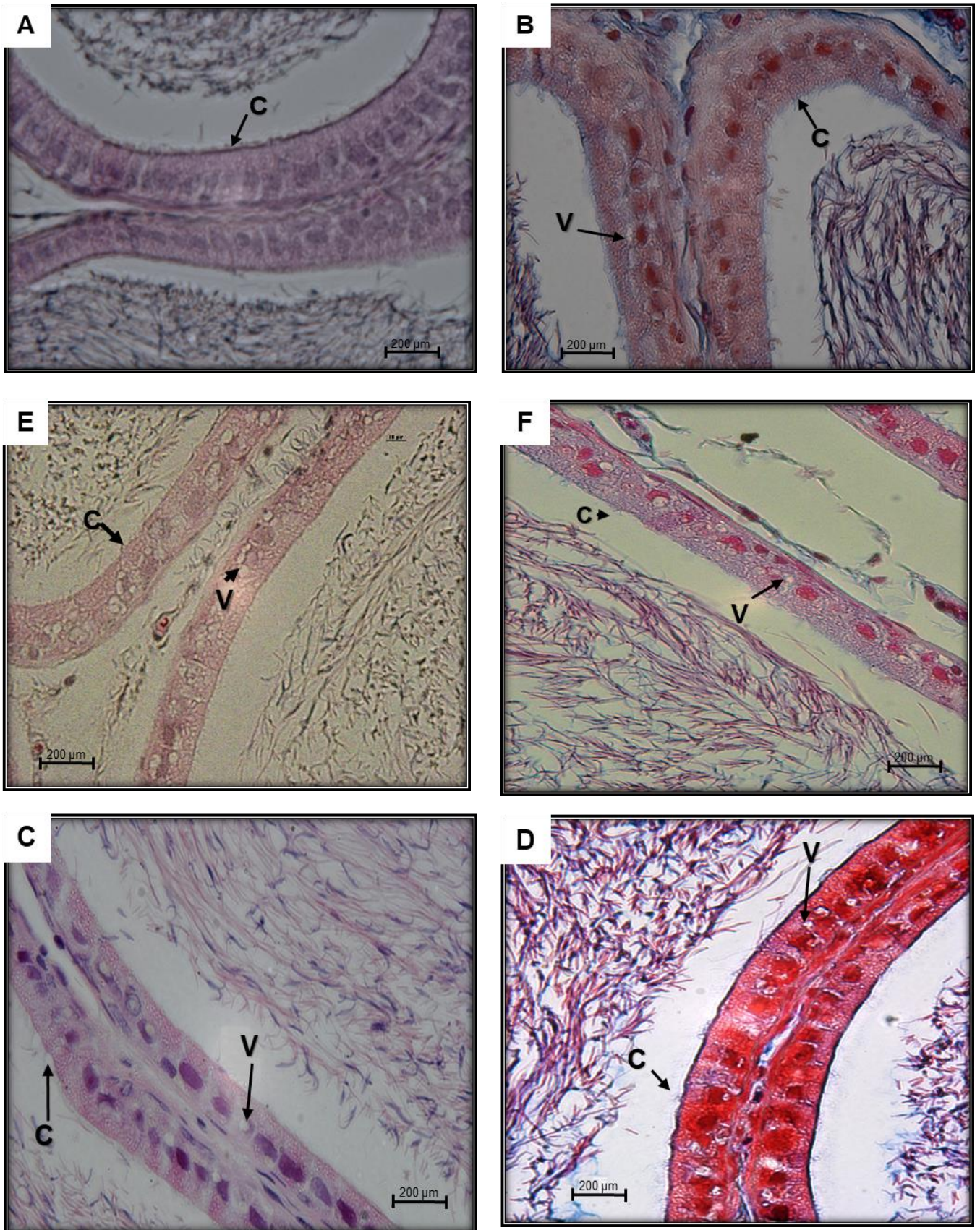
**Fig 9.** Corte transversal de la zona del *caput* del epidídimo con tinción H-E y TM, en los grupos con sobrepeso y obesidad se observan cambios en la forma de los conductos disminución del epitelio, así como del número de cilios y el largo de estos. Se observa la presencia de vacuolas en el epitelio en los grupos tratados. A (Control/ H-E), B (Control/ TM), C (Sobrepeso /H-E), D (sobrepeso/H-E) y E (Obesidad/ H-E), F (Obesidad/ TM). (C) cilios, (V) vacuolas. Barra 200µm.

### **Región del *Corpus*:**

**Control:** La forma de los conductos es redonda o ligeramente ovalada formados por un epitelio pseudoestratificado, más delgado que el de la cabeza, con menor número de cilios y de apariencia más delgados que los de la cabeza y largos, los espermatozoides al igual que en la cabeza se observan agrupados en el centro del conducto (**Fig 10 A y 10 B**).

**Sobrepeso:** La forma de los conductos es ovalada, el epitelio que los conforman es pseudoestratificado y delgado; en comparación con el control se observa menor presencia de cilios y cortos, en esta región se observa también la presencia de vacuolas de tamaño grande en el epitelio. Los espermatozoides se encuentran en la luz del conducto da la apariencia que están más disgregados que en el control (**Fig 10 C y 10 D**).

**Obesidad:** Los cambios que se presentan son muy similares a los que se describieron en el *caput* ya que el epitelio pseudoestratificado es muy delgado con escasos cilios y de tamaña no muy pequeño, la forma de los conductos es irregular y se observa un gran número de vacuolas en el epitelio. En la luz del conducto la apariencia del espacio ocupado por los espermatozoides es similar a la que se observa en el grupo de sobrepeso (**Fig 10E y 10F**).



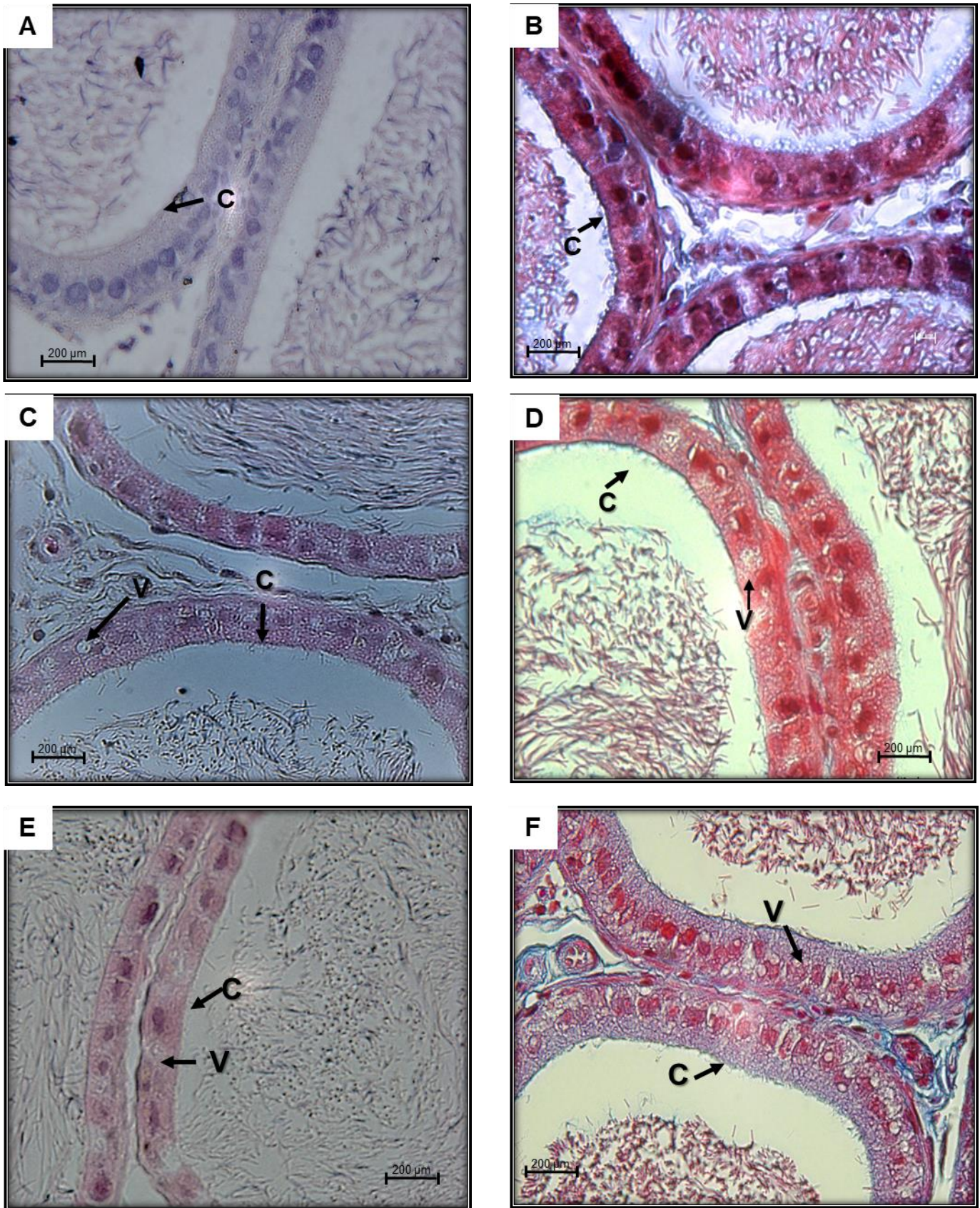
**Fig 10.** Corte transversal de la zona del *corpus* del epididimo con tinción H-E, se observan cambios similares a los descritos en la *caput* en los grupos de sobrepeso y obesidad con disminución del epitelio, cambio de la forma de los conductos y presencia de vacuolas. A (Control/ H-E), B (Control/ TM), C (Sobrepeso /H-E), D (sobrepeso/H-E) y E (Obesidad/ H-E), F (Obesidad/ TM) (C) cilios, (V) vacuolas. Barra 200µm.

## **Región de la *Cauda***

**Control:** Se observan conductos ligeramente ovalados, el epitelio pseudoestratificado (células basales y principales) se observa más delgado que en las dos regiones anteriores la presencia de cilios en esta zona del epidídimo es casi nula y los pocos que se llegan a observar son muy pequeños, los espermatozoides se siguen observando agrupados en el centro de la luz, cilios pequeños y escasos, en el centro del túbulo se observan espermatozoides ocupando una mayor área (**Fig 11A y 11B**).

**Sobrepeso:** Los conductos que se observan de forma transversal presentan una forma irregular el epitelio se observa delgado similar al del grupo control, pero con la presencia de vacuolas; con cilios son muy escasos y pequeños. Los espermatozoides se observan más dispersos ocupando un mayor espacio de la luz del conducto (**Fig 11C y 11D**).

**Obesidad:** La apariencia es muy similar a lo descrito para el grupo con sobrepeso a excepción del epitelio que se observa más delgado y con abundantes vacuolas; la luz prácticamente está ocupada por los espermatozoides (**Fig 11E y 11F**).



**Fig 11.** Corte transversal de la zona del *corpus* del epidídimo con tinción H-E Y TM al igual que en la región de la *cauda* y *corpus* se observan conductos con formas diferentes y presencia de vacuolas en el epitelio, en el tratamiento con obesidad se denota más delgado. A (Control/ H-E), B (Control/ TM), C (Sobrepeso /H-E), D (sobrepeso/H-E) y E (Obesidad/ H-E), F (Obesidad/ TM), (C) cilios, (V) vacuolas. Barra 200µm.

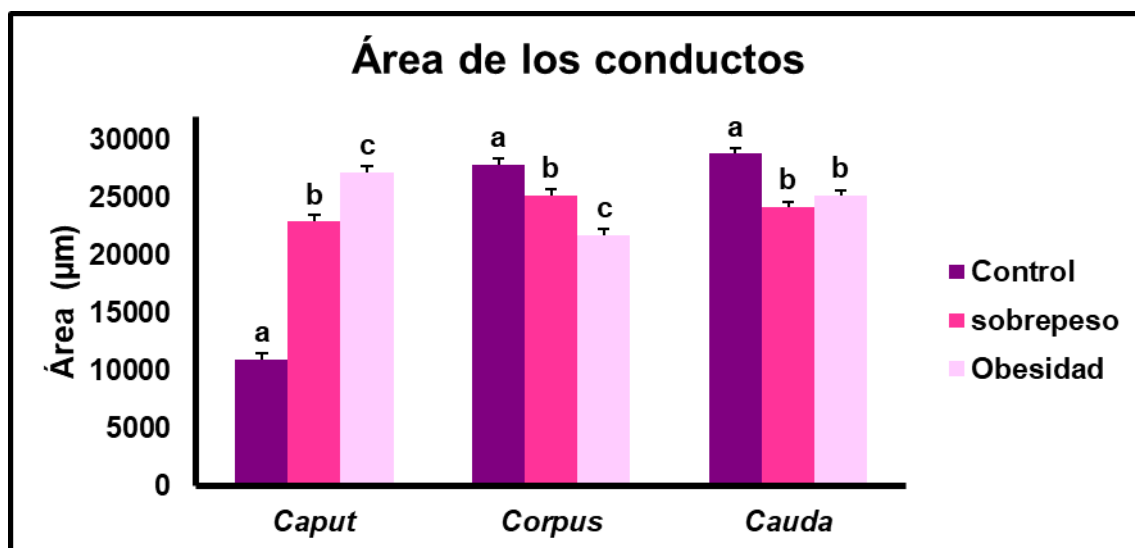
## 11.7 Análisis morfométrico del epidídimo

### 11.7.1 Área de los conductos

En el grupo control se observa que el área de los conductos es menor en la región del *caput* ( $10953 \pm 540.3$ ) en comparación con las otras dos zonas del epidídimo ( $27866 \pm 523.29$  *corpus* y en *cauda*  $28770.23 \pm 489.4$ ).

Al comparar la región del *caput* entre los tres grupos observamos un incremento significativo tanto en sobrepeso ( $22911 \pm 540.3$ ) como en obesidad ( $27172 \pm 540.3$ ) siendo mayor en éste último grupo ( $F_{2,18} = 242.10$   $p < 0.001$ ), en la zona del *corpus* ocurre lo contrario observamos un decremento significativo tanto en sobrepeso ( $25189 \pm 523.29$ ) como en obesidad ( $21723 \pm 523.29$ ) siendo menor el área en éste último ( $F_{2,18} = 34.63$   $p < 0.001$ ).

Sin embargo, en la región de la *cauda* se observa un decremento similar pero significativo menor ( $F_{2,18} = 24.51$   $p < 0.001$ ) en los grupos de sobrepeso ( $24149.41 \pm 489.4$ ) y obesidad ( $25149 \pm 489.4$ ) con relación al control (**Fig 12**).

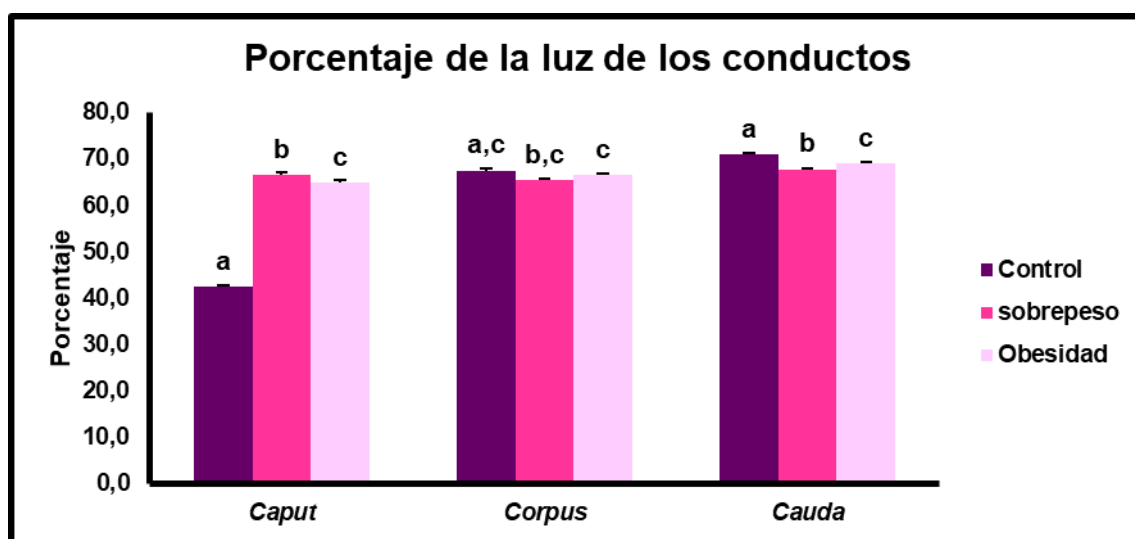


**Fig 12.** Área de los conductos epididimarios ( $\bar{X} \pm EE$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). ANOVA múltiple de una vía, prueba post hoc de Newman-Keuls.

### 11.7.2 Porcentaje de la luz de los conductos

En el grupo control observamos que la luz de los conductos es menor ( $42.3 \pm 0.55$ ) en la región del *caput* en comparación con las otras dos regiones en los grupos con sobrepeso ( $66.4 \pm 0.55$ ) y obesidad ( $64.8 \pm 0.55$ ) se presenta un mayor porcentaje del conducto que corresponde a la luz de estos en comparación con el control ( $F_{2,18} = 592.61$   $p < 0.001$ ), sin embargo, en el *corpus* únicamente el grupo con sobrepeso ( $65.3 \pm 0.49$ ) se observan diferencias ( $F_{2,18} = 3,4521$   $p < 0.03$ ) con relación al grupo control ( $67.4 \pm 0.49$ ) y en *cauda* ambos son significativamente menores ( $F_{2,18} = 31.83$   $p < 0.001$ ) que el control ( $70.83 \pm 0.27$ ), pero obesidad ( $68.8 \pm 0.27$ ) mayor que sobrepeso ( $67.71 \pm 0.27$ ).

Sin embargo, es importante resaltar que las diferencias que se mencionaron al inicio, en el grupo control en las tres áreas, no se presentan de igual forma en el grupo con sobrepeso y obesidad ya que desde la región del *caput* se presenta un incremento el cual se mantiene con variaciones muy leves en las otras dos regiones (**Fig 13**).



**Fig 13.** Luz de los conductos  $\bar{X} \pm EE$ . Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en *caput* y *cauda* ( $p < 0.001$ ), *corpus* ( $p < 0.01$ ). prueba estadística  $X^2$ .

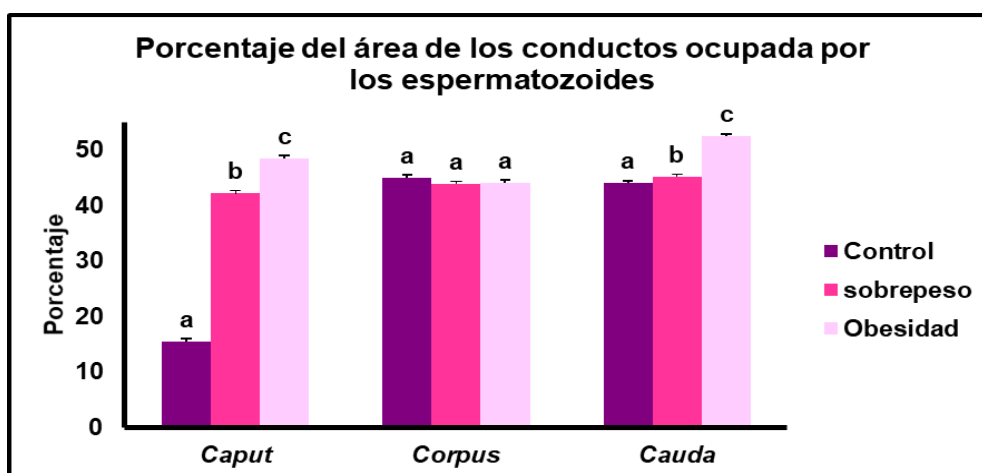


### 11.7.3 Porcentaje del área de los conductos ocupada por los espermatozoides

En el grupo control se observa constante el porcentaje de espacio que ocupan los espermatozoides en la luz del conducto en las tres zonas epididimarias ( $15.5 \pm 0.46$  *caput*,  $44.94 \pm 0.48$  *corpus*,  $44.05 \pm 0.38$  *cauda*), en la zona del *caput* se observa un incremento significativo con relación al control tanto en sobrepeso ( $42.2 \pm 0.46$ ) y obesidad ( $48.44 \pm 0.46$ ) siendo mayor éste último con relación a los otros dos.

En el grupo con sobrepeso ( $43.87 \pm 0.48$ ) se observa una ligera disminución en la zona del *corpus* con relación a las otras dos ( $F_{2,18} = 1403.66$   $p < 0.001$ ) y en el grupo que presenta obesidad ( $44.1 \pm 0.48$ ) donde observamos un mayor espacio ocupado por los espermatozoides.

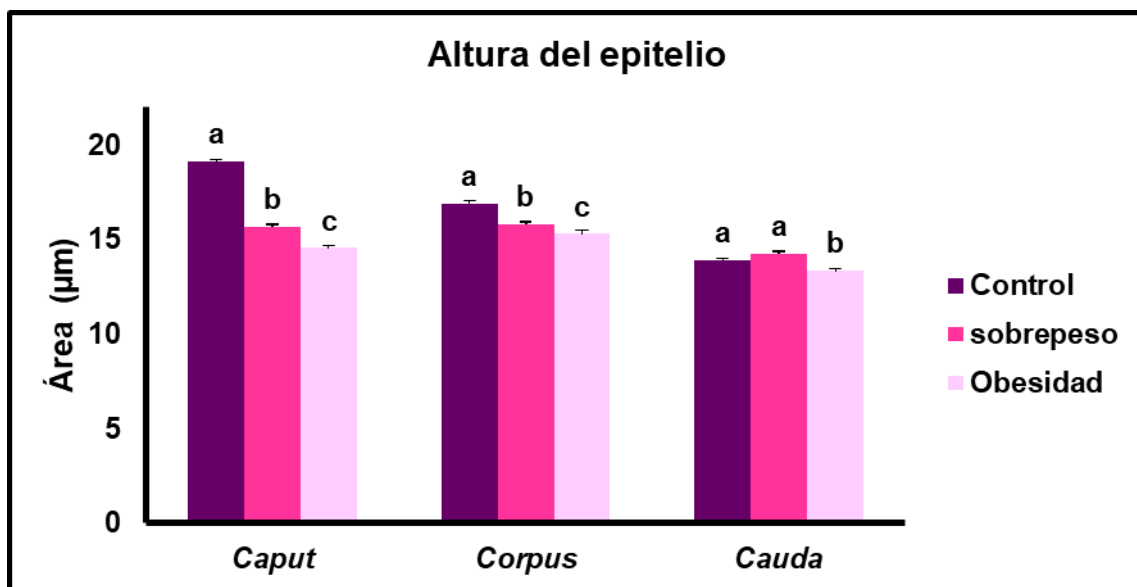
Al comparar el área ocupada entre los grupos sobrepeso ( $45.2 \pm 0.38$ ) y obesidad observamos que en la zona de la *cauda* este porcentaje es menor para sobrepeso y obesidad ( $52.49 \pm 0.38$ ), pero este último mayor al grupo de sobrepeso. En la *cauda* se observan los mayores cambios ya que en sobrepeso y obesidad se observa un incremento significativo ( $F_{2,18} = 137.63$   $p < 0.001$ ) con respecto al control siendo más acentuado en el grupo con obesidad (**Fig 14**).



**Fig 14.** Porcentaje del área de los conductos ocupada por los espermatozoides  $\bar{X} \pm EE$ . Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, prueba estadística  $X^2$   $p < 0.001$

#### 11.7.4 Altura del epitelio

En la zona del *caput* observamos una disminución significativa ( $F_{2,18} = 301.97$   $p < 0.001$ ) en el grupo con sobrepeso ( $15.66 \pm 0.13$ ) y obesidad ( $14.55 \pm 0.13$ ), siendo esta la zona en la que se observa un mayor cambio. En la región del *corpus* se presenta el mismo patrón de decremento ( $16.9 \pm 0.16$  control,  $15.8 \pm 0.16$  sobrepeso,  $15.3 \pm 0.16$  obesidad) ( $F_{2,18} = 22.79$   $p < 0.001$ ) pero es menos acentuado. Por último, en la *cauda* únicamente el grupo con obesidad ( $13.35 \pm 0.13$ ) presenta una disminución significativa ( $F_{2,18} = 10.55$   $p < 0.001$ ) con relación a los otros dos grupos ( $13.9 \pm 0.13$  control y sobrepeso  $14.23 \pm 0.13$ ) (**Fig 15**).



**Fig 15.** Altura del epitelio epididimario  $\bar{X} \pm EE$ . Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). ANOVA múltiple de una vía, prueba post hoc de Newman-Keuls.

## 12.DISCUSIÓN

Hasta el año 2016, se reporta que más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años o más, tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos (WHO, 2017), la obesidad es responsable de inducir un gran número de efectos negativos como: la diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico, así como, la disminución en la fertilidad masculina y fecundidad (Barrera-Cruz *et al.*, 2013; Barqueira *et al.*, 2010; Guarnieri *et al.*, 2010; Cachofeiro *et al.*, 2006; Araya, 2013; Swan *et al.*, 2000; WHO, 2017; Chunghtai *et al.*, 2011). En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT-MC) del 2016 reporta que, los adultos de 20 años o más, presentan una prevalencia de incremento de peso en un 75%, de los individuos en los cuales se combina tanto el sobrepeso como la obesidad. La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) considera que el 32% de la población adulta presenta obesidad, ubicando a México como la segunda población a nivel mundial con más casos de obesidad, ya que, en la actualidad, más del 70% de los habitantes la padecen (ENSANUT-MC, 2016; OCDE, 2016).

En el presente estudio, la administración de una dieta rica en lípidos de 10 y 60% indujo sobrepeso y obesidad (**Fig 8**), alterando la calidad espermática (**Tabla 3**) y el epitelio epididimario (**Fig 9C, 9D, 9E, 9F, 10C, 10D, 10E, 10F, 11C, 11D, 11E, 11F**) en la rata macho. La utilización de roedores en la investigación es una herramienta experimental para el estudio de diferentes procesos fisiológicos y patológicos, dado que cumplen con ciertas características similares al humano, además que son animales de reproducción rápida y continua, ya que su ciclo de vida es corto. Las ratas Wistar se utilizan como modelo en estudios de sobrepeso y obesidad modificando la dieta.

Reportes previos indican que el peso corporal aumenta con dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (Rosini, 2012, Luque *et al.*, 2015; Liu y Ding, 2017). Esta ganancia de peso expresada en aumento de grasa corporal, es debido a que el alto consumo de carbohidratos conlleva a la síntesis de ácidos grasos por la acción de la insulina (Ghanayem *et al.*, 2010; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2018; Ferramosca *et al.*, 2018), seguido de un aumento

en la formación y almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo. Sumado a la dieta hipercalórica, los alimentos contienen un porcentaje de ácidos grasos saturados, mismos que pueden almacenarse en el tejido adiposo (Ghanayem *et al.*, 2010; Georgiadi y Kersten, 2012).

En el caso de las dietas ricas en ácidos grasos saturados, generan que se aumente de peso y de tejido adiposo blanco, ya que al ser moléculas de mayor densidad energética se genera una disminución en la oxidación de los ácidos grasos y la termogénesis inducida por la dieta (Hariri y Thibault, 2010; Rosini, 2012, Luque, *et al.*, 2015; Liu y Ding, 2017), en el caso de la dieta hipercalórica se reporta que se puede inducir sobrepeso y obesidad en ratas cuando es administrada por un mes, mientras que con una dieta hiperlipídica con ácidos grasos saturados (como manteca de cerdo) se genera en el mismo tiempo la ganancia de peso (Buettner, 2006), lo cual no se observa con las dietas de ácidos grasos poliinsaturados (aceite de olivo), ya que ejercen un efecto opuesto (Ghanayem *et al.*, 2010; Luque *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018; Ferramosca *et al.*, 2018).

En el presente estudio la administración de una dieta con 10 y 60% de ácidos grasos saturados se observó que 4 semanas fueron suficiente para inducir sobrepeso y obesidad (**Fig 6**). En el caso de las dietas ricas en ácidos grasos saturados, generan que se aumente de peso y de tejido adiposo blanco, ya que al ser moléculas de mayor densidad energética se genera una disminución en la oxidación de los ácidos grasos y la termogénesis inducida por la dieta (Hariri y Thibault, 2010).

Diversos trabajos indican que la adipogénesis es regulada por los factores de proliferación de los peroxisomas (PPARs), factores de transcripción que intervienen en la regulación de la síntesis u oxidación de los ácidos grasos, así como en la adipogénesis (Georgiadi y Kersten, 2012). En el caso de los factores de proliferación de los peroxisomas gama (PPAR $\gamma$ ), promueven la conversión de ácidos grasos en triacilglicéridos (TGA), ocasionando un almacenamiento de lípidos en órganos periféricos, también llevan a cabo la expresión de los genes que van a conferir las características de los adipocitos maduros, ya que la diferenciación de los adipocitos dependen de estos PPARs;

por otro lado, se va a llevar a cabo la absorción de los ácidos grasos libres y la acumulación de TGA en los adipocitos maduros, por lo cual van a ir aumentando en número y tamaño (Tamori *et al.*, 2002; Farmer, 2005; Madsen *et al.*, 2005; Georgiadi y Kersten, 2012).

Mientras que los PPAR $\alpha$  en el organismo promueven la oxidación de ácidos grasos cuando hay necesidad de requerimientos energéticos, además de prevenir la acumulación intracelular y la lipotoxicidad de los ácidos grasos al estimular su oxidación en hígado y el corazón, esto cuando hay un elevado incremento de ácidos grasos en plasma (Paasch *et al.*, 2010). Así, la activación de PPAR $\alpha$  estimula la  $\beta$  oxidación y disminuye los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres, lo que previene la hipertrofia e hiperplasia de adipocitos (Varga *et al.*, 2011). Los PPAR $\alpha$  tienen una mayor afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados, es evidente que una dieta rica con este tipo de ácidos grasos disminuye la masa de tejido adiposo y suprime el desarrollo de la obesidad (Madsen *et al.*, 2005).

En condiciones de exceso de nutrientes, especialmente en dietas altas en grasas como las saturadas induce obesidad, la expresión de PPAR $\alpha$  disminuye indicando que hay menor oxidación de ácidos grasos y mayor lipogénesis (Madsen *et al.*, 2005). Curiosamente, algunos otros estudios han encontrado que tanto PPAR $\alpha$  como PPAR $\gamma$  aumentan significativamente en ratones alimentados con dieta alta en grasa, lo que podría conferir el aumento en el tejido adiposo que conlleva a sobrepeso y obesidad.

En el humano se define como sobrepeso cuando el índice de masa corporal (IMC) es 25-30 kg/m<sup>2</sup> y como obesidad si es superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (Cabler *et al.*, 2010; Du Plessis *et al.*, 2010; WHO, 2017). Mientras que, en animales de laboratorio como la rata, el índice de Lee, es una forma rápida y precisa para determinar sobrepeso y obesidad inducido por la dieta ya sea por hiperlipídica o hiperglucémica (Novelli *et al.*, 2007; Jeyakumar *et al.*, 2009; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2011). Varios autores reportan valores en el índice de Lee como un indicador de obesidad que parece variar dependiendo de la cepa y edad del animal, así como el tiempo de administración de la dieta. En 1970, Bernardis y colaboradores, indican que un valor de 0.294 g es indicador de

obesidad, mientras que Novelli y colaboradores (2006) reporta en ratas de 21 y 60 días de edad con una dieta hiperlipídica hasta la edad 90 días, un índice de Lee de 0.3. De manera similar, Viguera- Villaseñor y colaboradores (2011) en ratas Sprague–Dawley de 3 meses de edad reportan un valor de 0.3 para obesidad, con una dieta hipercalórica por 30 días. En el caso de Leopoldo y colaboradores (2016), reportan en ratones macho Theiller de 30 días con dieta hiperlipídica por 15 semanas un índice de Lee de 0.76, como un indicador de obesidad. Las variaciones en el índice de Lee parecen depender de la especie edad y la dieta.

Algunos estudios sugieren que es importante considerar la correlación entre el índice de Lee y la masa grasa del animal para poder estimar el índice corporal en ratas (Sclafani y Gorman, 1977; Malafaia *et al.*, 2013), en estos mismos trabajos indican que no se debe utilizar únicamente el índice de Lee como referencia para determinar obesidad ya que en ocasiones no hay una correlación directa entre el peso corporal y este índice (Leopoldo *et al.*, 2016).

Al respecto Malafia y colaboradores (2013) reportaron que en ratas macho Wistar con un peso promedio de 170 g al inicio del experimento a las cuales se les administró una dieta hipercalórica por 91 días tuvieron una ganancia de peso del 14.7%, y de la grasa epididimaria de 20.1%, pero sin diferencias en el índice de Lee Nuestros resultados muestran que en ambos grupos con la dieta hiperlipídica el índice de Lee es mayor de 0.3 en ratas de 3 meses de edad con un tratamiento por 30 días, en este caso con una ganancia de peso y de grasa escrotal significativamente mayor en los animales con dieta de 60% comparado con la de 10% (Novelli *et al.*, 2007; Leopoldo *et al.*, 2016). Lo anterior parece indicar que la medida del índice de Lee al ser muy similar en ambos grupos, no es un marcador determinante de sobrepeso y obesidad. Al respecto Malafai y colaboradores (2013) mencionan que para tener una descripción de la composición corporal completa de la rata y poder determinar si se presenta obesidad es importante tener los siguientes parámetros antropométricos como son; el índice de masa corporal, índice de Lee y la circunferencia del abdomen.

Por otro lado, un aumento de peso en los hombres se ha asociado con un nivel de T reducido, una disminución tanto en la calidad espermática y fertilidad en comparación con los hombres de peso normal (Traish *et al.*, 2008), relacionándose la disminución de andrógenos con el grado de obesidad, y un aumento de estrona y estradiol, debido a la aromatización periférica de los andrógenos, dada por una desregulación endocrinológica que induce bajos niveles de T (Du Plessis *et al.*, 2010; Chughtai *et al.*, 2011). En modelos animales se ha observado que la obesidad induce alteraciones en las concentraciones de T (Zhao *et al.*, 2014; Donner *et al.*, 2015). En ratas macho Spraw Dawley Vigueras- Villaseñor y colaboradores (2011), reportan una disminución de la T total (1.94 ng/ml vs 3.0 ng/ml) inducida por una dieta hipocalórica. Un efecto similar ha sido reportado en diversos trabajos, por ejemplo, en ratas macho Wistar con edad de 5 a 6 semanas (0.1 ng/ml) (Donner *et al.*, 2015), en ratas machos de 4 meses (Pongkan *et al.*, 2016), así como en ratones machos C57BL / 6J con 8 (7.52 ng/mL de T) y 19 semanas (6.33 ng/mL de T) (Zhao *et al.*, 2014).

El tejido adiposo funciona de manera similar a un órgano endocrino al secretar varios mediadores denominados adipocitocinas, entre ellas leptina, adiponectina, así como mediadores inflamatorios que inducen un estado de inflamación crónica como son: Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1B (IL-1B) que contribuyen a la inflamación crónica originada por un exceso de tejido adiposo (Varga *et al.*, 2011). Existen reportes que mencionan que estos mediadores (leptina y adiponectina) regulan el eje HHT (D'Agostino Giuseppe y Diano, 2010; Michalakis *et al.*, 2013; Kelly y Jones, 2015).

Una dieta alta en grasa, induce aumento del tejido adiposo, siendo este el que secreta la leptina. En el caso de la leptina, se considera un marcador de obesidad, que no solo estimula el centro de saciedad, sino que también interviene en la regulación de la maduración sexual y la reproducción, pudiendo actuar a su vez como un factor central o periférico. Como factor central puede estimular directamente a las neuronas KISS-1 que a su vez secretaran los péptidos KISS-1 para estimular a las neuronas GnRH en hipotálamo anterior y se produzca la secreción de LH (Teerds *et al.*, 2011; Michalakis *et al.*, 2013),

todo esto ocurre de forma fisiológica, pero cuando hay un aumento de adipocitos, se incrementa la concentración de leptina la cual va actuar como un regulador negativo sobre las neuronas KISS-1, generando así la inhibición de la GnRH, como consecuencia disminuye la liberación de LH necesaria para que se lleve a cabo la conversión de 17OH-progesterona en T en las células de Leydig (Teerds *et al.*, 2011; Michalakis *et al.*, 2013). En el presente trabajo no se evaluaron las concentraciones de T, pero sí la de peso epididimario, la calidad espermática, como marcadores en la función del epidídimo, que refleja que al menos en el grupo de obesidad las concentraciones de T parecen disminuir afectando la función del epidídimo, órgano que es dependiente de ésta hormona.

A nivel periférico la concentración elevada de leptina inhibe directamente la producción de T en las células de Leydig, y así disminuye la concentración de los andrógenos (Du Plessis *et al.*, 2010; Kelly y Jones, 2015). Además, la leptina contribuye a la secreción de la citocina proinflamatoria como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), actuando directamente sobre los macrófagos del tejido adiposo (Varga *et al.*, 2011). Es importante también mencionar que el tejido adiposo como órgano endocrino tiene la capacidad de transformar T en E<sub>2</sub> generando un desequilibrio hormonal entre estas dos hormonas al disminuir T e incrementarse E<sub>2</sub> (Teerds *et al.*, 2011; Mammi *et al.*, 2012).

La obesidad tiene múltiples efectos en el organismo, anteriormente se mencionó el aumento de grasa y los cambios endocrinos que pueden generar en el individuo; otro efecto que tiene en machos es modificar la termorregulación a nivel de testículo y epidídimo (Brooks, 1973). Al realizar la disección de los epidídimos, se observó una gran cantidad de grasa en esta región rodeando incluso los vasos sanguíneos que forman parte del plexo pampiniforme, el cual coadyuva con el enfriamiento tanto de testículo como epidídimo (Corral y Ballescá, 2012), junto con el músculo cremáster y la membrana dartos (Wishani, 1991; Setchell, 1994). A nivel de epidídimo se conoce que la región de la cauda requiere mantener una temperatura baja con relación al resto del epidídimo y testículos para que durante el almacenamiento no se dañen los espermatozoides (Bedford, 1978), al disminuir la tasa metabólica de éstos. El aumento de la temperatura escrotal en animales



obesos y generar estrés oxidante (Dandona *et al.*, 2005), el cual al puede alterar la morfofisiología epididimaria generando daño celular y por lo tanto alteraciones de los parámetros espermáticos (Merve *et al.*, 2019) al alterarse tanto los procesos de maduración como los de almacenamiento (Waites, 1991).

El epidídimo es un órgano altamente especializado el cual sintetizan diferentes proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y fosfolípidos que se liberan en la luz, necesarios para la maduración y supervivencia de los espermatozoides (Hess, 2003; Robaire y Hamzeh, 2011), por lo que la integridad anatómica y funcional del epidídimo es indispensable para los procesos de maduración y almacenamiento (Robaire y Hamzeh, 2011).

El epidídimo para mantener su estructura y funcionamiento requiere la presencia de andrógenos (Robaire y Hamzeh, 2011). Si bien, en el presente trabajo no se determinaron los niveles de testosterona, sin embargo, los análisis histológicos, así como el índice epididimario somático indican una disminución en los niveles de T. Específicamente en el IES (**Tabla 3**), el grupo de obesidad presenta un menor índice con relación a los otros dos grupos, además en este grupo se presenta mayor daño tanto en las características morfométricas epididimarias (**Fig 12, 13, 14, 15**) como en las espermatobioscopias en (**Tabla 3**), comparación con el grupo de sobrepeso pero aún mayor que el control.

Por su estructura y función el epidídimo se divide como ya se mencionó en cuatro regiones. El sobrepeso y la obesidad inducen cambios principalmente en las regiones de *caput* y *cauda* siendo la más afectada de estas dos el *caput*. En todas las regiones del epidídimo se observan cambios en la forma de los conductos, así como una disminución del tamaño del epitelio que los conforma lo cual se relaciona con una mayor luz del conducto. Al analizar el epitelio se observan dos cambios importantes con relación al grupo control, el primero la disminución en número y tamaño de los cilios y la segunda la presencia de vacuolas (**Fig 9E, 9F, 10E, 10F, 11E, 11F**); estos cambios al igual que los anteriores son más notorios en obesidad.

Diversos autores (Orgebin-Crist y Davies, 1974; Moore y Bedford, 1979) han reportado que la disminución de T ocasiona en el epitelio epididimario pérdida de los cilios, acumulación de lisosomas, presencia de vacuolas y mayor

actividad endocítica. El análisis morfométrico nos confirma los cambios que se presentan tanto en la forma de los conductos, el incremento de la luz del conducto como en la altura del epitelio. Estos hallazgos refuerzan por los cambios en este estudio que tanto en sobrepeso como en obesidad se alteran los niveles hormonales de testosterona modificando las características del epitelio.

Funcionalmente en las regiones del *caput* y *corpus* se llevan a cabo los procesos de maduración del espermatozoide (Robaire y Viger, 1995; Aitken, 1997; Turner *et al.*, 2003). Específicamente las células principales son las que presentan cambios en el tamaño de los cilios y la presencia de vacuolas; estas células secretan epididimosomas (proteínas transportadoras) que favorecen el transporte de moléculas necesarias para la maduración del espermatozoide por lo que cambios en la morfología de las células pueden ocasionar alteraciones en su función y por lo tanto verse afectada la maduración espermática (Zhou *et al.*, 2018) y la movilidad ya que estas células secretan la proteína inobilina para que se mantenga la quiescencia de los espermatozoides en todo el epidídimo pero principalmente en la región de la *cauda* (De Grava y Klinefelter, 2014; Breton *et al.*, 2016; Gervasi y Visconti, 2017; Zhou *et al.*, 2018). No sólo las células principales responden a la baja de T con presencia de vacuolas, este mismo efecto se observa en las células claras. Estas células participan junto con las otras células en el proceso de acidificación del fluido luminal (Oko *et al.*, 1993; Andonian y Hermo, 1999; Robaire y Hamzeh, 2011) así como en la endocitosis de diversas proteínas. Al no tener un pH adecuado el fluido luminal, principalmente en la cauda, los espermatozoides adquirirían movilidad durante el proceso de almacenamiento.

Si bien el epidídimo es un órgano andrógeno dependiente, el estradiol es otra hormona importante en el funcionamiento normal de éste órgano. En condiciones fisiológicas se ha reportado que junto con la T regulan el inicio de la movilidad espermática y la remodelación de la membrana del espermatozoide, principalmente en el *caput* y *corpus* (Hess *et al.*, 2011). En condiciones de sobrepeso y obesidad el equilibrio fisiológico entre andrógenos y estrógenos se pierde al aromatizarse los primeros en el tejido adiposo incrementando los estrógenos y disminuyendo por tanto los andrógenos.

Tanto las células estrechas como las apicales y claras presentan receptores de estrógenos (RE). Se ha reportado principalmente en las células claras, un incremento en los niveles de estrógenos altera la función fisiológica de las células incrementando su tamaño y la presencia de vacuolas (Hess et al., 2000).

La funcionalidad del epidídimo depende del balance hormonal entre andrógenos y estrógenos. Bajo condiciones de sobrepeso y obesidad este balance se altera por la inhibición de GnRH inducida por leptina y retroalimentación negativa para su síntesis en células de Leydig, incremento del proceso de aromatización que se lleva a cabo en el tejido adiposo y la retroalimentación negativa que ejerce el E<sub>2</sub> sobre las neuronas KISS-1 (Isidori *et al.*, 1999; Hammoud *et al.*, 2012).

Todos los cambios antes señalados provocan cambios en la calidad espermática reduciendo drásticamente la viabilidad espermática (32%) en animales con obesidad y de manera significativa en sobrepeso (70%) (**Tabla 3**). También se incrementa en estos grupos la presencia de malformaciones en la pieza media angulada, flagelo angulado y enrollado. Estas alteraciones se pueden presentar por los cambios inducidos en el epidídimo ya que se encuentran alterada la morfología y función modificando las condiciones fisiológicas que requieren los espermatozoides para su maduración y viabilidad.

### 13.CONCLUSIONES

- 1) La dieta hiperlipídica induce tanto sobrepeso como obesidad en ratas Wistar.
- 2) La obesidad disminuye el índice epididimario somático.
- 3) Se sugiere una modificación en el equilibrio hormonal de andrógenos/estrógenos.
- 4) Tanto sobrepeso como obesidad alteran las características histológicas del túbulo epididimario, así como los parámetros morfométricos.
- 5) Como consecuencia de los cambios anteriores disminuye la viabilidad espermática e incrementan el número de malformaciones presentes en los espermatozoides.

Por lo tanto, se comprueba la hipótesis de que el sobrepeso y la obesidad, afectan los parámetros espermáticos y la histomorfología epididimaria.

## 14.ANEXOS

### 14.1 Medio Ringer para el lavado de espermatozoides

Extracción de espermatozoides: Ringer a un pH de 7.2

- NaCl: 95 mM
- KCl: 5mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1.1mM
- $\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ : 1.7 Mm

Ajustado a pH 7.2, en agua desionizada.

### 14.2 Solución para viabilidad y morfología espermática (EN)

- Eosina 1% en agua destilada
- Nigrosina 10% en agua destilada

En proporción 2:3 (Volumen/Volumen) respectivamente.

- Previamente se calentó el agua destilada, se disolvió la Eosina Y junto con el cloruro de sodio y se le agregó la Nigrosina. Se hirvió la suspensión, se le permitió enfriarse a temperatura ambiente y se filtró.
- Se colocaron 3  $\mu\text{l}$  de espermatozoides, más 2  $\mu\text{l}$  eosina/nigrosina en un portaobjetos, se dejaron secar al aire para un posterior conteo.

### 14.3 Histología

#### 14.3.1 Fijación del tejido

##### Formalina al 10%

- Fosfato de potasio monobásico, cristal ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ..... M =136.09
- Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... M = 141.96
- Formaldehido en solución (HCHO) ..... PM=30.03
- Agua destilada

### 14.3.2 Procesamiento Histológico

- Deshidratación en alcoholes graduales 40-100° Gay Lussac Lavados (grados Gay Lussac).
- Aclaración de tejidos: Alcohol-Xileno
- Impregnación en parafina
- Inclusión definitiva en parafina (PARAMEX)

### 14.3.3 Tinción Hematoxilina-Eosina

- Neoclear I..... 5 min
- Neoclear II..... 5 min
- Alcohol 100% I..... 2 minutos
- Alcohol 100% II..... 2 minutos
- Alcohol ether..... 2 minutos
- Alcohol 96°..... 2 minutos
- Alcohol 80°..... 2 minutos
- Alcohol 60°..... 2 minutos
- Agua destilada..... Lavar
- Hematoxilina ..... 4 minutos
- Agua corriente..... Lavar
- Alcohol ácido ..... Lavado rápido
- Agua destilada ..... Lavar
- Solución de Scott..... 8 minutos
- Agua destilada..... Lavar
- Eosina ..... 3.5 min
- Agua destilada..... Lavar

Alcohol 96° I  
Alcohol 96° II  
Alcohol 100% I  
Alcohol 100% II                      Lavados  
Alcohol xileno  
Xileno I  
Xileno II

#### 14.3.4 Tinción Tricrómica de Masson

Dejar las laminillas con el mordente de Bouin toda la noche en hielo o en refrigeración a -20°.

Al día siguiente se lavan las laminillas hasta decolorar.

Xileno I

Xileno II

Alcohol Xileno

Alcohol absoluto I

Alcohol absoluto II

Alcohol 96° I

Alcohol 96° II

Hematoxilina de Groat..... 4 min 20 segundos

Lavar con agua corriente

Lavar en alcohol ácido

Lavar con agua corriente..... 15 minutos

Mezcla de fucsina Ponceau..... 5 minutos

Lavar con agua acética 1%

Ácido fosfotúngstico con orange G..... 4 minutos

Lavar con agua destilada

Azul de anilina ..... 45 segundos

Lavar con agua corriente

Lavar con agua destilada

Agua acética 1%..... 5 minutos

Lavar con alcohol absoluto (100%)

Lavar con alcohol xileno

Lavar con Xileno

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamali HI. and Hermo L. (1996) Apical and Narrow Cells Are Distinct Cell Types Differing in Their Structure, Distribution, and Functions in the Adult Rat Epididymis. *Journal of Andrology* 17: 208–222.
2. Aitken RJ., Smithc TB., Jobling MS., Baker MA., De Iuliis GN. (1997) Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction* 3: 169–173.
3. Akbarsha M., Faisal K and Radha A. (2015) Ed S Singh. CRC Press. The Epididymis: Structure and Function. In *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology*, pp 115–166. DOI: 10.1201/b18900-7
4. Andonian S and Hermo L. (1999) Cell and Region-Specific localization of Lysosomal and Secretory Proteins and Endocytic Receptors in Epithelial Cells of the Cauda Epididymidis and Vas Deferens of the Adult Rat. *Journal of Andrology* 20(3): 415–428.
5. Arrotéia L., Garcia P., Ferreira B., Marilia L and Violin P. (2012) Ed Croatia: InTech. The Epididymis: Embryology, Structure, Function And Its Role In Fertilization And Infertility. In *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*, pp 41–66. DOI: 10.5772/35847
6. Araya Verónica Q. A (2014) Síndrome metabólico y su relación con hipogonadismo tardío. *Revista Médica Clínica Las Condes* 25: 55–59.
7. Avenel.S, Shur BD and Hess RA (2011) Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biology of Reproduction*. 84:207–217.
8. Barrera-Cruz Antonio, Rodríguez-González Arturo and Molina-Ayala Mario Antonio (2013) Escenario actual de la obesidad en México. *Temas de la actualidad. Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013;51(3):292–299.
9. Bancroft JD and Cook HC. (1995) *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp355-360. ISBN-13: 978-0443045349.
10. Barqueira CS., Campos-Nonato I., Rojas R and Rivera J. (2010) Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gaceta Médica de México* 146: 397–407.



11. Barret E., Barman M., Boitano S and Heddwen L. (2013) Ed. McGraw Hill Mexico. Ganong. Fisiología Médica. México: pp: 395-411
12. Bernardis LL and Patterson BD. (1968) Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *The Journal of Endocrinology* 40:527–528.
13. Bellastella G., Puliani Giulia A, Colao Annamaria S, Savastano silvia and Menafra D. (2019) How much does obesity affect the male reproductive function? *International Journal of Obesity Supplements* 9: 50–64.
14. Bilińska B., Wiszniewska B., Kosiniak-Kamysz K., Kotula-Balak M., Gancarczyk M., Hejmej A., Sadowska J., Marchlewicz M., Kolasa A and Wenda-Rózewicka L (2006) Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reproductive Biology* 6 43–58.
15. Breton S., Ruan Y., Park Y-J and Kim B. (2016) Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 18: 3
16. Brooks D.E. (1973) Epididymal and testicular temperature in the unrestrained conscious rat. *Reproduction* 35: 157–160.
17. Brooks D. E. (1983) Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian Journal of Biological Sciences* 36:205–221.
18. Buettner R. (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology* 36:485–501.
19. Cabler S., Agarwal A., Flint M and Du Plessis SS (2010) Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian Journal of Andrology* 12: 480–489.
20. Cachofeiro V., Miana M., Martín-Fernández B and De las Heras N. (2006). Obesidad inflamación y disfunción endotelial. *Rev Esp Obes* 4: 195–204.
21. Challis JR, De Kretser David M., Pfaff Donald W., Richards JoAnne S., Plant Tony M. and Wassarman Paul M. (2005) Ed. USA: Academic Press. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. pp 977-1148.
22. Chang GE., Larrea F and Montes MF (2012) Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(1):24-36

23. Chapin RE and Creasy DM (2012) Assessment of Circulating Hormones in Regulatory Toxicity Studies II. Male Reproductive Hormones. *Toxicologic Pathology* 40: 1063–1078.
24. Chughtai B., Lee RK., Te AE and Kaplan SA (2011) Metabolic syndrome and sexual dysfunction: Current Opinion in Urology 21 514–518.
25. Cooper TG. (2007) Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*. 9: 533–539.
26. Contini M.C., Millen N., Mahieu S. (2012) Antropometría, metabolismo y estado oxidativo en ratas hembras con obesidad inducida por glutamato monosódico oral. *FABICIB* 16: 48-60.
27. Cornwall GA. (2009) New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* 15: 213–227.
28. Corral JM and Ballescà JL. (2012) Varicocele: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Revisión Varicocele: Pathophysiology, diagnosis and treatment. Review.* 29: 25.
29. Dacheux J-L and Dacheux F. (2013) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147: R27–R42.
30. Dacheux J-L, Castella S, Gatti JL and Dacheux F (2005) Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63: 319–341.
31. D'Agostino G and Diano S. (2010) alpha-Melanocyte stimulating hormone: production and degradation. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88: 1195–1201.
32. Dandona P., Aljada A., Chaudhuri A., Mohanty P and Garg R. (2005) Metabolic Syndrome: A Comprehensive Perspective Based on Interactions Between Obesity, Diabetes, and Inflammation. *Circulation* 111: 1448–1454.
33. De Grava KW and Klinefelter GR. (2014) Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4: e979114-1- e979114.
34. de Souza L.L., Barros CB., de Oliveira AG., Queiroga RF., Toscano TL, Alexandre S. Silva SA, Patrícia M. Silva MP, Interaminense F.L.L., de Andrade CF and da Silva AB. (2017) Hypercaloric Diet Establishes Erectile Dysfunction in Rat: Mechanisms Underlying the Endothelial Damage. *Frontiers in Physiology* 8:1–15.

35. Domeniconi RF., Orsi AM., Beu CCL and Felisbino SL. (2007) Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Tissue and Cell*. 39: 47–57.
36. Domeniconi RF., Souza ACF., Xu B, Washington AM and Hinton BT. (2014) Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side?. *Biology of Reproduction* 95: 10–10.
37. Donner DG., Elliott GE., Beck BR., Bulmer AC and Du Toit EF. (2015) Impact of Diet-Induced Obesity and Testosterone Deficiency on the Cardiovascular System: A Novel Rodent Model Representative of Males with Testosterone-Deficient Metabolic Syndrome (TDMetS). *PLOS ONE*. 10: 1-23.
38. Du Plessis SS., Cabler S., McAlister DA., Sabanegh E and Agarwal A. (2010) The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 7: 153–161.
39. El Salam MAA. (2018) Obesity, An Enemy of Male Fertility: A Mini Review. *Oman Medical Journal* 33: 3–6.
40. El-Haschimi K., Pierroz DD., Hileman SM., Bjørbæk C and Flier JS. (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation* 105: 1827–1832.
41. ENSANUT-MC 2016 S de salud Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. In [Http://Www.Gob.Mx/Salud/Documentos/Encuesta-Nacional-de-Salud-y-Nutricion-de-Medio-Camino-2016](http://www.gob.mx/salud/documentos/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-de-medio-camino-2016).
42. Espinosa EP. (2011) Evaluación de procesos relacionados con el control de grasa corporal en ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa y tratadas con péptidos similares a leptina. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias.
43. Fan W., Xu Y., Liu Y., Zhang Z., Lu L and Ding Z. (2018) Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility. *Frontiers in Physiology* 8:1-11
44. Farmer SR (2005) Regulation of PPAR $\gamma$  activity during adipogenesis. *International Journal of Obesity* 29: S13–S16.
45. Farooqi IS (2011) Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. *European Journal of Clinical Investigation* 41: 451–455.

46. Ferramosca A, Di MG, Moscatelli N and Zara V (2018) Obesity and Male Infertility: Role of Fatty Acids in the Modulation of Sperm Energetic Metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology* 120:1–6.
47. Georgiadi A and Kersten S. (2012) Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Advances in Nutrition*. 3: 127–134.
48. Gervasi MG and Visconti PE. (2017) Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* 5:204–218.
49. Ghanayem BI., Bai R., Kissling GE., Travlos G and Hoffler U. (2010) Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* 82: 96–104.
50. González- Moran Ma. G. (2017) Importance of estrogens in the mammalian male reproductive system. *Journal of veterinary andrology* 2 38–51.
51. Gregory M and Cyr DG. (2014) The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis* 4: e979619-1- e979619-13.
52. Guarnieri G., Zanetti M., Vinci P., Cattin MR., Pirulli A and Barazzoni R. (2010) Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of Renal Nutrition: The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 20: S19-S23.
53. Hall John E. (2016) Ed. El sevier. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Barcelona:13 ed. pp. 2542- 2462
54. Hammoud A., Meikle A., Reis L., Gibson M., Peterson C and Carrell D. (2012) Obesity and Male Infertility: A Practical Approach. *Seminars in Reproductive Medicine* 30: 486–495.
55. Hamzeh M. and Robaire B. (2008) Effect of Testosterone on Epithelial Cell Proliferation in the Regressed Rat Epididymis. *Journal of Andrology* 30: 200–212.
56. Hariri N and Thibault L. (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*. 23: 270–299.
57. Hargrove JL, MacIndoe JH and Ellis LC. (1977) Testicular Contractile Cells and Sperm Transport Supported by Grant CA 09110-03 from the National Cancer Institute, Department of Health, Education and Welfare (to J. L. H.); Grant X044 from the Department of Medicine, University of Iowa (to J. H.

- M.); and Research Project Grant U-300 from Utah State University (to L. C. E.). *Fertility and Sterility* 28 1146–1157.
58. Hermo L., Dworkin J and Oko R. (1988) Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *American Journal of Anatomy* 183: 107–124.
59. Hess RA. (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:1-14.
60. Hess RA., Bunick D., Lubahn DB., Zhou Q and Bouma J (2000) Morphologic Changes in Efferent Ductules and Epididymis in Estrogen Receptor Knockout Mice. *Journal of Andrology* 21(1):107-121.
61. Hess RA., Fernandes SAF., Gomes GRO., Oliveira CA., Lazari MFM and Porto CS. (2011) Estrogen and Its Receptors in Efferent Ductules and Epididymis. *Journal of Andrology* 32: 600–613.
62. Hu JJ., Zhang Z., Shen W-J and Azhar S. (2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *BioMed Central* 7: 1–25.
63. Isidori AM., Caprio M., Strollo F., Moretti C., Frajese G., Isidori A and Fabbri A. (1999) Leptin and Androgens in Male Obesity: Evidence for Leptin Contribution to Reduced Androgen Levels. *84 (10): 1-8.*
64. Jeyakumar SM., Lopamudra P., Padmini S., Balakrishna N., Giridharan NV and Vajreswari A. (2009) Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. *BioMed Central* 6(27): 1-8.
65. Jia YF., Feng Q ., Ge ZY., Guo Y., Zhou F., Zhang KS ., Wang XW., Lu WH., Liang XW., Gu YQ. (2018) Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urology* 18 (42):1-8
66. Juárez-Bengoa A., Rodríguez-Perdomo D and Pizano-Zárate ML., Hipogonadismo asociado a síndrome metabólico en varones infértiles. *Revista Mexicana de Urología.* 17(2): 87–92.
67. Kelly DM and Jones TH. (2015) Testosterone and obesity: Testosterone and obesity. *Obesity Reviews* 16:581–606.
68. León-Galvan MA., Fonseca T., López-Wilchis R and Rosado A. (1999) Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-

- eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology* 77: 7–12.
69. Leopoldo AS., Lima-Leopoldo AP., Nascimento AF., Luvizotto RAM., Sugizaki MM., Campos DHS., da Silva DCT., Padovani CR and Cicogna AC. (2016) Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49:1-19.
70. Leung GPH., Cheung KH., Leung CT., Tsang MW and Wong PYD. (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and Cellular Endocrinology* 216:5–13.
71. Liu M., Montgomery MK., Fiveash CE., Osborne B., Cooney GJ., Bell-Anderson K and Turner N. (2015) PPAR $\alpha$ -independent actions of omega-3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis. *Scientific Reports* 4:19.
72. Liu Y and Ding Z. (2017) Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction* 154: 123–131.
73. Lolmède K., Zakaroff-Girard A., Dray C., Renoud M-L., Daviaud D., Burcelin R., Lafontan M., Galitzky J and Bouloumié A. (2015) Interrelationship between lymphocytes and leptin in fat depots of obese mice revealed by changes in nutritional status. *Journal of Physiology and Biochemistry* 71: 497–507.
74. Lucio RA., Tlachi JL., López AA., Zempoalteca R and Velázquez-Moctezuma J. (2009) Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México* 40: 405–415.
75. Luque EM., Tissera A., Gaggino MP., Molina RI., Mangeaud., Vincenti L. M., Beltramone F., Larcher J. Sad, Estofán M. D, Fiol de Cuneo M. et al. (2015) Body mass index and human sperm quality: neither one extreme nor the other. *Reproduction, Fertility and Development* 29: 1-9.
76. Madsen L., Petersen RK and Kristiansen K. (2005) Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740: 266–286.
77. Malafaia AB., Nassif PAN., Ribas CAPM., Ariede LB., Sue NK., Cruz MA. (2013) Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arquivos Brasileiros*

- de Cirurgia Digestiva: ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery 26(1): 17–21.
78. Mammi C., Calanchini M., Antelmi A., Cinti F., Rosano GMC., Lenzi A., Caprio M and Fabbri A. (2012) Androgens and Adipose Tissue in Males: A Complex and Reciprocal Interplay. *International Journal of Endocrinology* 2012:1–8.
79. Menezes PT., Hill E., de Alencar MA., Lobo DPM., Monteiro-Moreira ACO., Breton S and Machado-Neves M. (2018) Pattern of protein expression in the epididymis of *Oligoryzomys nigripes* (Cricetidae, Sigmodontinae). *Cell and Tissue Research* 372: 135–147.
80. Merve AE., Arbak S and Ercan F. (2019) Ameliorating effects of exercise on disrupted epididymal sperm parameters in high fat diet-induced obese rats. *Marmara Medical Journal* 32:14–19.
81. Michalakis K., Mintziori G., Kaprara A., Tarlatzis BC. and Goulis DG. (2013) The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism* 62: 457–478.
82. Molinar TEM. (2015) Estudio del efecto de los ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles e iminociclitolos sobre marcadores relacionados con el síndrome metabólico. España: Universidad de Barcelona, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
83. Moore HDM and Bedford JM (1979) Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *The Anatomical Record* 193 293–311.
84. Neill JD and Knobil E. (2006) Amsterdam Ed. Elsevier/Academic Press. *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Vol. 1: pp.2950-2955 ISBN 0-7817-0086-8.
85. Novelli ELB., Diniz YS., Galhardi CM., Ebaid GMX., Rodrigues HG., Mani F., Fernandes AAH., Cicogna AC and Novelli FJLVB. (2007) Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals* 41: 111–119.
86. OCDE (2016) *OECD Reviews of Health Systems: Mexico 2016*. OECD Publishing.
87. O'Donnell L., Stanton P and de Kretser DM. (2000) *Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis*. *Endocrinology of Male*

- Reproduction. In KR. Feingold, B. Anawalt, & A. Boyce (Eds.), *Endocrinology of Male Reproduction*. pp. 1-69.
88. Oko R., Hermo L., Chan PT., Fazel A and Bergeron JJ. (1993) The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *The Journal of Cell Biology* 123: 809–821.
89. Oliver BM and Mach N. (2016) Factores nutricionales y no nutricionales pueden afectar la fertilidad masculina mediante mecanismos epigenéticos. *Nutrición Hospitalaria* 33: 1236–1244.
90. Orgebin-Crist MC and Davies J. (1974) Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. *Cell and Tissue Research* 148: 183-201.
91. Orgebin-Crist M-C and Jahad N. (1978) The Maturation of Rabbit Epididymal Spermatozoa in Organ Culture: Inhibition by Antiandrogens and Inhibitors of Ribonucleic Acid and Protein Synthesis. *Endocrinology* 103: 46–53.
92. Orgebin-Crist MC, Jahad N and Hoffman LH. (1976) The effects of testosterone, 5alpha-dihydrotestosterone, 3alpha-androstenediol, and 3beta-androstenediol on the maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture. *Cell and Tissue Research* 167: 515–525.
93. Paasch U., Grunewald S., Kratzsch J and Glander H-J. (2010) Obesity and age affect male fertility potential. *Fertility and Sterility* 94: 2898–2901.
94. Patton Kevin T. and Thibodeau Gary A. (2013) Ed. Elsevier *Anatomía y fisiología*. México: ed. 8a. pp 916-918.
95. Pongkan W., Pintana H., Sivasinprasasn S., Jaiwongkam T., Chattipakorn SC and Chattipakorn N. (2016) Testosterone deprivation accelerates cardiac dysfunction in obese male rats. *Journal of Endocrinology* 229: 209–220.
96. Primiani N., Gregory M., Dufresne, Smith C. E., Liu Y. L., Bartles J. R, Cyr D. G. and Hermo L. (2007) Microvillar Size and Espin Expression in Principal Cells of the Adult Rat Epididymis Are Regulated by Androgens. *Journal of Andrology* 28: 659–669.
97. Robaire B and Hamzeh M. (2011) Androgen Action in the Epididymis. *Journal of Andrology* 32: 592–599.



98. Robaire B and Hinton BT. (2015) USA: Elsevier. The Epididymis. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, pp 691–771.
99. Robaire B and Viger RS. (1995) Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction* 52: 226–236.
100. Robaire B., Seenundun S., Hamzeh M and Lamour S-A. (2007) Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 9: 545–553.
101. Robaire B. and Hamzeh M. (2011) Androgen Action in the Epididymis. *Journal of Andrology* 32: 592–599.
102. Robert S., Gilles and Julie G. (2007) Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* 9: 483–491.
103. Rosini TC. (2012) Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras* 58(3):383-387.
104. Ross MH, Pawlina wojciech. and Barnash TA (2009) Atlas of Descriptive Histology Ross Pawlina\_booksmedicos.org.pdf.pp.538-540.
105. Sclafani A and Gorman AN. (1977) Effects of age, sex, and prior body weight on the development of dietary obesity in adult rats. *Physiology & Behavior* 18: 1021–1026.
106. Seiler P., Cooper TG and Nieschlag E. (2000) Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *International Journal of Andrology* 23: 65–76.
107. Setchell BP. (1994) Possible physiological bases for contraceptive techniques in the male. *Human Reproduction* 9: 28–35.
108. Shum WWC., Hill E., Brown D and Breton S. (2013) Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *REPRODUCTION* 146: 455–469.
109. Shum WWC., Ruan YC., Da Silva N and Breton S. (2011) Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. *Journal of Andrology* 32: 576–586.
110. Sullivan R and Mieusset R. (2016) The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update* 22: 574–587.

111. Sullivan R., Saez F., Girouard JJ and Guillees J. (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35: 1–10.
112. Swan SH., Elkin EP and Fenster L. (2000) The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives* 108:961–966.
113. Tamori Y., Masugi J., Nishino N and Kasuga M. (2002) Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes* 51: 2045–2055.
114. Teerds KJ., de Rooij DG and Keijer J. (2011) Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Human Reproduction Update* 17: 667–683.
115. Tekpetey FR., Veeramachaneni DNR and Amann RP. (1989) Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells. *Reproduction* 87: 311–319.
116. Traish AM., Guay A., Feeley R and Saad F. (2008) The Dark Side of Testosterone Deficiency: I. Metabolic Syndrome and Erectile Dysfunction. *Journal of Andrology* 30: 10–22.
117. Turner TT., Johnston DS., Jelinsky SA., Tomsig JL and Finger JN. (2007) Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology* 9: 565–573.
118. Turner TT, Bomgardner DD., Jacobs JP and Nguyen QAT. (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction (Cambridge, England)* 125: 871–878.
119. Varga T., Czimmerer Z and Nagy L. (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812: 1007–1022.
120. Valderrama L, Cervantes R, Fragoso I, Rodríguez-Tobón A, González-Márquez H, Arrieta Cruz I, Del Rosario Tarragó Castellanos M, Silva M and Arenas-Ríos E (2016) Efecto de la obesidad en la fertilidad masculina.


- Estudios en modelos animales. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3: 44–51.
121. Vigueras-Villaseñor RM., Rojas-Castañeda JC., Chávez-Saldaña M., Gutiérrez-Pérez O., García-Cruz ME., Cuevas-Alpuche O., Reyes-Romero MM and Zambrano E. (2011) Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica* 113: 214–220.
  122. Waites GMH. (1991) Ed. AW Zorngniotti. Boston, MA: Springer US. Thermoregulation of the Scrotum and Testis: Studies in Animals and Significance for Man. In *Temperature and Environmental Effects on the Testis*. pp 9–17.
  123. WHO Organización Mundial de la salud (2017). Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
  124. Wishani MM. (1991) Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: Clinical aspects. *The Journal of Urology* 145: 780–784.
  125. Wojciech Pawlina. (2016) *Histología Texto y Atlas correlación con biología molecular y celular*. Philadelphia: Wolters Kluwer. pp 1239-1245.
  126. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R. R, Nygren K., Sullivan E., van der Poel S., behalf, ICMART. (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction* 24: 2683–2687.
  127. Zhang J and Scarpace PJ. (2009) The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo: Soluble receptor neutralizes leptin action in vivo. *British Journal of Pharmacology* 158: 475–482.
  128. Zhao J., Zhai L., Liu Z., Wu S and Xu L. (2014) Leptin Level and Oxidative Stress Contribute to Obesity-Induced Low Testosterone in Murine Testicular Tissue. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. pp.1-15
  129. Zhou W., De Iuliis GN., Dun MD and Nixon B. (2018) Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in Endocrinology* 9(59):1-13.



Efecto del sobrepeso y la obesidad en los cambios de la morfología celular del epididimo y parámetros espermáticos en la rata Wistar.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de febrero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS  
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA  
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA  
DRA. HERLINDA BONILLA JAIME



MARIA GUADALUPE MENDOZA DELGADO  
ALUMNA


Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
DE: MARIA GUADALUPE MENDOZA DELGADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA




DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL



DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL



M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

SECRETARIA



DRA. HERLINDA BONILLA JAIME