



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TESIS

**ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES: SUPERÓXIDO
DISMITASA, CATALASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA , EN EL
ESPERMATOZOIDE Y LÍQUIDO SEMINAL DE CONEJO NUEVA
ZELANDA Y SU RELACIÓN CON EL SOBREPESO.**

QUE PRESENTA:

BIÓL. ANA ISABEL COTA MAGAÑA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TUTORA:

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

México D. F a 25 de Junio de 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00010

Matrícula: 2121800264

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPEROXIDO DISMUTASA, CATALASA Y GLUTATION PEROXIDASA EN EL ESPERMATOZOIDE Y LIQUIDO SEMINAL DE CONEJO NUEVA ZELANDA Y SU RELACION CON EL SOBREPESO.

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 25 del mes de junio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. GISELA FUENTES MASCORRO
- DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE
- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
- DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, 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: ANA ISABEL COTA MAGAÑA

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

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



ANA ISABEL COTA MAGAÑA
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. GISELA FUENTES MASCORRO

VOCAL

DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE

VOCAL

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

SECRETARIO

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

Comité Tutorial

TUTORA:

Dra. Edith Arenas Rios

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología de la Reproducción. Área de Biología de la Reproducción Asistida.

ASESORES:

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Biología de la Reproducción. Área de Biología de la Reproducción Asistida.

Dra. Gisela Fuentes Mascorro

Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal.

Este proyecto se realizó en las instalaciones del laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Gracias al financiamiento el acuerdo UAM-I-CA-136 Factores celulares, Genético y Endocrinos Relacionados con Alteraciones en la Maduración Espermática.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad. Programa 003797 Del CONACyT.

Para el desarrollo de este proyecto se contó con apoyo económico para la alumna por parte de la UAM (Programa de Becas de Posgrado, Acuerdo 02/2011 del Rector General), así como del CONACyT (Programa 003797).

Los miembros del jurado aprobados por la comisión académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa Aprobaron la tesis presentada por la Bióloga Ana Isabel Cota Magaña con el título:

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES: SUPERÓXIDO DISMITASA, CATALASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA , EN EL ESPERMATOZOIDE Y LÍQUIDO SEMINAL DE CONEJO NUEVA ZELANDA Y SU RELACIÓN CON EL SOBREPESO.

Para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal

Miembros del jurado:

Presidenta: Dra. Gisela Fuentes Mascorro

Secretario: Dr. Miguel Ángel León Galván

Vocal: Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Vocal: Dra. Marcela Vergara Onofre

*Enséñanos de tal modo a contar nuestros días,
que traigamos al corazón sabiduría.*

Salmos 90:12

Quiero Agradecer a Dios por haberme dado la oportunidad de estudiar esta maestría y ha puesto los medios para llegar hasta hoy, pero sobretodo le agradezco la fortaleza que me ha dado para salir adelante en mis estudios. Le agradezco por la vida de mis padres, mis hermanos y mi abuelita que me han apoyado en cada paso que he dado desde el día que nací y han estado conmigo en todo momento.

Quiero agradecer a mi novio Damián por todo lo que ha hecho por mí y por el apoyo que me ha dado en todos estos años, por sus consejos, su paciencia y sobretodo su amor.

Agradezco a mis maestros Javier Velázquez, Emilio Domínguez, Anabel Jiménez, José Ángel Rojas, Adolfo Flores y Gilberto Hernández por todas las oportunidades que me han dado, por todas las que no me dieron y sobretodo porque me han brindado su amistad.

Y en especial a la Doctora Edith Arenas que me ayudó en un momento en que nadie lo hizo y juntas defendimos este proyecto en cada paso y a pesar de todo.

A mis queridos compañeros de la Maestría Jesús, Cindy, Ramón, Jany, Lorena, Luis y Elisa que fueron grandes compañeros y amigos y juntos logramos llegar hasta aquí y superamos todas las pruebas juntos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio con quienes he compartido trabajo, sufrimiento, diversiones, desvelos, frustraciones, placeres y éxitos de todos y que somos más que amigos una familia.

Agradezco de manera especial al Maestro en Economía Gabriel Darío Ramirez Sierra (Maestro Mico) por su apoyo con el análisis estadístico.

A todos ustedes, Muchas gracias. Y con amor les dedico este trabajo

ÍNDICE

1. RESUMEN
2. ABSTRACT
3. INTRODUCCIÓN
 - 3.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO)
 - 3.2. Morfofisiología del espermatozoide y la formación de ERO
 - 3.3. Enzimas antioxidantes
 - 3.3.1. Superóxido dismutasa
 - 3.3.2. Catalasa
 - 3.3.3. Glutación peroxidasa
 - 3.3.4. Enzimas antioxidantes en el tracto reproductor masculino
 - 3.3.5. Participación de la actividad de las enzimas antioxidantes con la estructura y fisiología del espermatozoide
4. ANTECEDENTES
 - 4.1. Etiología de la obesidad
 - 4.2. Modelos animales de obesidad
 - 4.3. Efecto de la obesidad en la infertilidad masculina
 - 4.4. Obesidad y especies reactivas de oxígeno
5. JUSTIFICACIÓN
6. OBJETIVOS
 - 6.1. Objetivo general
 - 6.2. Objetivos específicos
7. HIPÓTESIS
8. MATERIAL Y MÉTODOS
 - 8.1. Material biológico
 - 8.2. Inducción de sobrepeso
 - 8.3. Toma de muestras de seminales
 - 8.4. Análisis espermatozobiológico

8.5. Tratamiento para el líquido seminal y espermatozoides

8.6. Determinación de la actividad enzimática en espermatozoides

8.6.1. Determinación de SOD

8.6.2. Determinación de CAT

8.6.3. Determinación de GPX

8.7. Determinación de la actividad enzimática en líquido seminal

9. RESULTADOS

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIONES

12. BIBLIOGRAFÍA

13. APENDICE 1: Medios y soluciones

14. APENDICE 2: Sistemas de reacción

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Formación de las principales ERO a partir del oxígeno molecular. Tomada de Domínguez, 2007; (Donde FSII es el fotosistema II; COX es el citocromo c; NOS es el óxido nítrico sintasa; O₃ es el Ozono y $h\nu$ es la energía de radiación).

Figura 2 Estructura general del espermatozoide de mamíferos. (Traducido al español de Eddy, 2006).

Figura 3: Reacción de la SOD para la dismutación de O₂⁻ en peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular. Modificado de KEGG (www.genome.jp/KEGG/).

Figura 4 Reacción catalítica de la catalasa, en esta reacción se utilizan dos moléculas de H₂O₂ para su conversión en O₂ y Agua metabólica. (Modificado de KEGG www.genome.jp/KEGG/).

Figura 5. Reacción peroxidativa de la catalasa, en esta reacción utiliza como donadores de hidrógeno al metanol o al formaldehído para la producción de dos moléculas de agua metabólica. (Modificado de KEGG www.genome.jp/KEGG/).

Figura 6. Reacción de la glutatión peroxidasa, en esta reacción se utiliza el glutatión como donador de electrones para convertir el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua (Modificado de KEGG; www.genome.jp/KEGG/).

Figura 7. Comparación del peso de conejos Nueva Zelanda con dieta control (alimento comercial) y con dieta hipercalórica (alimento comercial adicionado con aceite vegetal). El asterisco indica que existen diferencias estadísticamente significativas a P<0.05 con la prueba T Student. (SPSS).

Figura 8. Curva estándar de albúmina para cuantificación de proteínas. El eje X representa la concentración en mg/mL y el eje y la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de luz UV.

Figura 9. Comparación de la concentración de proteínas en espermatozoides de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. No se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$.

Figura 10. Comparación de la concentración de proteínas en espermatozoides de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. No se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$ prueba T de Student SPSS)

Figura 11. Curva estándar de Superóxido dismutasa, el eje X representa el porcentaje de inhibición; el eje Y es el logaritmo base 10 de la concentración de S1-S6.

TABLAS

Tabla 1. Parámetros seminales de conejos Nueva Zelanda normopeso contra sobrepeso. Promedio \pm Error estándar. .

Tabla 2. Porcentaje de espermatozoides normales y principales anormalidades espermáticas de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. (* $p < 0.05$ prueba T de Student).

Tabla 3. Actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en líquido seminal y espermatozoides de conejo Nueva Zelanda; grupos normopeso contra sobrepeso. La actividad específica de SOD y GPX expresada en U/mg de proteína/min y CAT en K/mg de proteína/min. Promedio \pm Error estándar. (*Diferencias significativas a $p < 0.05$ prueba de U de Mann-Whitney, SPSS)

Tabla 4. Coeficientes de correlación de la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX. SOD: Superóxido dismutasa. CAT: Catalasa; GPX: Glutación peroxidasa.

1 RESUMEN

La obesidad y el sobrepeso son condiciones que actualmente han alcanzado proporciones epidemiológicas, siendo una de las principales causas de enfermedades crónico degenerativas en seres humanos y también se le ha asociado con problemas de fertilidad en hombres en edad reproductiva que han asistido a clínicas de fertilidad. Sin embargo los mecanismos por los cuales se desarrollan estos problemas siguen siendo poco conocidos, a pesar que se han propuesto diversas teorías para poder explicarlo, aun hacen falta estudios en población abierta o de investigación básica que nos lleven a encontrar la respuesta a este problema. En este trabajo se plantea que al haber un estado fisiológico de sobrepeso inducido en conejos Nueva Zelanda, la función de las enzimas antioxidantes se verá alterada, particularmente, en el espermatozoide y líquido seminal del eyaculado, protegiéndolo del estrés oxidativo que podría ser una causa de subfertilidad. Por tal motivo, se evaluó la calidad seminal del eyaculado de conejos Nueva Zelanda, a los cuales se les indujo sobrepeso mediante la administración de una dieta hipercalórica, encontrando que, el porcentaje de espermatozoides inmóviles resultó significativamente mayor en las muestras del grupo de sobrepeso con respecto al grupo control; además al medir la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX encontramos que la actividad de SOD en espermatozoides se ve aumentada en aquellos animales que recibieron la dieta hipercalórica comparado con los controles, que recibieron una dieta normal.

Estos resultados nos muestran que la actividad de la SOD aumenta, probablemente, porque la producción de ERO en el espermatozoide es mayor debido al sobrepeso, tratando de proteger al espermatozoide del daño oxidativo, sin embargo, la actividad de las enzimas CAT y GPX no se ve alterada. Los coeficientes de correlación muestran que la actividad de CAT y GPX en espermatozoides de conejo con sobrepeso tienen una relación directa, lo que indica que estas dos enzimas metabolizan conjuntamente al H_2O_2 ; mientras que en conejos con normopeso solo la CAT metaboliza al H_2O_2 .

2 ABSTRACT

Obesity and overweight are conditions that have now reached epidemiological proportions, one of the leading causes of chronic degenerative diseases in humans and have also been associated with fertility problems in men of reproductive age who visited fertility clinics. However, the mechanisms by which these problems develop remain poorly understood, although several theories have been proposed to explain even open studies are needed in basic research or lead us to find the answer to this problem population. This paper argues that to be a physiological state induced overweight in New Zealand rabbits, the role of antioxidant enzymes will be altered, particularly in the sperm and seminal fluid ejaculated, protecting it from oxidative stress could be a cause of subfertility. Therefore, the semen quality of the ejaculate of New Zealand rabbits to which were induced overweight by administering a high-fat diet, finding that the seminal parameters was no significantly differences in samples from the group of overweight was assessed the control group ; also to measure the activity of SOD, CAT and GPX antioxidant enzymes found that SOD activity in sperm whit overweight is increased in those animals receiving the high-fat diet compared to controls that received a normal diet.

These results show that the activity of SOD increased, probably because the production of ROS in the sperm is higher due to overweight, trying to protect the sperm from oxidative damage, however, the activity of CAT and GPX enzymes not altered. The correlation coefficients show that CAT and GPX activity in rabbit sperm with overweight have a direct relationship, indicating that these two enzymes metabolize H_2O_2 together, while in rabbits with normal weight only CAT metabolized to H_2O_2 .

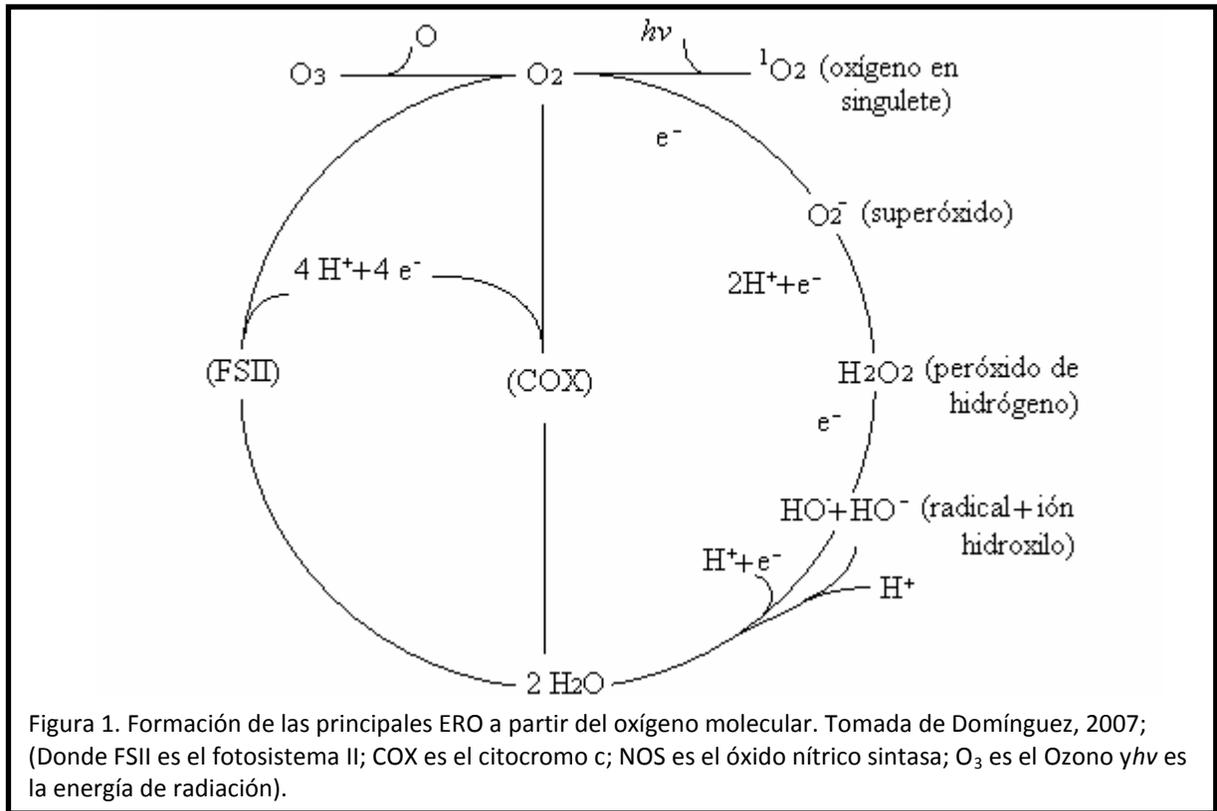
3 INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud que pueden contribuir a la aparición de distintas enfermedades crónico-degenerativas tales como diabetes o hipertensión, y más recientemente se le ha asociado con problemas de fertilidad tanto en hombres como en mujeres en edad reproductiva. En los hombres, se ha observado pérdida de la movilidad espermática, y dado que se ha reportado que la disminución de la movilidad puede ser provocada por estrés oxidativo debido al aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO), algunas de estas consideradas radicales libres, el presente trabajo está enfocado en el estudio de las enzimas anti-ERO en espermatozoides y líquido seminal de conejos Nueva Zelanda con sobrepeso.

3.1 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados, estos suelen ser muy inestables y buscan la manera de completar su par electrónico para anular su campo magnético, dichas reacciones son muy rápidas y el tiempo de vida de las moléculas suele ser muy corto. (Miranda L.D 2008). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son formas reducidas del oxígeno (O_2), y algunas consideradas radicales libres, sin embargo, no todos los productos lo son y se generan como resultado del metabolismo celular (Miranda L.D 2008), no obstante, a concentraciones fisiológicas están relacionadas con procesos de señalización celular, sin embargo, cuando hay un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad del sistema antioxidante para metabolizarlas y prevenir o reparar el daño provocado por las mismas, se da el efecto conocido como estrés oxidativo. Todos los componentes celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares son blancos potenciales de las ERO, el daño provocado por las ERO depende no solo de la cantidad y naturaleza de las mismas, sino también de factores como la temperatura, tensión del oxígeno y la composición del ambiente que lo rodea (Hammoud *et al.*, 2008).

Algunos ejemplos de ERO son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($^{\circ}OH$) (Figura 1).



El anión superóxido es la primera ERO que se produce durante el metabolismo celular, se forma mayormente en la cadena respiratoria debido a que una parte de los electrones que pasan por ésta son captados por el O_2 , principalmente en la ubiquinona y la NADPH deshidrogenasa. Se ha reportado que aproximadamente el 0.1% del oxígeno que se consume en la respiración forma O_2^- . El superóxido es poco reactivo, su toxicidad radica en que es capaz de originar oxígeno singulete (1O_2) y $^{\circ}OH$; sin embargo, también puede dañar proteínas con centros Fe-S (Hansberg 2008).

El H_2O_2 o agua oxigenada se forma cuando cada uno de los electrones libres del O_2 se aparea con un electrón de giro contrario. Se produce principalmente por la reacción de Fenton, en la cual un electrón de un metal es captado por el H_2O_2 . La reacción de la SOD produce la mayor parte del H_2O_2 en las células. Se puede difundir

a través de los compartimientos celulares, es menos reactivo que el O_2^- y no interacciona con compuestos como el NADPH, ácidos nucleicos, los aminoácidos de las proteínas ni con lípidos (Hansberg 2008). Es tóxico a concentraciones intracelulares mayores a $1\mu M$ debido a que puede formar 1O_2 y $^{\circ}OH$. El H_2O_2 se emplea en funciones importantes como la maduración y capacitación de los espermatozoides (Hansberg 2008).

Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado de un metal de transición como el Fe(II) o el Cu(I) se fragmenta y forma $^{\circ}OH$ y OH^- , el segundo se protona formando agua mientras que el primero interacciona con cualquier compuesto vecino.

El $^{\circ}OH$ es uno de los compuestos más reactivos que existen, no se puede difundir debido que reacciona con cualquier compuesto celular. Es capaz de oxidar tanto a las purinas como a las pirimidinas, y la desoxirribosa, provocando daños a los ácidos nucleicos; la mayor parte del daño a las proteínas es provocado por el radical hidroxilo ya que puede reaccionar con cualquier aminoácido donde se produzca, que generalmente son los sitios activos donde se encuentra el metal de transición. Las ERO atacan a los ácidos grasos en la membrana provocando una cascada de reacciones químicas llamada lipoperoxidación (Mekker, 2008; Hansberg, 2008).

La lipoperoxidación ocurre como una reacción en cadena, procede a través de tres pasos principales: iniciación, propagación y terminación (Zenteno y Saldaña 2008).

Durante la iniciación los radicales libres reaccionan con las cadenas de ácidos grasos y liberan radicales libres lipídicos, estos pueden reaccionar con oxígeno molecular para formar radicales lipoperóxidos (Zenteno y Saldaña 2008).

Los radicales peroxilo pueden reaccionar con ácidos grasos para producir radicales libres lipídicos y entonces se propaga la reacción (Zenteno y Saldaña 2008).

La reacción termina cuando dos moléculas de peróxidos colisionan entre sí o cuando reaccionan con algún antioxidante disponible (Zenteno y Saldaña 2008).

El espermatozoide es una célula que es muy susceptible al daño por estrés oxidativo, debido a que posee una membrana plasmática formada por ácidos grasos poliinsaturados, los cuales pueden ser blanco de las ERO durante su formación en el testículo y/o durante su tránsito por el epidídimo (Aitken 1996).

3.2 Morfofisiología del espermatozoide y la formación de ERO

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis, sus componentes principales son la cabeza y el flagelo. En la cabeza se encuentra el núcleo, el cual contiene a la cromatina altamente condensada y está limitada anteriormente por el acrosoma, que favorecerá la unión con el ovocito (Eddy, 2006; Figura 2).

El flagelo se encuentra dividido en tres partes principales: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. En la pieza media se encuentra el axonema y rodeando a este se está la capa de mitocondrias, maquinaria encargada principalmente de la generación de energía (Eddy, 2006; Figura 2).

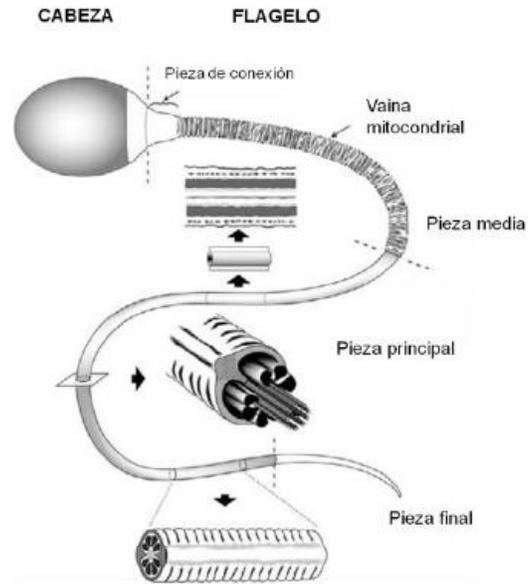


Figura 2 Estructura general del espermatozoide de mamíferos. (Traducido al español de Eddy, 2006).

Para la obtención de energía en el metabolismo aeróbico de los espermatozoides producen en la mitocondria ERO algunas de estas radicales libres, las cuales pueden ser potencialmente dañinas para la misma célula (Tavilani 2008). Sin embargo, se ha podido comprobar, que bajo condiciones fisiológicas son de gran importancia para la adquisición de la capacidad fertilizante (Mekker 2009).

Los metabolitos del oxígeno producidos en el espermatozoide incluyen al O_2^- y el H_2O_2 y ambas moléculas están involucradas en el control de la fisiología espermática a nivel de la hiperactivación, la reacción acrosomal y la fusión espermatozoide-ovocito (Aitken *et al.*, 1995).

En experimentos en los que se ha expuesto a espermatozoides de humano y hámster a concentraciones exógenas de H_2O_2 se ha observado que estimula la reacción acrosomal así como la fusión espermatozoide-ovocito (Bize *et al.*, 1991). La exposición de espermatozoides humanos a O_2^- tiene una acción estimuladora directa sobre el índice de hiperactivación (Aitken 1997).

Sin embargo, se ha asociado al O_2^- y al H_2O_2 con la etiología de la deficiencia de la función espermática (Aitken *et al.*, 1995), las ERO atacan a los ácidos grasos en la membrana provocando lipoperoxidación (Mekker *et al.*, 2008), esto puede provocar pérdida de la fluidez e integridad de la membrana y la inhibición de la generación de ATP (Aitken 1997).

Por tal motivo el aumento en los niveles de ERO también está relacionado con una disminución en la movilidad espermática (Álvarez y Storey 1982, Hammoud *et al.*, 2008). El mecanismo exacto no se conoce, sin embargo se han propuesto diferentes hipótesis, una de ellas propone que el H_2O_2 puede difundirse a través de la membrana e inhibir la actividad de algunas enzimas vitales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Otra hipótesis involucra una serie de eventos resultando en una disminución de la fosforilación de las proteínas del axonema y la inmovilización espermática, ambos eventos están relacionados con una reducción en la fluidez de la membrana que es necesaria para la fusión espermatozoide-ovocito (Hammoud *et al.*, 2008).

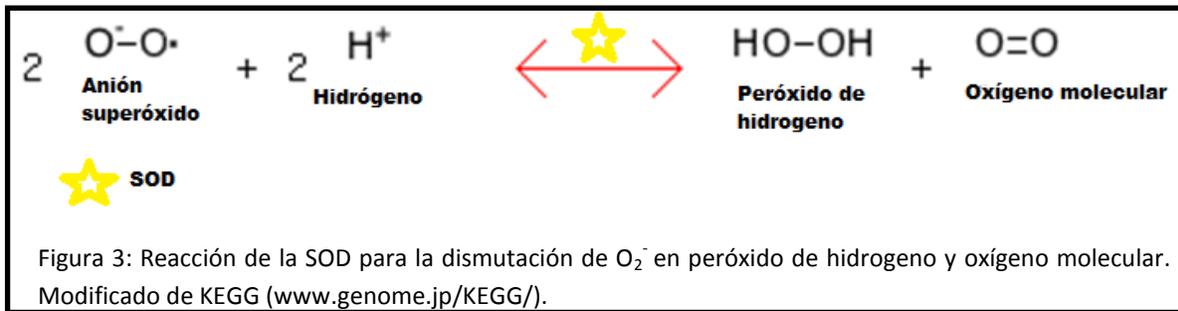
En el semen encontramos distintos tipos celulares, tales como espermatozoides maduros e inmaduros, leucocitos y células epiteliales, de estos tipos celulares, los leucocitos y los espermatozoides son considerados la mayor fuente de ERO. Se han propuesto dos vías para la producción de ERO en el espermatozoide, la primera es a través del sistema NADPH oxidasa, a nivel del plasma seminal y la oxidoreductasa dependiente de NADPH en la mitocondria. La producción externa de ERO particularmente de O_2^- y H_2O_2 puede ser resultado por la contaminación por leucocitos dentro del semen, esta generación de ERO está asociada a pacientes infértiles o subfértiles (Aitken *et al.*, 1995). De ahí, la importancia de los mecanismos que regulan su producción como las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX).

3.3 Enzimas antioxidantes

3.3.1 Superóxido dismutasa (SOD)

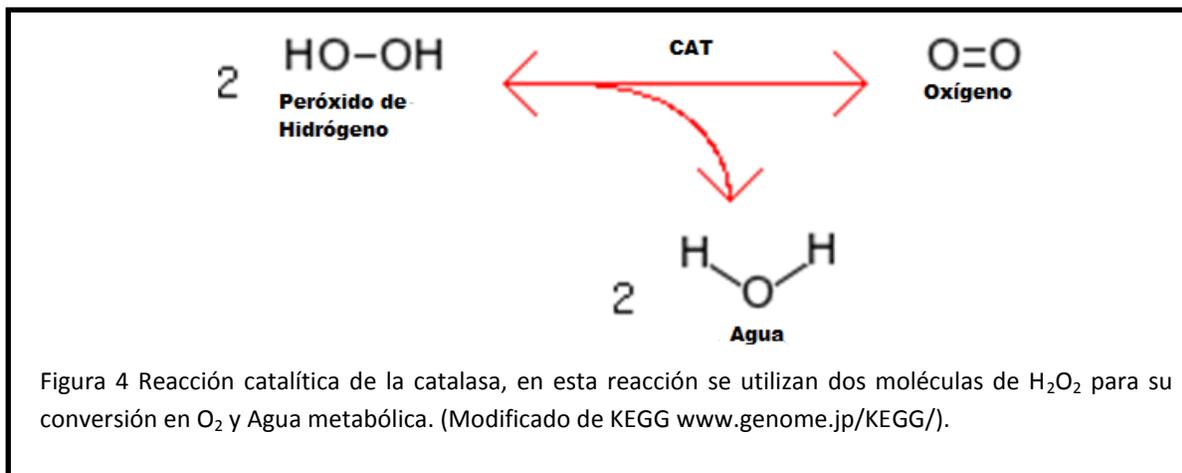
Las SOD son una familia de enzimas que catalizan la dismutación de O_2^- (Figura 3), en los mamíferos se reconocen tres enzimas de esta familia, dos intracelulares y una extracelular. La SOD1 se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y la membrana externa mitocondrial, su centro catalítico está formado por un cobre y un zinc (SOD Cu-Zn). Su expresión es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioleta, metales pesados y estrés oxidativo. La SOD2 se encuentra dentro de la mitocondria, ya que es un organelo que está sometido mayormente a estrés oxidativo, y tiene un centro catalítico de Mn. La SOD3 está presente en la matriz extracelular principalmente unida a heparina y a las fibras de colágena tipo 1 de la mayoría de los tejidos, además se ha encontrado en plasma, fluido linfático y líquido cefalorraquídeo, pero su concentración es 20 veces mayor en la matriz extracelular que en el plasma (Gómez-Quiroz y Cuevas 2008).

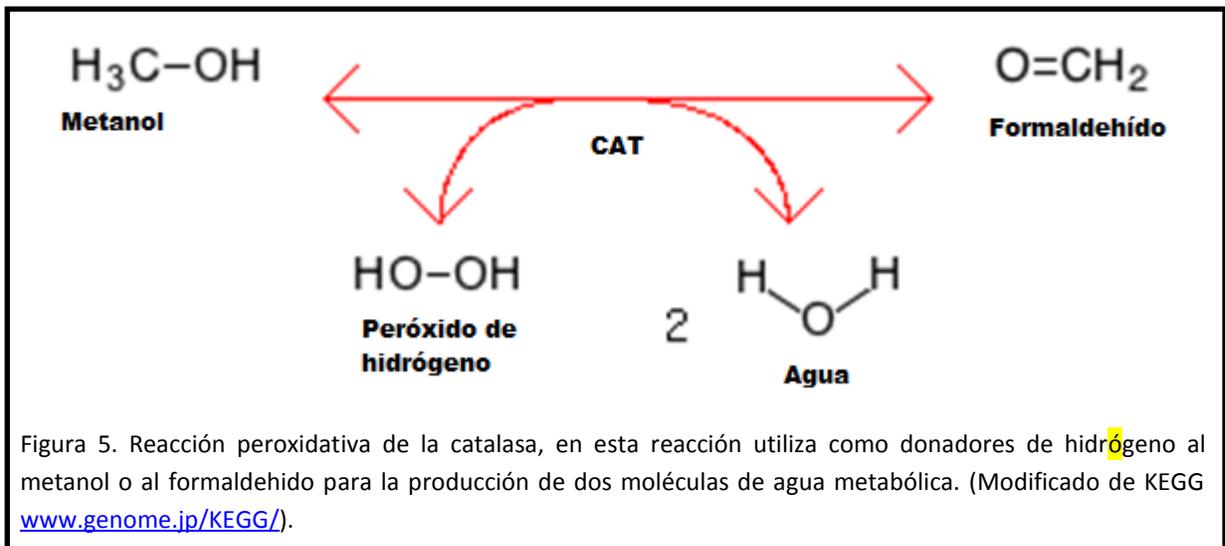
La reacción enzimática de la SOD se lleva a cabo en dos pasos, primero el O_2^- llega al centro de reacción y se une a una arginina, el O_2^- dona su electrón, el cual es transferido al Cu, que se transforma en Cu^+ , esto provoca que el enlace entre la histidina y el Cu se rompa, y protona al Nitrógeno de la histidina, el O_2 formado se disocia de la arginina y se libera. La segunda parte de la reacción comienza de manera similar a la primera, el O_2^- llega al centro catalítico de la enzima y se une a una Arginina; cerca del centro catalítico, se protona una molécula de agua (H_3O^+). El electrón que recibió el Cu es transferido al O_2^- lo cual oxida al metal a su forma Cu^{2+} . Los dos electrones que posee el superóxido, forman inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones donados uno por la molécula de agua y otro del nitrógeno de la histidina, con lo cual se libera H_2O_2 y la enzima se regenera (Gómez-Quiroz y Cuevas 2008).



3.3.2 Catalasa (CAT)

La catalasa realiza el metabolismo de H_2O_2 , se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas. CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, una catalítica y una peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de H_2O_2 (Miranda 2008) (Figura 4). En la reacción peroxidativa la enzima utiliza como donadores de Hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol, y formaldehido (Figura 5). Una molécula de catalasa es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo, la primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es la heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno, en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno y forma agua (Peraza-Reyes 2008).



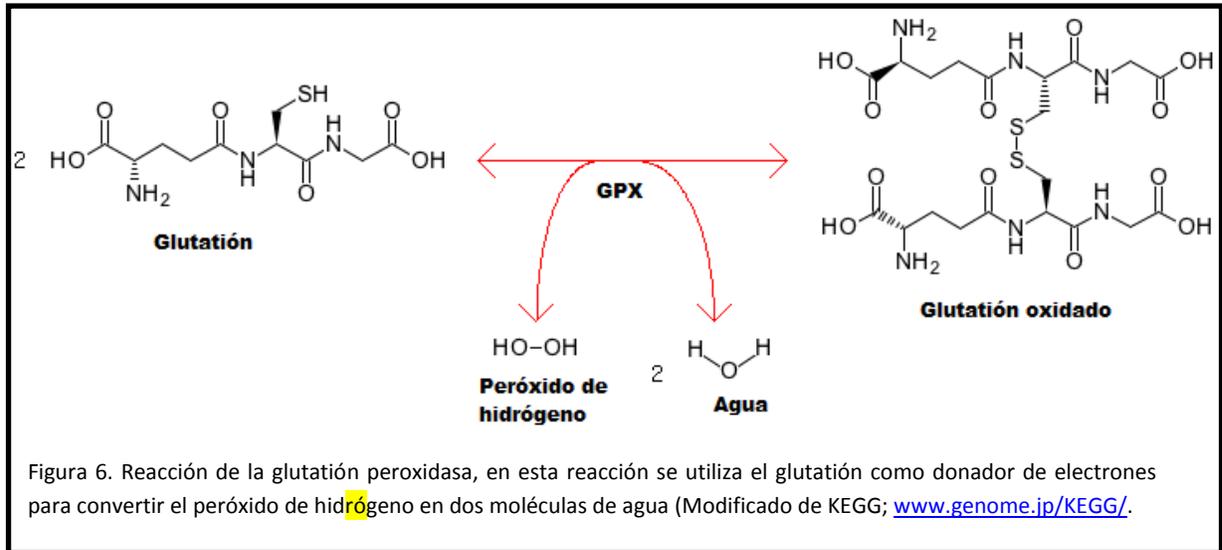


3.3.3 Glutación peroxidasa (GPX)

Esta es una enzima dependiente de Selenio (Se), cataliza la reducción de H_2O_2 y también la reducción de lipoperóxido ($\text{L}-\text{OOH}$), utilizando al glutación (GSH) como agente reductor (Figura 6). Glutación peroxidasa es el nombre genérico de un grupo de isoenzimas que poseen una triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano; se conocen cuatro enzimas mayoritarias en los tejidos de los mamíferos todas dependientes de Selenio: GPX citosólica (GPX1), GPX gastrointestinal (GPX2), GPX plasmática (GPX3) y GPX de fosfolípidos (GPX4). El centro activo se encuentra en el átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína; entre las diferentes formas de GPX se conserva casi intacta esta estructura del centro catalítico ((Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).

La capacidad reductora de las enzimas GPX se basa en altas concentraciones de glutación reducido (GSH); un tripéptido celular con un grupo sulfhidrilo, con capacidad antioxidante. Durante el mecanismo catalítico de GPX un selenol reacciona con un peróxido para dar ácido selénico, aquí es donde se une el primer GSH formando agua y una proteína Se-SG, se enlaza un segundo GSH produciendo una proteína Se-GH mas un H^+ y un GSSG.

El GSSG formado durante la reacción es reducido por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).



3.3.4 Enzimas antioxidantes en el tracto reproductor masculino

Las tres enzimas antioxidantes (GPX, CAT y SOD) están presentes en el tracto reproductor masculino. De las cuales la principal es la GPX ya que varios de los miembros de esta familia se encuentran asociados o cercanos al espermatozoide en el epidídimo (Ursini *et al.*, 1999).

La GPX1 se ha encontrado en testículos, próstata, vesículas seminales, vaso deferente y epidídimo. La GPX3 se ha encontrado mayormente en el epidídimo y en vaso deferente. En el espermatozoide se encuentra la GPX4 como un componente estructural esencial de la pieza media, también se localiza en el núcleo donde se piensa que tiene un papel importante en la maduración espermática (Ursini *et al.*, 1999; Vernet 2004; Chavory *et al.*, 2010). La GPX5 fue la primera enzima encontrada en el tracto reproductor masculino, esta proteína es secretada al lumen del epidídimo donde se ha asociado a los espermatozoides en tránsito (Jiménez 1992). Esta proteína está presente en el ambiente espermático tanto durante el tránsito

epididimario como en el eyaculado, y tiene alta afinidad al sustrato, sin embargo su importancia es solo cuando se alcanzan concentraciones de H_2O_2 mayores a 10^{-6} M (Jiménez 1992, Chavory *et al.*, 2010).

El epidídimo también posee SOD1 así como una enzima secretada particularmente por el epidídimo (eSOD3), estas enzimas catalizan la dismutación del O_2^- . Una posible función de la eSOD3, asociada a la membrana del espermatozoide de la cauda del epidídimo, es la producción de H_2O_2 en la eyaculación para estimular los eventos de fosforilación de tirosina asociados a la inducción de la movilidad y la iniciación de la capacitación (Aitken 1997).

3.3.5 Participación de la Actividad de las enzimas antioxidantes con la estructura y fisiología del espermatozoide

Tavilani y cols., en 2008 estudiaron la relación entre la actividad enzimática de SOD, CAT y GPX con la astenozoospermia (baja movilidad espermática), de ahí proponen que la lipoperoxidación podría estar provocando la pérdida en la movilidad de los espermatozoides. Estos autores demostraron que los hombres con astenozoospermia no tienen actividad enzimática deficiente, comparados con los normozoospermicos; sin embargo, encontraron un alto contenido de malondialdehído (MDA), que es un producto de la lipoperoxidación, en los espermatozoides de individuos astenozoospermicos. En las muestras de individuos normozoospermicos se encontró una relación inversa entre la actividad enzimática de CAT, GPX y SOD con la producción de MDA, lo que muestra que existe una correlación y coordinación en la actividad de estas tres enzimas para proteger a la célula. Los autores concluyen que bajo condiciones normales las enzimas protegen los espermatozoides de la lipoperoxidación mientras que cuando hay una patología las enzimas no pueden proteger al espermatozoide adecuadamente y esto causa lipoperoxidación de la membrana plásmática del espermatozoide.

En clínicas de fertilidad se ha reportado que en patologías como astenozoospermia (baja movilidad espermática), oligozoospermia (baja concentración espermática) y

teratozoospermia (deformaciones de los espermatozoides), la actividad de las enzimas SOD y CAT se incrementa sobretodo en oligozoospermicos, comparado con los sujetos normales. En individuos con astenozoospermia la actividad de SOD se vio aumentada comparada con los normales mientras que no se registró actividad de CAT excepto en teratozoospermicos (Sanocka *et al.*, 1997).

Al evaluar la asociación entre la calidad seminal y la integridad del ADN con el estrés oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes, se ha encontrado que la concentración espermática, la movilidad progresiva y el porcentaje de morfología normal se correlacionan positivamente con la actividad de las enzimas CAT y SOD, mientras que existe una correlación negativa de estos parámetros seminales con la peroxidación lipídica (Shiva *et al.*, 2011).

Otros trabajos muestran que existe una correlación negativa entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de MDA, y que esto repercute principalmente en la movilidad espermática (Atig *et al.*, 2013 Shiva *et al.*, 2011), además se ha visto en pacientes con oligoteratozoospermia que la actividad de estas enzimas esta disminuida significativamente (Atig 2013).

Álvarez y Storey en 1982, demostraron que el espermatozoide de conejo produce H_2O_2 ; también se ha encontrado O_2^- en el espermatozoide de conejo, y una gran actividad de SOD, tanto mitocondrial como citosólica por lo que sugieren que la lipoperoxidación se produce de manera natural en el espermatozoide y que esta reacción puede provocar la muerte de la célula. De las tres enzimas antioxidantes la SOD es la que participa de manera más activa en el espermatozoide. La producción de anión superóxido bajo condiciones de incubación aeróbica es probablemente el agente más dañino en el espermatozoide de conejo.

Los estudios realizados por Álvarez y Storey (1982) muestran una correlación con el aumento de la lipoperoxidación y la pérdida de la movilidad, así como la actividad de las enzimas antioxidantes, sobretodo de la SOD para la protección contra el efecto del O_2^- (Álvarez y Storey 1983). En otro estudio realizado por estos autores,

demostraron que la lipoperoxidación daña a la membrana plasmática sobre todo a la región post acrosomal, dañando la membrana plasmática del espermatozoide, pero también daña a las enzimas lactato deshidrogenasa, piruvato cinasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y ATPasa, lo cual genera la pérdida en la movilidad del espermatozoide y la muerte celular (Álvarez y Storey 1984).

4 ANTECEDENTES

4.1 Etiología de la obesidad

El sobrepeso y la obesidad están definidos como una acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo, que puede ser perjudicial para la salud. En la actualidad se han alcanzado dimensiones epidemiológicas, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen alrededor de 1,600 millones de individuos con sobrepeso, y alrededor de 400 millones son obesos. Existen múltiples factores para que se desarrolle esta condición, sin embargo es sabido que el actual estilo de vida de las sociedades humanas ha exacerbado el problema, esto debido a una disminución en la actividad física y el aumento en el consumo de alimentos hipercalóricos (Cachofeiro 2006).

De acuerdo a la OMS, para identificar el sobrepeso y la obesidad en humanos se utiliza el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual es un indicador simple de la relación entre el peso en kilogramos (Kg) y el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2), en base a esto, un individuo clasificado con sobrepeso tendrá un IMC mayor a $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y un obeso tendrá un IMC mayor a $30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ (www.who.int).

4.2 Modelos animales de obesidad

Para el estudio de la obesidad se han desarrollado modelos animales, sobretudo en roedores, para poder determinar los efectos directos del aumento de tejido adiposo en el organismo. Entre los modelos desarrollados, los que aportan mayor información al entendimiento de la obesidad y sobrepeso en el humano, son los que se hacen a través de la administración de dietas hipercalóricas a grupos de animales, ya que se considera que el principal factor para que se desarrolle la obesidad es el aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos. Usualmente se usan dietas altas en lípidos dentro de un rango de 30 al 78% de la energía total ingerida (Kanasaki 2011).

Tanto en humanos, como en los modelos animales la obesidad puede ser evaluada de acuerdo a dos criterios, la ganancia de peso de los individuos y/o el aumento en el

contenido de grasa corporal. En muchos estudios el grado de obesidad es evaluado comparando el peso corporal del grupo experimental, alimentado con una dieta alta en lípidos, con el grupo control el cual muestra un crecimiento normal.

Los investigadores han propuesto que un aumento entre el 10 al 25% (Woods *et al.*, 2003) de crecimiento de peso en los animales experimentales puede ser considerado como obesidad moderada o sobrepeso, mientras que mayor a 40% se considera obesidad severa; esto se ha acordado principalmente para ratas.

En estudios hechos en rata se ha demostrado que el aumento en el tejido adiposo está asociado a la ingesta de una dieta alta en lípidos, y que han aumentado un 25% el índice de masa corporal en estos individuos (Kanasaki 2011).

Zhao *et al* (2007), estudiaron el efecto de una dieta alta en lípidos y sacarosa en conejos como un posible modelo de síndrome metabólico y resistencia a la insulina. En este estudio encontraron que el aumento en el tejido adiposo total y en la región visceral es significativamente mayor en los conejos con la dieta alta en lípidos y sacarosa comparado con los controles, que recibieron una dieta normal. A las 36 semanas después de iniciado el experimento, la grasa visceral aumentó sobre todo en el mesenterio y el retroperitoneo, pero la grasa subcutánea no tuvo diferencias significativas entre grupos. También encontraron que los adipocitos en los conejos con dieta hipercalórica son más grandes que los de los del grupo control. Sin embargo no encontraron las características comunes del síndrome metabólico como hiperglicemia, hipertrigliceridemia o hipertensión (Zhao *et al.*, 2007).

En otro estudio, Kawai *et al.*, (2006), evaluaron un grupo de conejos Watanabe con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, en los cuales encontraron que, a pesar que no hay diferencias en el IMC de los conejos experimentales comparados con un grupo control, la relación circunferencia de la cintura/talla era significativamente mayor en el grupo experimental con respecto al control. Lo cual nos indica que esta condición provoca un aumento en la grasa abdominal en estos conejos (Kawai *et al.*, 2006).

4.3 Efecto del sobrepeso y/o la obesidad en la reproducción masculina

La obesidad está asociada con muerte prematura, ya que es un factor de riesgo para enfermedades crónicas tales como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. También se asocia a problemas respiratorios, problemas musculoesqueléticos crónicos, lumbago, problemas de la piel e infertilidad (Kanasaki 2011).

En un estudio realizado en los Países Bajos demostraron que el Índice de Masa Corporal y el diámetro de la cintura afectan la calidad seminal; en este estudio se estableció que en los individuos con un IMC mayor a 25 kg/m^2 (Sobrepeso) el volumen del eyaculado era significativamente menor que en los individuos sin sobrepeso así como la movilidad progresiva y que en individuos con obesidad ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$) estos parámetros eran aun menores (Hammiche *et al.*, 2012).

Otros estudios han asociado a la obesidad y al sobrepeso con modificaciones en los niveles hormonales, afectando al eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, ya que afecta la pulsatilidad de GnRH, lo cual altera la liberación de FSH y LH, afectando así, a las células de Sertoli y Leydig provocando que esto afecte la producción y maduración de los espermatozoides (Hammoud *et al.*, 2008).

Sermodande y cols.(2012), realizaron un meta análisis el cual demuestra que hay una incidencia mayor de oligozoospermia y azoospermia en pacientes que asisten a clínicas de fertilidad, los cuales tienen un IMC mayor a 25 Kg/m^2 (Sermodande *et al.*, 2012); en esta revisión se proponen diversas hipótesis, una de ellas es que el aumento del tejido adiposo provoca un hipogonadismo hipogonadotrófico hiperestrogénico (Schneider *et al.*, 1979; Jensen *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2008), el cual provoca que haya un aumento en la producción de estrógeno; también se ha propuesto una inhibición del eje Hipotálamo-hipófisis-testículo inhibiendo la secreción de GnRH, lo cual afecta la liberación de LH y FSH, provocando una disfunción de las células de Sertoli y de la espermatogénesis. La última hipótesis señala que el

aumento en la temperatura escrotal puede afectar la espermatogénesis (Jung *et al.*, 2005; Sermodande *et al.*, 2012).

Sin embargo, existen autores que sugieren que no existe una relación entre la pérdida de la función espermática y la obesidad, ya que mencionan que las discrepancias observadas pueden basarse en las limitaciones de trabajar con muestras de humano, pues esto puede deberse a factores relacionados con el estilo de vida (cigarro, alcohol, uso de drogas, etc.). Por lo que los resultados continúan siendo controversiales, así como las posibles causas de dicho efecto (Jensen *et al.*, 2004; Aggerholm *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2008)

En experimentos hechos con ratas, a las cuales se les proporcionó una dieta alta en lípidos durante 45 días, se observó una disminución en la movilidad espermática sin afectar a otros parámetros seminales (Fernández *et al.*, 2011). También se ha visto que además de disminuir la movilidad, viabilidad y concentración espermática, la producción de MDA en el espermatozoide de rata aumenta significativamente al recibir una dieta alta en lípidos por 45 días, comparado con los controles, lo que indica que hay un aumento en la lipoperoxidación (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2010). En conejos a los que se les proporcionó una dieta alta en colesterol (0.05% de colesterol), hubo una disminución significativa del volumen seminal y la movilidad espermática, y se encontraron anomalías en la cabeza del espermatozoide así como la presencia de gota citoplásmica en los conejos hipercolesterolémicos (CHC). Al hacer la prueba de hinchazón hipo-osmótica los espermatozoides de los CHC mostraron una respuesta baja de la membrana plasmática.

4.4 Obesidad y ERO

Estudios recientes han revelado que la obesidad está asociada a estrés oxidativo celular resultando en un desbalance entre las ERO y los antioxidantes (Ferranti y Mozaffarian 2008). Se ha visto que el aumento en el estrés oxidativo en el tejido adiposo de sujetos obesos está muy relacionado a un aumento de señales inflamatorias (Alfanda 2012, Ferranti y Mozaffarian 2008) desregulación de la

adipocina y resistencia a la insulina (Alfanda 2012, Ferranti y Mozaffarian 2008) El tejido adiposo tiene una función endocrina, regulando la homeostasis de la energía corporal secretando varias citocinas, también llamadas adipocitocinas. El factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) fue la primer adipocitocina que se sugirió tiene un efecto molecular entre la obesidad y la inflamación ya que sus niveles están elevados en el tejido adiposo de sujetos obesos y esto aumenta la sensibilidad a la insulina (Alfada y Sallam 2012).

La obesidad está asociada a un estado crónico de inflamación en el tejido adiposo y otros órganos aumentando el número y la actividad de monocitos/macrófagos infiltrados en los tejidos (Das 2001; Tunc *et al.*, 2011). Varios mediadores activos como las citocinas, adipocinas y moléculas quimiotácticas aumentan el estado crónico de inflamación y provocan una excesiva producción de ERO (Alfada y Sallam 2012). Las ERO no fagocíticas se producen por una enzima homóloga a la NADPH oxidasa, que pertenece a la familia de las proteínas NOX. Se ha reportado la producción de ERO durante la adipogénesis a partir de células germinales mesenquimáticas (CSM). Kanda y colaboradores (2011), establecen que las ERO tienen un papel importante en la diferenciación del adipocito a partir de CSM. También demostraron que las ERO inducen la diferenciación vía CREB en las CSM ya que H_2O_2 es un activador de CREB, el cual ha sido identificado como un factor de transcripción de la diferenciación del adipocito.

Tunc y colaboradores (2011) establecieron que la principal fuente de ERO en el semen está dada por la actividad de los macrófagos, en su trabajo evaluaron un grupo de hombres en edad reproductiva que asistieron a una clínica de fertilidad los cuales fueron separados en grupos de acuerdo a su IMC. En este trabajo encontraron una relación positiva entre la neopterina y el IMC, sugiriendo que hay un estado de activación aumentado de macrófagos en los pacientes obesos, del mismo modo encontraron diferencias significativas entre la neopterina en plasma seminal y la producción de ERO (Tunc *et al.*, 2011).

La relación entre la producción de ERO en pacientes obesos y su relación con la infertilidad que se ha asociado al sobrepeso y la obesidad ha sido poco estudiado. Bakos *et al.*, (2010) estudiaron la producción de ERO intracelular y mitocondrial en el espermatozoide de un grupo de ratones alimentados con una dieta alta en lípidos y observaron que hay un aumento significativo de ERO (mitocondrial y citosólica) en los animales que recibieron la dieta comparado con los controles, y que en los animales experimentales el daño al ADN fue significativamente mayor que en los controles (Bakos *et al.*, 2010). Sin embargo, no midieron ningún parámetro seminal en estos animales, ni la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo que no se ha desarrollado un modelo animal para el estudio de este tema.

Tunc y colaboradores, (2011) estudiaron la relación del estrés oxidativo seminal con el índice de masa corporal, en 81 hombres que asistieron a una clínica de fertilidad, los cuales fueron separados en grupos de normopeso, sobrepeso y obesidad, dependiendo de su IMC. No encontraron diferencias significativas en el daño al ADN o la movilidad, los cuales son los principales blancos del ataque de las ERO. Sin embargo si encontraron una relación negativa entre la concentración espermática y el IMC. Pero no en la movilidad espermática y la morfología espermática.

5 JUSTIFICACIÓN

El sobrepeso está asociado a una pérdida de la función espermática sobretodo disminuyendo la movilidad, la concentración y aumentando las anormalidades en los espermatozoides, esto se ha observado principalmente en clínicas de fertilidad a las que han acudido hombres en edad reproductiva, sin embargo no se conocen los mecanismos por los cuales el sobrepeso y la obesidad estén afectando la función espermática. Los espermatozoides de mamífero son propensos a sufrir daño por estrés oxidativo y debido a esto cuentan con un sistema de protección enzimática para prevenir el daño, sin embargo dicha propensión puede verse aumentada en individuos con sobrepeso u obesidad.

Por otro lado, se ha reportado que el mecanismo primario de defensa para controlar el daño provocado por las ERO está formado por las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, mismas que se encargan de metabolizar a las ERO, particularmente al $^{\circ}\text{O}_2$ y al H_2O_2 . Se ha reportado una correlación negativa entre la actividad de estas enzimas y la movilidad espermática, el presente trabajo se justifica, si tomamos en cuenta que la actividad de las enzimas antioxidantes en el líquido seminal y/o en espermatozoides podría verse afectada, a causa de los procesos que regulan los mecanismos que se generan con el sobrepeso y que controlan el daño. Por otro lado, la mayoría de los trabajos sobre este tema se centran en humanos que han asistido a clínicas de fertilidad; debido a esto consideramos que es necesario el desarrollo de un modelo animal en el que se pueda reproducir los efectos asociados con el sobrepeso en el semen, por lo que usamos conejos Nueva Zelanda para determinar la participación de las enzimas antioxidantes en el espermatozoide de conejo con y sin sobrepeso. Además podemos estudiar el efecto de las enzimas antioxidantes en el semen eyaculado, ya que los trabajos existentes en conejo, se han hecho con espermatozoides epididimarios.

6 HIPÓTESIS

Si el sobrepeso es un factor asociado directamente con disminución en la fertilidad masculina y esta disminución tiene un origen en el desequilibrio redox del organismo, entonces parte de las alteraciones en el desarrollo y funcionalidad de los espermatozoides del conejo con sobrepeso se deberán a modificaciones en la actividad de su propio sistema antioxidante de defensa y el del ambiente en que se encuentran.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del sobrepeso sobre la actividad enzimática de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa , en el espermatozoide y líquido seminal del conejo Nueva Zelanda.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar un análisis comparativo de los valores obtenidos para las diferentes variables espermatobioscópicas de conejos normopeso y con sobrepeso, para determinar que parámetros son afectados por el sobrepeso.

Determinar qué efecto tiene el sobrepeso sobre la actividad de las enzimas CAT, GPX y SOD de los espermatozoides y en el líquido seminal del conejo.

8 METODOLOGÍA

8.1 Material biológico

Para este experimento se utilizaron conejos Nueva Zelanda, obtenidos de la granja CEIPA UNAM, fueron ingresados a la granja de docencia del Departamento de Biología de la Reproducción, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa; a la edad de 35 días, y mantenidos en la granja en un ciclo natural de luz-oscuridad, y a temperatura ambiente, se les proporcionó agua a libre acceso y fueron alimentados con alimento balanceado para conejo marca Malta Clayton línea Conejo Ganador (Proteína mínima 16%, grasa mínima 2.5%, humedad máxima 12%, ceniza máxima 10%, SLN mínimo 43.5%).). De acuerdo al Manual de Buenas Prácticas de Producción de Conejo de la SAGARPA, el alimento debe proporcionar a los individuos 2.5 Mcal/Kg; el alimento seleccionado proporcionó dicha cantidad de energía, que es la cantidad necesaria para machos en edad reproductiva

Se utilizaron dos dietas, una dieta control y otra complementada con aceite vegetal (Aceite de Soya, canola, girasol y oleína de palma), las cuales fueron proporcionadas, dependiendo del grupo de estudio (normopeso o sobrepeso).

Se separaron en dos grupos, el primer grupo (n=4) fue el grupo de normopeso y 10 animales experimentales.

Las muestras de semen se colectaron cuando los animales llegaron a la edad de 5 meses, se tomaron muestras dos veces a la semana para habituar a los animales a la toma de muestra con la vagina artificial. Los experimentos se realizaron entre los 15 y 19 meses de vida de los conejos.

8.2 Inducción de sobrepeso

Para inducir sobrepeso en el conejo se les proporcionó una dieta alta en lípidos, que consistió en 120 g de alimento balanceado para conejo (marca Malta Clayton) adicionada con 12 mL de aceite vegetal, la cual aporta 3.5 megacalorías por

kilogramo. El grupo experimental se inició con 10 animales de los cuales se seleccionaron 4 que fueron los que alcanzaron el estado de sobrepeso. Estos animales recibieron la dieta alta en lípidos, mientras que el grupo de normopeso (n=4), recibió solo alimento balanceado el cual aporta 2.5 Mcal/Kg. Los animales de ambos grupos fueron pesados cada quince días, para conocer la ganancia de peso.

8.3 Toma de muestras de semen

Para la obtención de las muestras de semen se colocó a un macho con una hembra adulta sexualmente activa. Para la toma de muestra se le permitió al macho montar a la hembra y se colocó debajo de ella la vagina artificial diseñada para conejos, hecha con un tubo de plástico, al cual se le colocó en el interior un globo de látex (No. 9 estándar) sostenido por ambos lados y en el espacio entre el globo y las paredes del tubo se agregó agua caliente a 45 °C para producir el estímulo de calor necesario para que el macho eyaculara.

En un extremo de la vagina artificial se colocó un tubo Eppendorf, donde se colectó la muestra de semen. El tubo con la muestra se mantuvo a una temperatura de 36 °C en un baño seco y cubierto de la luz para su traslado al laboratorio.

8.4 Análisis espermatooscópico

El análisis seminal se realizó considerando los parámetros de movilidad masal, movilidad espermática, viabilidad, concentración espermática y morfología de cada una de las muestras con microscopía de campo claro. Todo el análisis, excepto la movilidad masal, se hizo mediante técnicas estándares descritas en el Manual de la OMS para la Evaluación de Semen Humano (WHO 2010).

Movilidad masal

Se observó la movilidad de la superficie de una gota de semen bajo el microscopio de campo claro, esto refleja la proporción de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento. Se colocó una alícuota de 5 µl de semen en un portaobjetos y se

observó sin cubreobjetos con el microscopio de campo claro a 10x. Se valoró la velocidad del movimiento de los remolinos formados en la superficie de la gota de semen y se hizo un estimado subjetivo con los siguientes cuatro parámetros: 0= nula; 1= baja; 2= media; 3= alta movilidad.

Movilidad espermática

La movilidad espermática consiste en la distinción en los tipos de movimientos de los espermatozoides. Después de determinar la movilidad masal, se hizo una dilución 1:10 con medio Ringer y se colocó 5 μ L en un portaobjetos, se colocó el cubreobjetos a la muestra y se observó bajo el microscopio de campo claro a 40x la muestra de semen. Los parámetros a medir fueron los siguientes: Movilidad progresiva: El espermatozoide se mueve activamente, de forma lineal o circular; Movilidad no progresiva: Cualquier otro patrón de movimiento con ausencia de progresión. Inmovilidad: En donde no hay movimiento (WHO 2010). Se contó hasta 100 espermatozoides entre los móviles o inmóviles, el número de espermatozoides móviles se consideró como porcentaje de movilidad espermática.

Vitalidad espermática

Para determinar la vitalidad se utilizó una solución de eosina-nigrosina. Se preparó una laminilla donde se colocó 5 μ L de semen y 5 μ L de la solución de eosina-nigrosina (Ver apéndice de medios y soluciones) se mezcló y posteriormente se expandió en la superficie del portaobjetos y se secó bajo la flama del mechero de bunsen. Se observó a 40x bajo el microscopio de campo claro, y se contaron 100 espermatozoides distinguiendo entre vivos y muertos. Esta técnica consistió en que la eosina tiñó el citoplasma de los espermatozoides con membrana plasmática dañada, los cuales se les considera muertos mientras que la nigrosina proporciona un fondo oscuro para la evaluación al microscopio. El número de espermatozoides vivos se consideró como el porcentaje de vitalidad (WHO 2010).

Concentración espermática

Para calcular el número de espermatozoides de la muestra de semen se hizo un conteo utilizando la cámara de Neubauer. Primero se hizo una dilución 1:100 de la muestra de espermatozoides con agua destilada y se colocó 10 μL de la dilución en cada lado de la cámara. Se contaron diez cuadrantes (5 de cada lado).

Los valores obtenidos en cada lado de la cámara se promediaron y se calculó la concentración dividiendo el promedio entre el factor de conversión, que en este caso es 0.2. El resultado se expresa en millones de espermatozoides por mililitro.

Morfología espermática

Para determinar la morfología espermática se usó el Kit Espermaform (Laboratorios DESEGO) el cual se basa en la técnica descrita por el manual de la OMS. Se hizo una dilución 1:10 de semen con medio Ringer, se colocó una muestra de 10 μL en un portaobjetos y se hizo un frotis a lo largo del mismo. Se dejó secar a temperatura ambiente y se colocó por 3 minutos en la solución fijadora. Se retiró del fijador y se dejó secar, posteriormente se colocó en la solución A por 3 minutos, se dejó secar y por último se colocó en la solución B por 5 minutos, se dejó secar y se cubrió con un cubreobjetos y resina sintética (Entellan). Se dejó secar la resina por 24 horas para su posterior evaluación al microscopio de campo claro.

Para evaluar la morfología se consideraron los siguientes parámetros: porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de anomalías de la cabeza, de la cola, espermatozoides sin cola o cabeza (separados) y presencia de gota citoplásmica. Se revisaron 100 espermatozoides a 100x en un microscopio de campo claro.

8.5 Separación del líquido seminal y espermatozoides

Para determinar la actividad específica la muestra de semen se dividió en líquido seminal y espermatozoides. Después de determinar la concentración espermática y calcular el número de espermatozoides en el eyaculado de acuerdo al volumen

obtenido, se tomó una alícuota que contuviera 50 millones de espermatozoides; el volumen de esta alícuota varió dependiendo del volumen de la muestra de semen. Una vez separados los espermatozoides fueron lavados dos veces en medio Ringer, centrifugando a 500X g por cinco minutos cada vez. Antes de la determinación enzimática los espermatozoides fueron incubados en solución de lisis (Apéndice 1 Medios y soluciones) por una hora a 4 °C, se centrifugaron a 1000X g por 5 minutos y se tomó el sobrenadante de la muestra, ya que ese es la fuente de la enzima.

Después de separar la alícuota de 50 millones de espermatozoides, se centrifugó la muestra de semen a 500X g por cinco minutos, posteriormente se separó el líquido seminal del botón espermático y se volvió a centrifugar a 1700 x g por 10 minutos. Se separó nuevamente el líquido seminal y se reservó para su posterior utilización.

8.6 Cuantificación de proteínas

Previo a la determinación de actividad enzimática se realizó la cuantificación de proteínas presentes tanto en líquido seminal, como en espermatozoides mediante el método de Lowry modificado por Shakir *et al* 1993; esta técnica consiste en la reacción de la proteína con la solución de Folin en presencia del cobre, con lo que se forma el colorante azul de molibdeno/tungsteno (Legler *et al.*, 1985,).

Se hizo una curva patrón de albúmina (555µL/mL), resuspendiendo 500 µL de albúmina en 5 mL de NaCl al 0.9%. Se hicieron cinco diluciones por duplicado a diferentes concentraciones de proteína (ver sistema de reacción, apéndice 2), con albúmina y NaCl al 0.9%; se le agregó 800 µL de solución cuproalcalina (ver apéndice 1, medios y soluciones) y 100 µL de solución de Folin (Apéndice de Medios y soluciones) Se cuantificó a 480 nm.

Para la cuantificación de proteínas presentes en el semen o espermatozoides, se diluyó 10 µL de la muestra en 190 µL de NaCl al 0.9%, a la que se le agregó 800 µL de solución cuproalcalina (Apéndice de Medios y soluciones) y 100 µL de solución de Folin.

8.7 Determinación de la actividad enzimática de los espermatozoides

Determinación de la actividad enzimática de Superóxido dismutasa.

Se tomó una alícuota de 25 μ L de sobrenadante de la muestra de espermatozoides o líquido seminal, 850 μ L de sustrato mixto (Xantina 0.05 mM, I.N.T (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio) 0.025 mM preparado en solución amortiguadora de CAPS 40 mM, ajustado a pH de 10.2 EDTA 0.94 mM.) y 125 μ L de Xantina oxidasa agitado en Vortex.

Se cuantificó en el espectrofotómetro previamente calibrado con una solución estándar de SOD (Ver apéndice 2 sistemas de reacción).

Se empleó Xantina y Xantina oxidasa (XOD) para la formación de radicales superóxido, y su posterior reacción con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T), con lo que se forma el colorante formazán rojo. El cromógeno formado se cuantificó espectrofotométricamente a 505 nm. La técnica de la determinación de SOD se basa en registrar la disminución en la formación del cromógeno debido a la eliminación del superóxido por acción de SOD. El resultado se expresó en Unidades/mg de proteína/minuto (Arthur y Boyne, 1985).

Determinación de la actividad enzimática de Catalasa

Antes de la determinación de la actividad específica de catalasa se hizo un pretratamiento para activar la enzima; se tomaron 100 μ L de sobrenadante de espermatozoides o de líquido seminal, se activó en frío con 1 μ L de etanol de 96° por 30 minutos y 5 minutos con Triton X-100 al 10%. Se diluyó en una solución 1:5 con HEPES al 0.1M (Cohen *et al* 1970).

Para determinar la actividad específica se tomó 100 μ L de esta solución y se le agregó 500 μ L de H₂O₂ a 6 mM, se agitó con vórtex y se dejó reaccionar por 3 minutos a temperatura ambiente; la reacción se detuvo agregando 3 μ L de H₂SO₄ a

6N y se leyó en el espectrofotómetro a 480 nm (ver sistema de reacción apéndice 2). El resultado se expresó en K/miligramo de proteína/minuto.

La determinación de CAT se realizó en un sistema de reacción conteniendo KMnO_4 cuya coloración intensa se registró a 480 nm. La base de la técnica consiste en la disminución del color debido a la reacción de peroxidación provocada por H_2O_2 hacia el permanganato de potasio, y el mantenimiento del color en presencia de CAT (Cohen *et al.*, 1970).

Determinación de la actividad enzimática de Glutación peroxidasa

Se tomó 25 μL de sobrenadante de espermatozoides o de líquido seminal y se diluyó en 1 mL de HEPES al 0.1 M. Se tomó 5 μL de la dilución y se le agregó 250 μL de mezcla de reacción (Glutación reductasa >0.50 U/L, Glutación reducido 4mmol/L, NADPH 0.34 mmol/L, En solución amortiguadora Fosfato 0.05 mmol pH 7.2 con EDTA 4.3 mmol) y 10 μL de hidroperóxido de cumeno. Se leyó a 340 nm en el espectrofotómetro a 37°C (Ver sistema de reacción Apéndice 2). Los resultados se expresaron en Unidades/miligramo de proteína/minuto.

La GPX se determinó por el método de Mills que se basa en la cuantificación espectrofotométrica del glutatió (GSH) a una longitud de onda de 340 nm (Paglia y Valentine, 1967), El GSH es uno de los componentes del sistema de reacción por medio del cual la GPX en conjunto con la glutatió reductasa (GPX/GR) para metabolizar al H_2O_2 convirtiéndolo en agua; por su parte, el GSH es oxidado al disulfuro GSSG. El sistema de reacción también requiere NADPH como donador de protones.

8.9 Análisis estadístico

Para el determinar si existen diferencias entre grupos se realizó el análisis estadístico con el programa SPSS de IBM Se usó la prueba de t-Student para muestras independientes ($p < 0.05$), para muestras que tuvieran una distribución normal y la

prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes ($p < 0.05$); para aquellos valores que no cumplieran con los supuestos de normalidad. Se calcularon los coeficientes de correlación de la actividad específica entre las enzimas de ambos grupos para conocer de qué forma se relacionan unas con otras.

9 RESULTADOS

Inducción de sobrepeso

La figura 7 muestra la diferencia de peso entre conejos alimentados con dieta control y dieta hipercalórica a la edad de 15 y hasta 19 meses, siendo mayor el peso de los animales que recibieron la dieta hipercalórica, se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los animales que recibieron la dieta control respecto a los que recibieron dieta hipercalórica ($4.08 \pm 0.10 \text{Kg}$ vs $5.09 \pm 0.19 \text{Kg}$) y esta diferencia se mantuvo a lo largo del experimento; los animales que recibieron la dieta hipercalórica tuvieron un aumento de aproximadamente 17% con respecto a los que se les administró la dieta control. Por lo que consideramos que logramos inducir sobrepeso en estos animales. De los 10 individuos con los que se inició el grupo de sobrepeso solo se seleccionaron cuatro para los experimentos debido a que no todos alcanzaron el peso deseado o no fueron capaces de realizar conductas copulatorias ni eyacular o ambas.

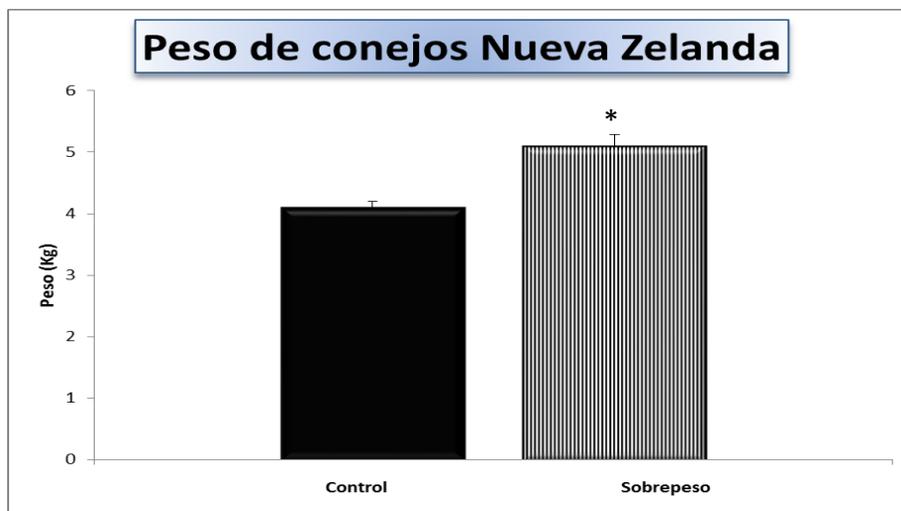


Figura 7. Comparación del peso de conejos Nueva Zelanda con dieta control (alimento comercial) y con dieta hipercalórica (alimento comercial adicionado con aceite vegetal). El asterisco indica que existen diferencias estadísticamente significativas a $P < 0.05$ con la prueba T Student. (SPSS).

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS SEMINALES

Se hizo una evaluación de los patrones de movilidad de los individuos del grupo de normopeso contra sobrepeso. No observamos cambios en la movilidad masal (1.6 ± 0.5 vs 1.7 ± 0.6) ni en los patrones de movilidad progresiva ($56.36\pm 4.36\%$ vs $58.07\pm 4.2\%$), no progresiva ($26.57\pm 3.9\%$ vs $23.67\pm 4.8\%$) e inmóviles (17.05 ± 1.9 vs 18.25 ± 3.9), al comparar ambos grupos (Sobrepeso vs normopeso, Tabla 1), por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$, prueba T de Student SPSS) en ninguno de los parámetros antes mencionados. Se obtuvo el porcentaje de vitalidad con una tinción de eosina-nigrosina, no se encontraron alteraciones en el porcentaje de vitalidad espermática en el grupo de sobrepeso, al comparar ambos grupos no se encontraron diferencias significativas, por lo que la vitalidad espermática no se vio alterada ($72.5\pm 2.12\%$ vs $86\pm 4\%$).

En cuanto a la concentración espermática no hubo diferencias significativas entre grupos (197.2 ± 199.1 mill/ml vs 273.8 ± 145.6 mill/ml) por lo que no fue alterada la concentración con la dieta alta en lípidos.

Tabla 1. Parámetros seminales de conejos Nueva Zelanda control contra sobrepeso.

Parámetro	Normopeso	Sobrepeso	p
Movilidad masal	1.6±0.5	1.7±0.6	p>0.05
Movilidad progresiva %	58.07±4.02	56.37±4.36	p>0.05
Movilidad no progresiva %	23.26±4.8	26.57±3.9	p>0.05
Inmovilidad %	18.25±3.9	17.05±1.9	P>0.05
Vitalidad %	72.5±2.12	86±4	p>0.05
Concentración mill/ml	197.2±199.1	273.8±145.6	p>0.05

Tabla 1. Parámetros seminales de conejos Nueva Zelanda normopeso contra sobrepeso. Promedio ± Error estándar. (p<0.05 prueba T de Student).

Se evaluó la morfología espermática de las muestras de semen de conejos Nueva Zelanda (Tabla 2). Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05 Prueba T de Student, SPSS) en el porcentaje de espermatozoides normales siendo menor en las muestras del grupo de sobrepeso (62.75±13.7% vs 42.3±12.72%).

En cuanto a las anormalidades encontradas, la mayor parte son del flagelo, sin embargo no existen diferencias significativas entre ambos grupos. En el grupo de sobrepeso observamos que hubo un mayor porcentaje de cabezas o flagelos desprendidos (0.75±0.95% vs 3.83±2.13%) con diferencias estadísticamente significativas (p<0.05 Prueba T de Student).

Tabla 2. Morfología espermática

Grupo	Normales %	Anormalidades de Cabeza %	Anormalidades del Flagelo %	Cabezas o colas separadas %
Control	62.75±13.7	6.5±2.6	29.75±11.6	0.75±0.95
Sobrepeso	42.3±12.72*	7.3±3.8	46.5±12.07	3.83±2.13*

Tabla 2. Porcentaje de espermatozoides normales y principales anomalías espermáticas de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. (*p<0.05 prueba T de Student).

Cuantificación de proteínas

Con la finalidad de expresar la actividad de las tres enzimas como actividad específica, se hizo la cuantificación de la concentración de proteínas. Para lo cual se realizó una curva estándar de proteínas, usando concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (Ver apéndice de Sistemas de Reacción). En la curva estándar de proteínas el coeficiente de correlación es $R^2=0.9977$, el cual es alto (Figura 8). Posteriormente se calculó la concentración de proteínas en líquido seminal y en espermatozoides.

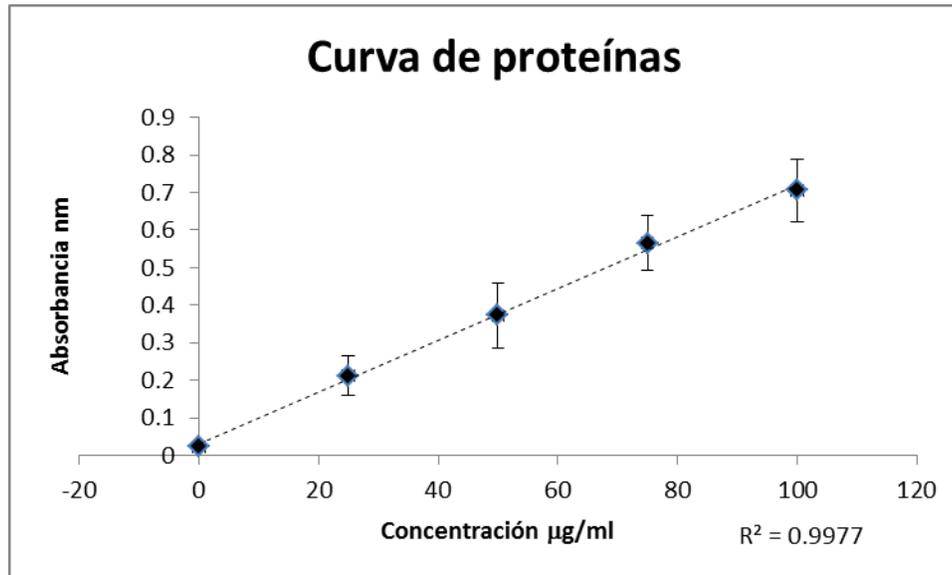


Figura 8. Curva estándar de albúmina para cuantificación de proteínas. El eje X representa la concentración en mg/mL y el eje y la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de luz UV. La R^2 nos indica que los resultados son confiables. Promedio \pm Desviación estándar.

Se comparó la concentración de proteínas en espermatozoides ($10.8 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ vs $9.2 \pm 3.2 \mu\text{g/ml}$) y en líquido seminal ($153.6 \pm 57.3 \mu\text{g/ml}$ vs $137.9 \pm 28.8 \mu\text{g/ml}$) de ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (control vs sobrepeso), en ninguno de los componentes de la muestra (Gráficas 3 y 4).

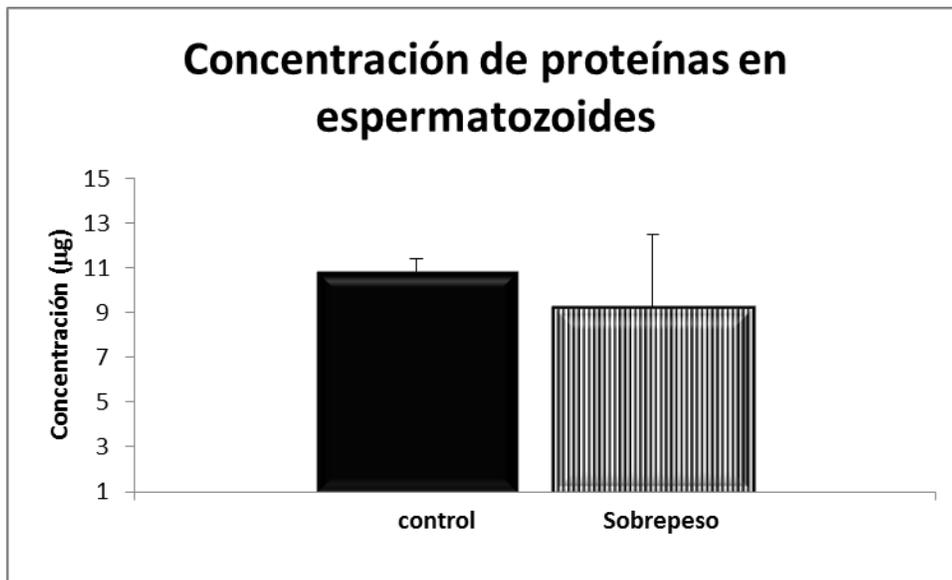


Figura 9. Comparación de la concentración de proteínas en espermatozoides de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. No se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$.

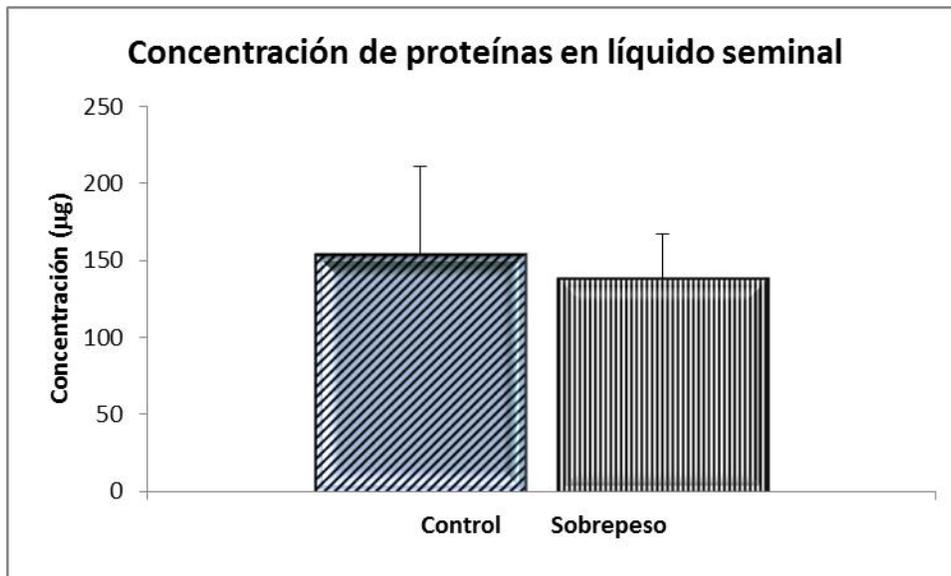


Figura 10. Comparación de la concentración de proteínas en espermatozoides de conejos Nueva Zelanda. Grupo control contra sobrepeso. No se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$ prueba T de Student SPSS)

Cuantificación de la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en líquido seminal y espermatozoides

La tabla 3 muestra los valores de actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX tanto en líquido seminal como en espermatozoides.

Tabla 3. Actividad específica de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX.

Enzima	Líquido seminal			Espermatozoides		
	Normopeso	Sobrepeso	p	Normopeso	Sobrepeso	p
SOD u/mgprot/ min	0.03± 0.007	0.04±0.003	p>0.05	0.008± 0.005	0.60±0.02*	P<0.05
CAT K/mgprot /min	0.0005± 0.0005	0.0285± 0.014	P>0.05	0.009±0.1	0.006±0.07	p>0.05
GPX u/mgprot/ min	2.8±0.72	2.6±1.03	p>0.05	38.8±10.7	56.5±11.5	p>0.05

Tabla 3. Actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en líquido seminal y espermatozoides de conejo Nueva Zelanda; grupos normopeso contra sobrepeso. La actividad específica de SOD y GPX expresada en U/mg de proteína/min y CAT en K/mg de proteína/min. Promedio ± Error estándar. (*Diferencias significativas a p<0.05 prueba de U de Mann-Whitney, SPSS)

La actividad de Superóxido dismutasa se calculó a partir de la absorbancia obtenida de la cuantificación espectrofotométrica, descrita en la metodología, y la concentración obtenida a partir de la curva estándar (Figura 11). En la tabla 3 se muestran los valores de actividad específica de SOD (expresada en U/mg de proteína/min), no hay diferencias significativas en la actividad de líquido seminal de ambos grupos (0.03± 0.007 U/mgprot/min vs 0.04±0.003 U/mgprot/min). En cuanto a

los espermatozoides hay un aumento de la actividad enzimática en las muestras de conejos del grupo de sobrepeso (0.008 ± 0.005 U/mgprot/min vs 0.60 ± 0.02 U/mgprot/min), en las cuales se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$, Prueba T de Student SPSS), al comparar ambos grupos.

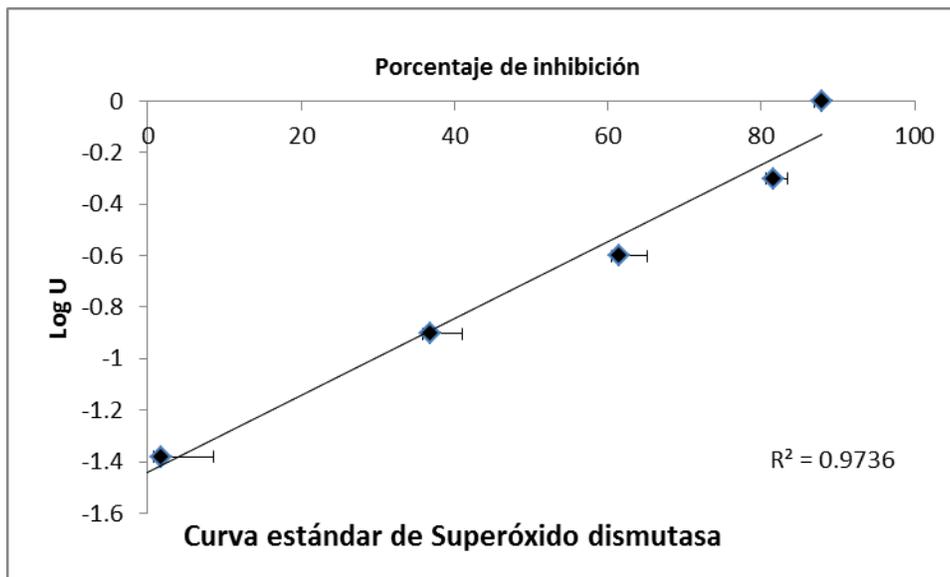


Figura 11. Curva estándar de Superóxido dismutasa, el eje X representa el porcentaje de inhibición; el eje Y es el logaritmo base 10 de la concentración de S1-S6.

La actividad de catalasa (Tabla 3) se calculó obteniendo el valor de la constante de primer orden (K), a partir de la densidad óptica de la cuantificación espectrofotométrica y la concentración de proteínas en líquido seminal y espermatozoides. Encontramos que la actividad específica de catalasa tiende a aumentar tanto el líquido seminal (0.0005 ± 0.0005 K/mgprot/min vs 0.0285 ± 0.014 K/mgprot/min) como en espermatozoides (0.009 ± 0.1 K/mgprot/min vs 0.006 ± 0.07 K/mgprot/min). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En cuanto a la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Tabla 3) en líquido seminal (2.8 ± 0.72 U/mgprot/min vs 2.6 ± 1.03 U/mgprot/min), no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos. Tampoco se encontraron

diferencias en la actividad de GPX en espermatozoides (38.8 ± 10.7 U/mgprot/min vs 56.5 ± 11.5 U/mgprot/min) sin embargo, se puede observar una ligera tendencia a que aumente la actividad de GPX en espermatozoides de conejos con sobrepeso.

TABLA 4. Coeficientes de correlación de las enzimas antioxidantes

	Normopeso	Sobrepeso
SOD LS-SPZ	0.60	0.80
CAT LS-SPZ	0.92	-0.39
GPX LS-SPZ	0.53	0.98
Espermatozoides		
SOD-GPX	-0.62	-0.92
SOD-CAT	0.97	-0.38
GPX-CAT	-0.43	0.88
Líquido Seminal		
SOD-GPX	-0.08	-0.58
SOD-CAT	0.35	0.46
GPX-CAT	-0.96	-0.53

Tabla 4. Coeficientes de correlación de la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX. SOD: Superóxido dismutasa. CAT: Catalasa; GPX: Glutatión peroxidasa.

La tabla 4 muestra el coeficiente de correlación entre la actividad enzimática de las enzimas en líquido seminal y espermatozoides. Se observa que la actividad de SOD y GPX en espermatozoides está asociada de manera negativa en los individuos con normopeso y sobrepeso, siendo mayor en los individuos con sobrepeso.

La actividad de SOD y CAT está relacionada positivamente en los individuos con normopeso (0.97), pero en los individuos con sobrepeso esta relación es negativa (-0.38). Esto podría ser debido a que la actividad de SOD está aumentada en los espermatozoides de conejos con sobrepeso, y la catalasa no metaboliza adecuadamente al H_2O_2 que se produce por acción de la SOD. Observamos que la CAT es la principal enzima encargada de metabolizar el H_2O_2 tanto en espermatozoides como en líquido seminal (Coef. Correl. 0.92). Sin embargo en un estado de sobrepeso esta enzima no es capaz de metabolizar al H_2O_2 por lo que el espermatozoide requiere que la CAT y GPX trabajen de manera conjunta para metabolizar al H_2O_2 . Se observa que hay una actividad positiva (0.88) en la actividad específica de estas dos enzimas, las cuales se encargan de metabolizar el H_2O_2 ; por lo que se puede inferir que al haber una mayor producción de H_2O_2 en el espermatozoide estas dos enzimas trabajan de manera conjunta para metabolizarlo y evitar el daño por estrés oxidativo. Mientras que en los espermatozoides de normopeso la relación entre estas enzimas es negativa (-0.43) lo que nos indica que solo una de estas enzimas está metabolizando al H_2O_2 .

10 DISCUSIÓN

Recientemente se ha reportado que la obesidad afecta a la reproducción masculina, sin embargo, solo se ha reportado en pacientes que asisten a clínicas de fertilidad y que llevan al menos un año tratando de concebir con su pareja y no han tenido éxito por lo que no se sabe si los problemas reproductivos están directamente ligados al sobrepeso u obesidad.

Se considera que el aumento en el consumo de alimentos hipercalóricos provoca sobrepeso u obesidad en los seres humanos, se han probado diferentes métodos de inducción de sobrepeso y/u obesidad en diferentes animales de laboratorio, tales como ratas, perros y simios. En roedores se han hecho modificaciones genéticas para inducir obesidad (Zhang *et al.*, 1994), sin embargo, el problema de dichos modelos es que, a pesar de que la obesidad posee un componente genético, este no es el principal factor ya que se considera que el desbalance entre las calorías ingeridas y las calorías gastadas es la principal causa del desarrollo de la obesidad. Por lo que los modelos animales realizados con la administración de dietas hipercalóricas han mostrado un mayor acercamiento al desarrollo de la obesidad en humanos así como los efectos que conlleva en la salud de los individuos (Kanasaki 2011). Las dietas hipercalóricas consisten en adicionar lípidos o carbohidratos al alimento que se le proporciona a los animales de laboratorio, y se ha visto que las dietas que contienen lípidos como aceite vegetal o grasa animal son las que proporcionan un mayor aumento de peso en los individuos que las consumen (Levin 2002, Woods *et al.*, 2003)., por tal motivo se usó una dieta complementada con aceite vegetal para la inducción de obesidad en conejos. Sin embargo no se ha reportado obesidad en conejos por lo que nos referimos al aumento de peso en conejos como sobrepeso.

Al desarrollar un modelo animal de obesidad, una de las formas de establecer si los animales experimentales se encuentran en un estado de sobrepeso u obesidad, es comparar el peso entre los grupos experimentales (Woods *et al.*, 2003); al hacer la comparación entre ambos grupos se observa que la ganancia de peso de los animales que recibieron la dieta alta en lípidos fue mayor que los que recibían una dieta estándar. Se ha reportado que un aumento del 10 a 25% de peso con respecto a los controles como obesidad moderada o sobrepeso y 40% o más como obesidad severa (Woods 2003).

Se ha asociado al sobrepeso y la obesidad como causa de subfertilidad masculina, principalmente reduciendo el volumen seminal, la concentración y la movilidad progresiva (Kort *et al.*, 2006; Hammoud *et al.*, 2008, Bakos *et al.*, 2010). Sin embargo, existen controversias respecto a esto, ya que, hay autores que establecen que no se afectan los parámetros seminales como movilidad, concentración y morfología normal en humanos (Jensen *et al.*, 2004; Aggerholm *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2008; Chavaro *et al.*, 2010; Shayeb *et al.*, 2011). Los resultados pueden ser controversiales posiblemente debido a los hábitos de los individuos de los diferentes grupos de estudio, ya que fueron hechos en humanos que asistieron a clínicas de fertilidad y existen variables como la alimentación o consumo de sustancias estimulantes como el tabaco o el alcohol que podrían estar afectando a estas personas que tuvieron estos problemas, sin embargo no se conocen las razones de esta controversia. Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos autores que reportan que no se modifican los parámetros seminales de movilidad y concentración en los individuos con sobrepeso. Sin embargo se encontró alterado el porcentaje de espermatozoides normales. Por lo que estos resultados concuerdan con lo reportado por Bakos *et al.*, 2010 y Hammoud 2008 los cuales reportan una disminución de la morfología normal en humanos con sobrepeso u obesidad.(Bakos *et al.*,2010; Hammoud 2008).

La presencia de SOD en espermatozoides de conejo ya había sido descrita por Alvares y Storey, (Álvarez y Storey 1983), encontrando una relación positiva entre la actividad de esta enzima y la movilidad espermática, y concluyeron que es de suma

importancia para la protección de espermatozoide contra el daño por estrés oxidativo. En este estudio se encontró que la actividad de la SOD aumenta en los conejos del grupo de sobrepeso con respecto al control, con lo cual podemos inferir que pudiera haber una mayor producción de anión superóxido el cual es metabolizado por la SOD para proteger al espermatozoide. De Lamirande *et al* (1997), establecieron que el espermatozoide requiere del anión superóxido para llevar a cabo los procesos de hiperactivación, capacitación y reacción acrosomal. En su estudio también establecieron que la actividad de SOD puede inhibir la hiperactivación y la capacitación tanto inducida como espontánea, dismutando al superóxido en peróxido de hidrógeno (de Lamirande *et al.*, 1993, 1997). En este mismo modelo de sobrepeso en conejo, se ha reportado una disminución de la capacitación y la reacción acrosomal inducida en espermatozoides de conejos con sobrepeso, (Ruiz-Valderrama *et al.*, 2013, resultados no publicados) esta disminución puede estar relacionada con el aumento en la actividad de SOD en espermatozoides de conejos con sobrepeso. Por otro lado, se ha asociado al estrés oxidativo como una posible causa de infertilidad, pero la participación de las enzimas antioxidantes no está bien definida, ya que hay autores que señalan que hay una disminución en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX en muestras de espermatozoides de pacientes con astenozoospermia, mientras que otros establecen que la actividad específica de dichas enzimas no se altera, sin embargo, aumenta la concentración de MDA, el cual es un marcador de lipoperoxidación (de Ferreira 2008; Kanda *et al.*, 2011; Das 2001; Bondia-Pons *et al.*, 2012).

Es importante señalar, que este aumento en la actividad específica en espermatozoides, en trabajos anteriores no se hace la separación entre los componentes seminales (líquido seminal y espermatozoides), por esta razón es posible que no se haya detectado la actividad de SOD dentro de la célula. En este trabajo se separó el semen en sus componentes principales, (líquido seminal y espermatozoides) y posteriormente se rompieron las membranas plasmáticas del espermatozoide con una solución de lisis que contenía Tritón X-100 además de tres

inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y fluoro sulfonil fenilo) las cuales inhiben a las enzimas (proteasas) encargadas de degradar las proteínas durante la lisis celular. Esto nos permitió cuantificar de manera más precisa la actividad intracelular de SOD. En el líquido seminal no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que la mayor actividad se encuentra dentro del espermatozoide. Respecto a la actividad de catalasa en líquido seminal y en espermatozoides, no se encontraron diferencias significativas, Holland y Storey (1981) reportaron que el espermatozoide de conejo carece de catalasa intracelular, esto debido a que la catalasa se encuentra principalmente en el citoplasma de las células y el espermatozoide carece de citoplasma o tiene muy poco (Foote y Hare (2000) reportan una actividad significativa de catalasa en semen de conejo (6 a 20 U/mL). Los resultados obtenidos no coinciden con el de estos autores ya que en el presente trabajo se encontró una actividad muy baja de esta enzima tanto en líquido seminal como en espermatozoides. Sin embargo, el coeficiente de correlación muestra que esta enzima es muy importante en el espermatozoide y líquido seminal de conejo (0.92). Mientras que al haber sobrepeso esta relación se ve afectada probablemente debido al aumento en H_2O_2 que probablemente es mayor dentro del espermatozoide (-0.39).

La glutatión peroxidasa es una enzima de gran importancia en el tracto reproductor masculino, particularmente en el epidídimo, encontramos al menos cuatro tipos de GPX asociadas al tránsito de los espermatozoides por el epidídimo (Jiménez 1992, Chavory *et al.*, 2010). En este experimento no se encontraron diferencias significativas en la actividad de GPX entre ambos grupos (control contra sobrepeso) sin embargo hay una tendencia a que aumente la actividad de GPX en espermatozoides de conejo con sobrepeso. Esto podría estar relacionado con la actividad de SOD en espermatozoide, al aumentar su actividad la producción de peróxido de hidrógeno aumenta y este es metabolizado por la GPX, y por lo tanto, podría estar aumentando la actividad de esta enzima. De acuerdo al coeficiente de correlación podemos inferir que hay un aumento en la producción de ERO en

espermatozoides de conejos con sobrepeso, ya que se observa que la actividad de CAT.GPX aumenta de manera directa en estas muestras indicando que están trabajando de manera conjunta para metabolizar al H_2O_2 producido por el aumento en la actividad de SOD. Se observa que en espermatozoides de conejo estas enzimas trabajan conjuntamente, mientras que se ha reportado en otras especies, que estas enzimas dependen la de concentración de H_2O_2 en la célula para llevar a cabo el metabolismo de esta ERO. Posiblemente no hubo un aumento significativo de estas enzimas debido a que están trabajando de manera conjunta y no independientemente cada una respecto de la otra en el espermatozoide.

11 CONCLUSIONES

Se puede inducir sobrepeso en un grupo de conejos Nueva Zelanda administrándoles una dieta alta en lípidos. Los parámetros seminales de concentración, vitalidad y movilidad no se vieron afectados, en cuanto a la morfología espermática si se encontraron alteraciones ya que el porcentaje de espermatozoides normales disminuyó en el grupo de sobrepeso, por lo que hay un mayor número de anomalías en estos espermatozoides sobretodo en las cabezas o colas desprendidas, por lo que si hay afecciones a los parámetros seminales en un estado de sobrepeso.

La actividad de las enzimas antioxidantes en semen eyaculado es mayor en espermatozoides con respecto al líquido seminal

Las enzimas SOD y CAT son las encargadas de metabolizar a las ERO de manera normal en el espermatozoide, sin embargo al haber sobrepeso las enzimas CAT y GPX metabolizan conjuntamente al H_2O_2 para proteger a la célula. La CAT es la enzima que primeramente metaboliza al H_2O_2 tanto en espermatozoide como en líquido seminal.

12 BIBLIOGRAFÍA

Agarwal A., K. Makker, R. Sharma. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility, an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, 59:1-11.

Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, RamLau-Hansen CH, Bonde JP. 2008 Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril*; 90:619-626 pp.

Aitken R.J. Buckinham D. Bridle J. Gómez E. Baker H.W. Irvine S.D. 1995. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Human Reproduction.* 10(8) 2061-2071 pp.

Aitken R.J 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction.* 3(3) 169-173 pp.

Alfada A.A., R.M. Sallam. 2012, Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012 1-14 pp.

Alvarez J., B. Storey 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: It's effect on sperm motility. *Biology of Reproduction* 27, 1102-1108pp.

Alvarez J. B. Storey, 1983. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. 28, 1129-1136pp.

Arenas-Ríos E. 2009. Enzimas antiespecies reactivas de oxígeno como reguladores en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento

prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de doctorado. UAM Iztapalapa. 134 pp.

Atig F. Kerkeni A. Saad A. Ajina M. 2013 Effect of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. J. Asist. Reprod. Genetic. 1-9 pp.

Bakos H.W. 2010. The effect of potential diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. International Journal of Andrology. 34 402-410 pp.

Bondia-Pons I., L. Ryan, J.A. Martinez. 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. J.Physiol. Biochem. 68 701-711.

Cardenas-Rodriguez N., O. N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri. Glutathión peroxidasa: una familia de enzimas.2008 Cap. 13 201-217pp. in Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 636pp.

Cachofeiro V. Miana M. Martin-Fernández B. de las Heras N. 2006. Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. Revista española de Obesidad. 4(4) 195-204 pp.

Chavaro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. 2010 Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. Fertil Steril; 93:2222-2231pp.

Chavory E. 2010 Mammalian glutathione peroxidase control, acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. J. Anim. Sci. 88:1321-1331 pp.

Das UN. 2001 Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 17:953–966.

de Ferranti S & Mozaffarian D 2008 The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54, 945–955 pp.

de Lamirande E. Gagnon C. 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and medicine*. 18(3) 483-495.

de Lamirande E. Leclerc P. Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosomic reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3(3) 1735-194pp.

de Lamirande E. Jiang H. Zini A. Kodama H. Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of reproduction*. 2; 48-54 pp.

Eddy E.M. 2006. The Spermatozoon. Cap 1. In Knobil and Neils *Physiology of Reproduction*. Vol 1. Neill J. D, Editor en jefe. 3° edición. 2897 pp.

Fernández C. Ballentani F. Fernández G. Perobelli J. Favoreto A.P. Nascimento A.F. Cicogna A. Kempinas W. 2011 Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9:32. 1-10 pp.

Foote R. Hare E. 2000 High catalase content in rabbit appears to be inherited. *Journal of andrology*. 21(5) 664-668 pp.

Gómez Q. L.E., D.B. Cuevas, Superóxido dismutasa. 2008 Cap. 11 169-182pp. In *Radicales libres y estres oxidativo, aplicaciones médicas*. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 636pp.

Hammiche F. J., S. E. Laven, J.M. Twigt, W.P.A. Boellaard, R.P. Steegers-Theunissen. 2012 Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples.

Hammoud A. O., M.G. Gibson, C.M. Peterson, B.D. Hammilton. D.T. Correl. 2008 Obesity and male reproductive potential, *Journal of Andrology*, 27(5) 27(8) 2365-2372 pp.

Holland M.K., B.T. Storey. 1981 Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. *Biochem. J.* 198, 273-280 pp.

Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. 2004 Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*; 82:863-870 pp.

Jequier E. 2002 Pathways to obesity. *Int J Obes* 26, 12–17.

Kanasaki K. Koya D. 2011 Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 1-11pp.

Kanda Y, T. Hinata , S. W. Kang , Y. Watanabe. 2011 Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 89 250–258.

Kawai T. Ito T. Ohwada K. Meva Y. Matsushita M. Tomoiike H. 2006. Hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbit exhibits insulin resistance and central obesity: A novel model of metabolic syndrome. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*. 26. 2752-2757 pp.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA,. 2006 Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*; 27:450-452pp

Levin BE & Dunn-Meynell AA (2002) Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, 46–54.

Makker K., A. Agarwal, R. Sharma. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* 2009, (129) 357-367 pp.

Sanocka D., R. Miesel, P Jedrzejczak, A. Chelmonskasoyta, M. Kurpisz. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems in human semen, asiciation with male infertility. *International Journal of Andrology.* 1997 20: 255-264 pp.

Peraza-Reyes.L. 2008 Catalasa. Cap. 13 183-199 pp. In in Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 636pp.

Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. 2008 Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril*; 90:346-351 pp.

Shayeb AG, Harrild K, Mathers E, Bhattacharya S. 2011 An exploration of the association between male body mass index and semen quality. *Reprod Biomed Online*; 23:717-723 pp

Shiva M. Gautam A. K. Verma Y. Shugotra V. Doshi H. Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. 2011. *Clinical Biochemistry* 44. 319-324 pp.

Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. 2011 Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 2011; 43:121-128 pp.

Vernet P., R. J. Aitken, J.R. Drevet. 2004 Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216 31-39 pp.

Vigueras-Villaseñor R.M., et al., 2010. Alteration in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 2010.

WHO 2010 Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5° edición. 271 pp.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, et al. (2003) A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 133, 1081–1087.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>

Apéndice 1 Medios y soluciones

Medio Ringer para lavado de espermatozoides

NaCl 95 mM

KCl 5 mM

CaCl 1.7 mM

KH₂PO₄ 1.1 mM

Ajustado a pH 7.2, en agua desionizada

Solución Eosina-nigrosina para viabilidad espermática

Eosina 1% en agua destilada

Nigrosina 10 % en agua destilada.

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

Diluir en citrato de sodio.

Determinación de la actividad enzimática

Solución de lisis

KH₂PO₄ 0.1 M

EDTA 1 mM

Leupeptina 1.0 µg/mL

Pepstatina 1.4 µg/mL

Fluoro sulfinil fenilo 70 µg/mL

Triton X-100 al 5%

Superóxido dismutasa

Xantina oxidasa 80 U/L

Solución de sustrato mixto:

Xantina 0.05 mM,

INT (cloruro de 2-(4- yodofenil)- 3- (4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio) 0.025 mM

Preparado en solución amortiguadora de CAPS 40 mM, ajustado a pH de 10.2

EDTA 0.94 mM.

Glutación peroxidasa

Mezcla de reacción

Glutación reductasa >0.50 U/L

Glutación reducido 4mmol/L

NADPH 0.34 mmol/L

En solución amortiguadora Fosfato 0.05 mmol pH 7.2 con EDTA 4.3 mmol,

Hidroperóxido de cumeno:

Diluir 10 μ L de hidroperóxido de cumeno en 10 mL de agua destilada. Agitar en vórtex.

Catalasa

Etanol 96%

H₂SO₄ 6N

KMnO₄ 0.1 M a pH 7.4

Triton X-100 al 10%

Cuantificación de proteínas

Solución de NaCl

NaCl al 0.9%

Diluido en agua desionizada

Albumina sérica bovina

55.5 mg de albumina sérica bovina

Diluido en 10 mL de NaCl al 0.9%

Hacer alícuotas de 500 μ L y congelar a -20°C .

Resuspender una alícuota en 5 mL de NaCl al 0.9%

Solución alcalina:

Na_2CO_3 5.0g

Tartrato de Na/K 0.058g

NaOH 1.0g

En agua previamente hervida Vol. 250 mL

Solución de CuSO_4

CuSO_4 55mg

Diluir en 10 mL de agua previamente hervida

Solución Cupro-alcalina

200 μ L de CuSO_4

Diluir en 10 mL de solución alcalina

Solución de Folin

Folin 1:3 en agua desionizada

Preparar 3 mL.

La solución de CuSO_4 , la solución cuproalcalina y el folin se preparan al momento.

Apéndice 2: Sistemas de reacción

Sistema de reacción para cuantificación de proteínas

Curva patrón de albúmina

tubo	Albumina 555 mg/mL (μ L)	NaCl 0.9% μ L	Sol. Cupro- alcalina μ L	Folin 1:3 μ L
1	0	200	800	100
2	0	200	800	100
3	50	150	800	100
4	50	150	800	100
5	100	100	800	100
6	100	100	800	100
7	150	50	800	100
8	150	50	800	100
9	200	0	800	100
10	200	0	800	100

Cuantificación de proteínas en líquido seminal (LS) y espermatozoide (spz)

tubo	Muestra (μ L)	NaCl 0.9% μ L	Sol. Cupro- alcalina μ L	Folin 1:3 μ L
1 LS	10	190	800	100
1 LS	10	190	800	100
2 spz	10	190	800	100
2 spz	10	190	800	100

Sistema de reacción para superóxido dismutasa

Diluir un vial de solución estándar (kit RANSOD) con 10 mL de agua desionizada.

Reconstituir un vial de solución de sustrato mixto (Kit RANSOD) con 20 mL de Amortiguador. Reconstituir un vial de xantina oxidasa (Kit RANSOD) con 10 mL de agua desionizada.

tubo	Sol. patrón	diluyente
S6	Patrón neto 500 µl	---
S5	500 µl de S6	500 µl
S4	500 µl de S5	500 µl
S3	500 µl de S4	500 µl
S2	500 µl de S3	1000 µl
S1	---	100 µl

Sistema de reacción

tubo	Sol. Patrón µL	Diluyente µL	Sustrato mixto µL	XOD µL	Lectura A1 t0	A2 t3'
S1	-	35	850	125		
S1	-	35	850	125		
S2	25	10	850	125		
S2	25	10	850	125		
S3	25	10	850	125		
S3	25	10	850	125		
S4	25	10	850	125		
S4	25	10	850	125		
S5	25	10	850	125		
S5	25	10	850	125		
S6	25	10	850	125		
S6	25	10	850	125		

Sistema de reacción de catalasa

Muestra/tubo	Sob. µL	Agua*/HEPES µL	H ₂ O ₂ µL	TA	H ₂ SO ₄ µL	Sobr. µL	KMnO ₄ µL	[]	D.O
Blanco	---	600	0	--	100	---	700		
Estándar	---	*100	500	3'	100	---	700		
T0	---	---	500	--	100	100	700		
Tf	100	---	500	3'	100	---	700		

Sistema de reacción de glutatión peroxidasa para líquido seminal (LS) y espermatozoides (Spz)

Muestra/ tubo	LS μL	Mezcla de reacción μL	Agua μL	Pre inc. 25° μL	NADPH μL	Incubación μL	H₂O₂ μL	A1	A2
Blanco	-----	355	50	5'	50	3'	50		
LS	50	355	----	5'	50	3'	50		
Spz	50	355	----	5'	50	3'	50		