



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**TESIS**

**DAÑO A LA INTEGRIDAD DEL ADN Y LA MEMBRANA DEL  
ESPERMATOZOIDE DE CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO CAUSADOS POR  
SOBREPESO.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN ANIMAL PRESENTA:**

**BIÓL. ALEJANDRO SOTO CASTRUITA**

**Directora de tesis:**

**Dra. Edith Arenas Ríos.**

**Asesores:**

**Dra. Edith Cortés Barberena**

**Dr. Demetrio A. Ambríz García**

**México D.F. 23 Enero de 2015**

## **Comité tutorial**

### **Directora:**

Dra. Edith Arenas Ríos

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento en Biología de la Reproducción.

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).

Correo electrónico: editharenas2000@yahoo.com.mx

### **Asesores:**

Dra. Edith Cortés Barberena.

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Biología

Celular y Citometría de Flujo (S-252).

Correo electrónico: cobe@xanum.uam.mx

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

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

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).

Correo electrónico: deme@xanum.uam.mx

El presente trabajo se realizó en la Maestría de Biología de la Reproducción Animal, en el laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234) del Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Se contó con el apoyo del programa: UAM-I-CA-136 Factores celulares, Genético y Endocrinos Relacionados con Alteraciones en la Maduración Espermática.

La Maestría de Biología de la Reproducción Animal pertenece al Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, programa 0037971.

Para la realización del posgrado se contó con el apoyo inicial de beca de la Universidad Autónoma Metropolitana, a través del acuerdo 02/2011 con fecha del 8 de octubre del 2012.

Para la finalización del posgrado se contó con el apoyo de beca número 372447 proporcionado por el Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Extiendo un cordial agradecimiento a las instancias que proporcionaron el apoyo para la realización del presente proyecto.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada:

**“DAÑO A LA INTEGRIDAD DEL ADN Y LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO CAUSADOS POR SOBREPESO”**

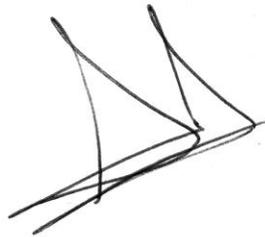
Presentada por el Biólogo Alejandro Soto Castruita el 23 de enero de 2015, para obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal.

**Miembros del jurado:**

Presidente: Dr. José Miguel Betancourt Rule.



Secretario: Dr. Demetrio A. Ambríz García.



Vocal: Dra. Edith Cortés Barberena.



Vocal: Dra. Gisela Fuentes Mascorro.



Dedicó este manuscrito a mis padres Yazmine Castruita y Enrique Soto (†), ya que, sin su apoyo incondicional y su gran ejemplo no podría haber alcanzado este logro. Mamá gracias por tu inmenso cariño y enormes esfuerzos por hacerme un hombre de bien. Papá gracias por todo lo que me enseñaste y que me ha impulsado en mi carrera profesional También gracias queridos hermanos, de los que siempre he recibido apoyo y un gran cariño en nuestra gran familia.

Agradezco a Georgina mi cómplice de vida, por todos los momentos que hemos compartido, buenos y malos, logros y decepciones y por todo el apoyo que me ha brindado en estos años de estar juntos.

Quiero hacer un especial agradecimiento a la Dra. Edith Arenas y al Dr. Demetrio Ambríz por la gran oportunidad que me dieron al aceptarme en su grupo de trabajo y después brindarme su amistad. Gracias por guiarme y apoyarme incondicionalmente en este camino compartido de la ciencia.

Les agradezco a mis compañeros de la maestría por todo su apoyo y compañía durante este camino con pendientes tan grandes, pero que nos deja enormes satisfacciones, que fue estudiar este posgrado.

A mis compañeros de laboratorio por compartir conmigo tantos desvelos, alegrías, tanto trabajo, conocimientos y todo lo que hemos vivido en este camino de la investigación.

## Resumen

El sobrepeso y la obesidad son condiciones clínicas en las que un exceso de tejido adiposo puede tener efectos negativos en la salud. El aumento en el tamaño o número de adipocitos puede resultar en cambios físicos y hormonales en el individuo; estos cambios contribuyen a problemas como: un aumento de la temperatura escrotal y un aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), que se eleva con el sobrepeso y la obesidad, lo cual pudiera provocar estrés oxidante. Esto contribuye a la correlación que se ha descrito entre la obesidad y la infertilidad masculina, donde los estudios reportan una correlación directa entre el aumento de la masa corporal y la disminución en la concentración, movilidad y viabilidad espermática. Sin embargo, estos estudios solo se han hecho en pacientes que acuden a clínicas de fertilidad, provocando un sesgo poblacional y además el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que causan estos cambios no han sido reportados. Por lo que a través de un modelo animal para la inducción del sobrepeso y la obtención de muestras seminales, planteamos la metodología que nos permitió determinar si existe un daño a la membrana, un efecto de fragmentación sobre el ADN y el estado de compactación del espermatozoide, en el conejo Nueva Zelanda Blanco (NZB) en condición de sobrepeso. Por lo que nos propusimos determinar daños en el espermatozoide del conejo NZB, provocados por sobrepeso. Para generar el sobrepeso se proporcionó una dieta hipercalórica (3.2 Mcal/kg) conteniendo aceite vegetal, en el grupo normopeso (grupo control) se mantuvieron con una dieta de alimento comercial (2.8 Mcal/kg). Se realizaron los estudios de calidad seminal considerando parámetros como: concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermática. Para el estudio de los mecanismos bioquímicos se utilizaron técnicas como: cuantificación de la lipoperoxidación (concentración de malondialdehído (MDA) mediante un método colorimétrico con ácido tiobarbitúrico), la evaluación de Fragmentación de ADN con naranja de acridina (por citometría de flujo) y la descompactación del ADN nuclear espermática con el método de azul de anilina (por microscopia de luz). El tratamiento con la dieta hipercalórica generó el 24% de sobrepeso en el conejo NZB, con respecto al grupo de normopeso. El sobrepeso no indujo cambios significativos en los parámetros de calidad seminal, en la lipoperoxidación de la membrana y la fragmentación nuclear de los espermatozoides de

conejos NZB con sobrepeso. Sin embargo, la descompactación del ADN nuclear espermático, se vio aumentada, alcanzando un valor de 1.6 % en el estado de sobrepeso y de 0.63 % en el grupo de normopeso ( $p=0.002$ ) en el conejo NZB, aunque el valor fue bajo; sustenta lo reportado en conejo NZB, sobre que el sobrepeso pudiera afectar el proceso de maduración espermática epididimaria. Finalmente concluimos que el estado de sobrepeso en el conejo NZB se generó con la dieta hipercalórica y que la descompactación del ADN nuclear se vio aumentada.

## **Abstract**

Overweight and obesity are clinical conditions where an excess in fat tissue can have negative health effects. The increase in the size or fat cells number can result in physical and hormonal changes in the individual; these changes contribute to some problems such as: increased scrotal temperature and increased production of reactive oxygen species (ROS), which rises with overweight and obesity, which could cause oxidative stress. This contributes to the correlation described between obesity and male infertility, where studies reported a direct correlation between increased body mass and decreased concentration, motility and sperm viability. However, these studies have only been made in patients attending in fertility clinics, causing a population bias and also knowledge of the biochemical mechanisms that cause these changes, have not been reported. So, through an animal model for overweight induction and semen samples obtaining, we propose the methodology that allowed us to determine if there is damage to the membrane, an effect on DNA fragmentation and compaction state in New Zealand White rabbits (NZW) sperm in overweight condition. So we set out to determine damage in the NZB rabbit sperm, caused by overweight. To generate overweight we were given a high-calorie diet (3.2 Mcal / kg) containing vegetable oil, the normal weight group (control group) were maintained with a diet of commercial food (2.8 Mcal / kg). Studies of semen quality parameters performed considering: concentration, viability, motility and sperm morphology. To study the biochemical mechanisms we were used techniques as lipoperoxidation quantification (Malondialdehyde (MDA) by a colorimetric method with thiobarbituric acid), the DNA fragmentation assessment with acridine orange (by flow cytometry) and decompaction of DNA nuclear sperm with aniline blue method (by light microscopy). Treatment with calorie diet produced 24% of overweight in NZB rabbits, relative to normal weight group. Overweight not induce significant changes in semen quality parameters, in lipoperoxidation of the membrane and nuclear fragmentation of NZB rabbit sperm with overweight. However, the decompaction of DNA nuclear sperm was increased, reaching a value of 1.6% in overweight state and 0.63% in control group ( $p = 0.002$ ) in the NZB rabbit, though the value was low; sustains reported in NZB rabbit, on overweight could

affect epididymal sperm maturation process. Finally we conclude that overweight status in NZB rabbits performed with caloric diet and the nuclear DNA decompaction was increased.

## INDICE

	PÁGINAS
Resumen .....	vi
Abstract.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. El sobrepeso y la infertilidad masculina.....	3
2.2. Las especies reactivas de oxígeno y la fisiología espermática .....	6
2.2.1. Estructura y función del espermatozoide y los daños provocados por las ERO .....	8
2.2.2. Daño a espermatozoides por lipoperoxidación.....	12
2.2.3. Daño al espermatozoide por fragmentación al ADN.....	14
2.2.4. Técnica del ácido tiobarbiturico para la determinación de oxidación en membranas .....	17
2.2.5 Técnica de naranja de acridina y sus características de fluorescencia para determinar fragmentación del ADN.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS .....	21
5. OBJETIVO .....	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
7.1. Grupos experimentales e inducción de sobrepeso en conejo NZB .....	22
7.2. Obtención de muestras seminales.....	23
7.3. Procedimiento de lavado de espermatozoides .....	23
7.4. Concentración espermática.....	24
7.5. Viabilidad espermática .....	25

7.6. Porcentaje de movilidad masal .....	25
7.7. Porcentaje de movilidad individual .....	26
7.8. Morfología espermática.....	26
7.9. Daño oxidante (lipoperoxidación) en la membrana espermática .....	27
7.10. Daño en el ADN con naranja de acridina por citometría de flujo .....	29
7.11. Descompactación del ADN con azul de anilina .....	31
8. Análisis estadístico .....	32
9. RESULTADOS .....	33
9.1. Peso de los grupos experimentales .....	33
9.2. Análisis espermático.....	34
9.3. Daño oxidante (lipoperoxidación) en la membrana espermática .....	36
9.4. Daño al ADN determinado con naranja de acridina por citometría de flujo .....	38
9.5. Descompactación del ADN determinado con azul de anilina .....	39
10. DISCUSIÓN.....	40
11. CONCLUSIONES.....	46
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad son condiciones clínicas en las que un exceso de tejido adiposo es acumulado en el cuerpo; misma que puede tener efectos negativos en la salud. En el humano se define como sobrepeso cuando el índice de masa corporal (IMC) es 25-30 kg/m<sup>2</sup> y como obesidad si es superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (Du Plessis y col. 2010). Se ha visto, que la distribución de la grasa corporal, específicamente en la región abdominal, se ha utilizado para diagnosticar obesidad en el humano. Estas definiciones son consideradas como una guía, ya que el riesgo a desarrollar enfermedades crónicas, aumenta proporcionalmente cuando el IMC supera los 21 kg/m<sup>2</sup> (Haslam y James, 2005), y un aumento en el tamaño o número de adipocitos como consecuencia de la obesidad puede resultar en cambios físicos y hormonales en el individuo. Sin embargo, aun cuando en conejos se ha reportado de forma anecdótica algo que en apariencia se podría considerar como obesidad, el término en el conejo, aún no se ha definido científicamente, razón por la cual nos referiremos en conejos, simplemente como sobrepeso a esta condición.

Los cambios físicos pueden incluir un aumento en la temperatura escrotal y en la disfunción eréctil; mientras que los cambios hormonales, pueden incluir aumento en los niveles de leptina, insulina y estrógenos; así como, una disminución en los niveles plasmáticos de testosterona (Du Plessis y col. 2010). Estos cambios contribuyen a problemas como: oligozoospermia, azoospermia, un aumento en el índice de fragmentación del ADN y una disminución del volumen seminal. Lo anteriormente mencionado contribuye a la correlación que se ha descrito entre la obesidad y la infertilidad masculina.

Muchos de los motivos que provocan que la obesidad se relacione con la infertilidad masculina son aún desconocidos, sin embargo, hay una hipótesis que relaciona la acumulación del tejido graso en la región suprapúbica y la región de los muslos como causa del aumento en la temperatura escrotal, y así, problemas en la espermatogénesis y el almacenamiento de espermatozoides (Michalakis y col. 2013); esta propuesta tiene más de treinta años de ser formulada, sin embargo, estudios recientes muestran, que, la acumulación de tejido graso está

relacionado con la elevación del estrés oxidante, y como consecuencia, la lipoperoxidación en diversos tejidos (Michalakis y col. 2013; Konigsberg y col., 2008), además, recientemente se ha publicado la relación directa entre la diferenciación de los adipocitos y la generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Kanda y col., 2011), y ya que se ha reportado que las ERO pueden provocar daños en las membranas y el ADN espermático, estos pudieran tener efectos negativos sobre la morfología y función espermática (Kort y col., 2006). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la relación del sobrepeso en el conejo Nueva Zelanda Blanco (NZB) con la infertilidad/subfertilidad masculina, está relacionada con la lipoperoxidación y daño en el ADN de los espermatozoides.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El sobrepeso y la infertilidad masculina**

La mayoría de los estudios donde se hace la relación de la obesidad con la infertilidad masculina, se han realizado en pacientes que asisten a clínicas de reproducción asistida, encontrando que, existe una correlación directa entre la obesidad y la infertilidad masculina. Un ejemplo de esto son los resultados publicados por Fariello y colaboradores (2012) donde resaltan que, entre el grupo de peso normal y los grupos de sobrepeso y obesidad hay una diferencia en la concentración espermática, que si bien no resultó estadísticamente significativa, si marca una tendencia a disminuir en los grupos de obesidad ( $48.3 \times 10^6/\text{mL}$ ) y con sobrepeso ( $66.8 \times 10^6/\text{mL}$ ) con respecto al grupo de peso normal ( $80.5 \times 10^6/\text{mL}$ ); la movilidad disminuye en el grupo con obesidad ( $68.7 \times 10^6/\text{mL}$ ) y sobrepeso ( $96.4 \times 10^6/\text{mL}$ ) con respecto al grupo de peso normal ( $134.7 \times 10^6/\text{mL}$ ) y la fragmentación del ADN es mayor en el grupo de obesidad (7.7 %) que en el grupo de sobrepeso (4.7%) y de peso normal (4.4 %) (Fariello, y col. 2012).

En otro estudio clínico también en humanos, Kort y colaboradores (2006) determinaron varios parámetros del análisis seminal y fragmentación del ADN destacando lo siguiente: el número de espermatozoides con movilidad normal, presentó diferencias significativas entre los grupos de peso normal ( $17.5 \times 10^6/\text{mL}$ ), sobrepeso ( $4 \times 10^6/\text{mL}$ ) y obesidad ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ). Para la fragmentación del ADN los resultados muestran una diferencia significativa y una relación positiva entre los grupos de peso normal (20 %), sobrepeso (26 %) y obesidad (27 %). Sin embargo, Bakos y col (2010) exponen que la limitante en los estudios de infertilidad en humanos es que: solo los datos que se correlacionan son tomados en cuenta, pero no se consideran los diferentes estilos de vida, por lo que pudiera relacionarse con variables incontrolables y se puede dificultar hacer conclusiones definitivas. A la fecha existe una carencia de estudios con modelos animales controlados para investigar el efecto de la obesidad

causada por una dieta que la induzca y así estudiar su relación con la infertilidad masculina en semen.

Se ha reportado que la administración de una dieta hipercalórica en la rata de laboratorio (Sprague–Dawley) presentó el 50% de respuesta al incremento de peso (10 individuos de 20 presentaron sobrepeso) (Vigueras-Villaseñor, y col, 2011). Por otro lado, en el caso de los animales domésticos considerados como de granja (incluidos los conejos), los machos que alcanzan el estado de sobrepeso u obesidad; comprometen su finalidad zootécnica, y son sometidos a dietas estrictas para la reducción del peso corporal, o son eliminados como efectivos reproductores por un mal desempeño en la conducta reproductiva. En ambos casos la casuística es poco considerada y los reportes son escasos, lo que evidencia que el trabajo zootécnico al cual son sometidos y las dietas que reciben, están acordes para mantenerlos dentro de la conducta y condición deseada. En los conejos productores de carne, como es la raza Nueva Zelanda Blanco (NZB) no se encuentran reportes científicos que demuestren esta condición, antes bien lo que se encuentra en la literatura especializada son casos de conejos tenidos como “mascota” y que por la cercanía y convivencia con sus dueños reciben suministro de ingredientes tales como frituras y golosinas. Los reportes de conejos con sobrepeso u obesos en la literatura especializada son escasos, anecdóticos y poco precisos (Meredith A. 2012; Sweet y col., 2013).

En un experimento para inducir la condición de sobrepeso en conejo (Zhao y col., 2007) se alimentaron 36 semanas a Machos NZB con una dieta (3.7 Mcal/kg) enriquecida con lardo de cerdo y sacarosa (10 y 30% respectivamente). Una vez que los animales alcanzaron la pubertad o el peso adulto (12 semanas) rápidamente comenzó el aumento de peso corporal, en los que recibieron dieta alta en energía (3.7 Mcal/kg) llegando a presentar diferencias estadísticamente significativas que se mantuvieron durante el resto del experimento. Alcanzaron un aumento de peso de 22% mayor con respecto al grupo control ( $4.0 \pm 0.1\text{g}$  vs  $3.15 \pm 0.2 \text{ kg}$  ( $p < 0.05$ )). Dichos autores llegan a concluir que este modelo de inducción podría ser utilizado para estudios de sobrepeso y obesidad en conejos, y que dada la relativa cercanía que existe con los humanos en varios aspectos incluido el sistema inmunológico, podría ser un modelo idóneo para estudiar estas condiciones, su génesis, consecuencias, así

como, conocer más del problema en los humanos. A pesar de estos resultados aparentemente claros y contundentes, de esta manifiesta propuesta para inducir sobrepeso en conejos, en la literatura especializada posterior a esa publicación, no se encuentran otros reportes relacionados. Además al analizar los pesos registrados en ambos grupos de conejos resulta evidente una serie de altibajos en su curva, lo cual no es aclarado en el texto, pero pudiera atribuirse a aspectos ambientales (por ejemplo fotoperiodo o temperatura).

## 2.2. Las especies reactivas de oxígeno y la fisiología espermática

Se ha reportado que las ERO son perjudiciales para los espermatozoides, afectando los parámetros espermatozoides, aunque también, las ERO participan en la regulación de procesos fisiológicos normales del espermatozoide.

La mayoría de las ERO son radicales libres, definiéndose como los átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados dentro de su estructura, es decir, es la existencia de al menos un electrón que no tiene una pareja con Giro opuesto. Entre los radicales libres más importantes en los organismos aerobios, se encuentran: el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), este último, procedente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que a pesar de no ser un radical libre, puede ser altamente peligroso por su capacidad de atravesar membranas biológicas (Figura 1) (Konigsberg y col., 2008).

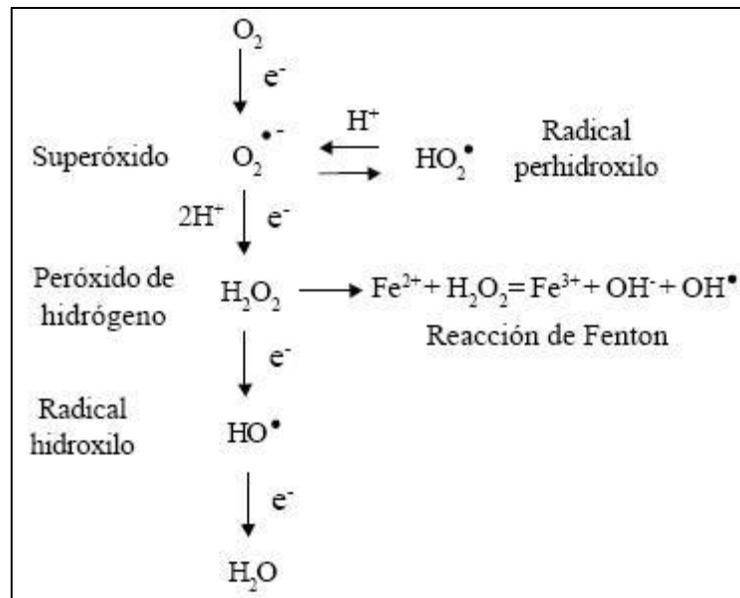


Figura 1. Química de las ERO. Las ERO normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (tomado de Desikan y col., 2005)

Las ERO que incluyen el radical  $O_2^{\circ-}$ , radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ),  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ , alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ), peroxirradicales ( $RO_2^{\bullet}$ ), hidroperóxidos orgánicos (ROOH), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), peronitrito ( $ONOO^-$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) son producidas en las células a través de diversos procesos normales, como el metabolismo oxidante y la inflamación, así como por la exposición a diversos agentes físicos como la luz UV, radiación ionizante o los agentes químicos contaminantes o carcinogénicos. El  $O_2^{\circ-}$  es generado como un producto alterno de la reducción incompleta del oxígeno molecular durante el transporte de los electrones en la mitocondria y en el retículo endoplasmático. El  $HO_2^{\bullet}$  lo macrófagos y neutrófilos como parte del sistema de defensa inmunitario por medio de la reducción de  $O_2$  mediado por NADPH. Existen otras fuentes del  $O_2^{\circ-}$  que incluyen reacciones enzimáticas, como la llevada a cabo por la xantina oxidasa y por la activación metabólica de xenobióticos como el benzopireno (Flowers y Miles, 1991).

Los espermatozoides son altamente sensibles al daño por ERO, resultando el  $H_2O_2$  la más tóxica para este tipo de células. Además, los lipoperóxidos y sus productos de degradación (malondialdehído (MDA), hidroxialquenes, etc.) son altamente peligrosos por representar una forma de autotoxicidad, pues su efecto se traduce en alteración de la estructura membranal y disminución de la movilidad. Grandes concentraciones de  $H_2O_2$  inducen lipoperoxidación, causando diversos efectos deletéreos en espermatozoides como: aumento en la fluidez de membrana, discontinuidad de membrana, fragmentación del ADN nuclear y en último caso muerte celular (Neil y col., 1992; Chen y col., 1997; Alba y col., 2000; Quintero y col., 2000). Álvarez y Storey (1982) reportan aproximadamente 0.026 nmol/mL de producción de MDA en espermatozoides de conejo NZB en condiciones de incubación aeróbica y por la técnica de cuantificación de MDA con ácido tiobarbitúrico.

### **2.2.1. Estructura y función del espermatozoide y los daños provocados por las ERO**

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis que consta de varias fases de divisiones sucesivas mitóticas, meióticas y posmeióticas que se llevan a cabo en los túbulos seminíferos en los testículos. En la fase mitótica las células germinales (espermatogonias) realizan divisiones mitóticas que les permite el aumento de las poblaciones de espermatogonias y el mantenimiento de un epitelio germinal. La fase meiótica comienza con la fase del ciclo celular (fase S) y termina con dos divisiones meióticas que se dan muy rápido y sin replicación del ADN, resultando en dos espermátidas haploides. Si bien estas dos fases son cruciales para el desarrollo del gameto, es en la fase posmeiótica donde el espermatozoide se termina de diferenciarse. Esta fase se caracteriza por una extensa remodelación de las espermátidas en espermatozoides, formándose el acrosoma, la condensación nuclear, el desarrollo del flagelo y la pérdida de la mayoría del citoplasma. De estos eventos resulta una célula altamente diferenciada en estructura y función, pero con desarrollo totipotencial y capaz de combinarse con el ovocito y comenzar el desarrollo de un nuevo individuo.

Los dos componentes principales de un espermatozoide son la cabeza y el flagelo, unidos por la pieza de conexión (Fig. 2). La cabeza contiene el núcleo, el acrosoma, el citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo contiene la cromatina altamente condensada y recubierto por el acrosoma, que está formado por membrana y encapsula vesículas citoplasmáticas que contienen enzimas hidrolíticas. Desde la pieza de conexión, el flagelo se divide sucesivamente en pieza media, pieza principal y pieza final. Este contiene un complejo central de microtúbulos que forman el axonema, a su vez rodeado por fibras densas exteriores que se extienden del cuello a la pieza principal. La pieza media contiene a la vaina mitocondrial, que es una estructura muy compacta en forma de hélice que contiene a las mitocondrias y que rodea a las fibras densas externas y al axonema. La mayor parte de la longitud del flagelo se compone por la pieza principal, definido por la presencia de una vaina fibrosa que rodea al axonema y las fibras densas del exterior. Las fibras densas exteriores y la

vaina fibrosa son estructuras citoesqueléticas particulares para el flagelo de espermatozoides en vertebrados superiores y pueden haber evolucionado con el desarrollo de la fertilización interna (Eddy, 2006).

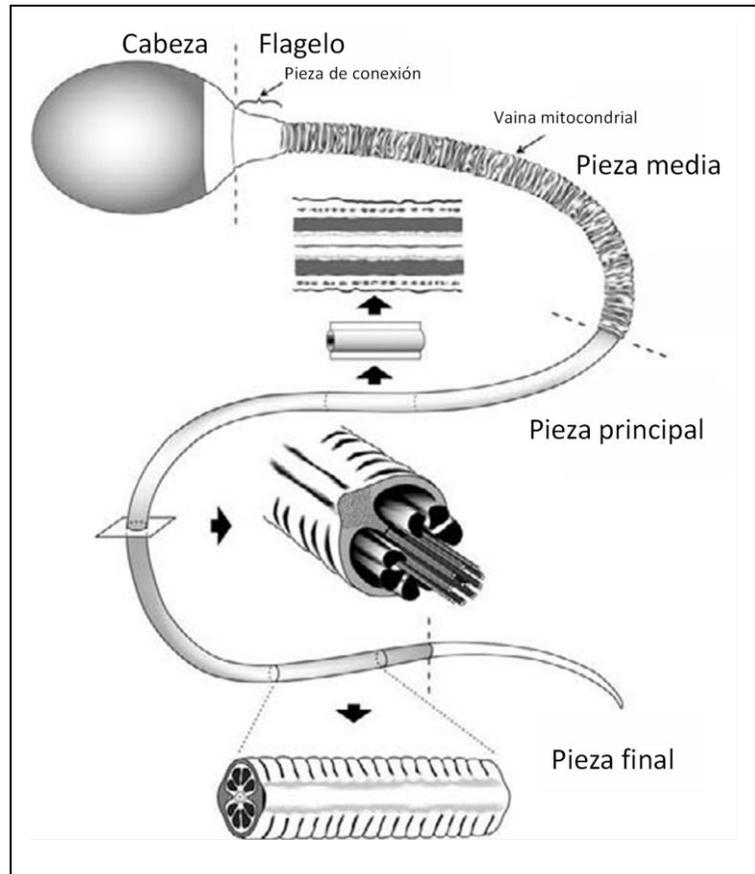


Figura 2. Características generales del espermatozoide de mamíferos (modificado de Eddy, 2006).

En el conejo el establecimiento de la espermatogénesis tiene lugar de forma variable hacia los 70 días de edad, esto depende de la raza, condiciones ambientales, alimentación y alojamiento entre otras. Los primeros espermatozoides aparecen alrededor de los 60 días, aunque solo es hasta los 84 días que se da la actividad en todos los túbulos seminíferos.

A los 112 días (16 semanas) la diferenciación del epidídimo se ha completado, y en la cabeza y cuerpo ya se encuentran espermatozoides. Hacia los 60-70 días de edad se inician los primeros intentos de monta y las primeras cubriciones o apareamientos hacia los 100 días, la madurez sexual (momento en que la producción de espermatozoides ya no aumenta) se

alcanza en la raza neozelandesa a los 129 días de edad (Macedo y Miguel, 1986). En el macho adulto la duración de la espermatogénesis es de 38 a 41 días (Swiestra y Foote, 1965). La producción diaria de espermatozoides se estima entre 30 y 40 millones por gramo de testículo, con un total diario aproximado de 250 millones de espermatozoides, con variaciones raciales y estacionales (El-habbato y col., 1984). Durante el tránsito por el epidídimo se da el fenómeno de maduración. En este proceso juegan un papel primordial las secreciones epididimarias, en las cuales el espermatozoide adquiere movilidad y la capacidad de fecundación (Alvariño, 1993). El paso por el epidídimo dura de 8 a 10 días, oscilando entre 2 y 2.5 metros de longitud, con una permanencia de 2 días en la cabeza, 2 en el cuerpo y 5 a 6 días en cola, con una progresión más rápida en la periferia que en el centro del tubo.

Durante la diferenciación espermática, y después, durante el tránsito por el epidídimo las células espermáticas se encuentran en serio riesgo, ya que los espermatozoides son altamente sensibles al daño por ERO (Neil y col., 1992; Chen y col., 1997; Alva y col., 2000; Quintero y col., 2000). No obstante, niveles bajos de ERO no afectan gravemente la viabilidad de los espermatozoides, pero provocan su inmovilización y el daño irreversible de su filamento axial induciendo una fosforilación insuficiente de las proteínas de este filamento lo que provoca una deficiente funcionalidad celular (Tremellen, 2008). Se han realizado estudios que comprueban que el  $H_2O_2$  está involucrado en la regulación de la capacitación y la reacción acrosomal, siendo éste benéfico en concentraciones relativamente bajas, pues favorece que estos eventos se lleven a cabo, pero en concentraciones altas inhibe este proceso (Rivlin y col., 2004).

Son crecientes las evidencias que señalan al estrés oxidante como un factor significativo involucrado en la etiología de la infertilidad masculina, pues provoca la pérdida de las funciones espermáticas por causa de la generación excesiva de ERO o a la disminución de la actividad antioxidante del semen. En humanos los reportes se encuentran en que, los niveles de oxirradicales producidos por los espermatozoides dañados o defectuosos son superiores a los generados por aquellos morfológicamente normales, encontrándose también que, en pacientes con oligozoospermia se encuentran valores elevados del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y existe una correlación positiva entre la generación de este radical y la actividad de la diaforasa, oxidorreductasa mitocondrial dependiente de NADH y específica de los espermatozoides;

siendo esta enzima 3 veces más activa en esos pacientes que en los normozoospermicos. Los radicales libres del oxígeno, determinados a través de la quimioluminiscencia, aparecen en el semen de 40 % de los pacientes infértiles, sin embargo, en los hombres fértiles no se presenta este hallazgo (Alba y col., 2000).

A pesar de que el ADN es un blanco biológico importante para las ERO, el  $O_2^{\circ-}$  es realmente poco reactivo con el ADN. Sin embargo, la mayor parte de los radicales  $O_2^{\circ-}$  sufren un proceso de dismutación dentro de las células. Este proceso, que puede ser de naturaleza química o enzimática, generando  $H_2O_2$ , que por sí mismo presenta una actividad de oxidación muy baja hacia la mayor parte de las biomoléculas. En presencia de metales de transición reducidos, en particular de  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , el  $H_2O_2$  es convertido, mediante la reacción de Fenton, en el  $OH^{\bullet}$  que tiene un poder altamente oxidante.

El  $OH^{\bullet}$  es muy reactivo y tiene la capacidad, no solo de abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de ADN, sino también de pegarse a las bases nitrogenadas formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños. El  $OH^{\bullet}$  se genera también por radiólisis del agua inducida por rayos X y  $\gamma$ . Otra molécula oxidante que puede propiciar daño en el ADN es el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un producto de la reacción del óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) con el  $O_2$ . El óxido nítrico es un radical libre sintetizado durante la oxidación del aminoácido L-arginina. Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa. Es importante aclarar que el óxido nítrico y el  $O_2^{\circ-}$  se producen al mismo tiempo dentro de los macrófagos, generando niveles elevados de  $ONOO^-$  en células inflamatorias activadas. Algunos autores han sugerido que este mecanismo es un posible nexo entre la inflamación y la inducción de mutaciones. El  $^1O_2$  parece tener un papel importante en varios sistemas biológicos, y podría generar daño oxidante en una gran variedad de blancos biológicos, incluyendo membranas y al ADN.

### 2.2.2. Daño a espermatozoides por lipoperoxidación

La importancia de las ERO es que pueden causar oxidación en moléculas biológicas, entre las que encontramos los fosfolípidos de membrana (lipoperoxidación) (Figura 3) y el ADN (fragmentación); pudiendo ser extremadamente tóxicas para el espermatozoide en concentraciones elevadas, lo que sugiere un importante papel del estrés oxidante como causa de infertilidad masculina (Arenas-Ríos, 2009). El proceso de lipoperoxidación, afecta enormemente a las membranas biológicas debido al gran contenido que tienen de fosfolípidos, siendo en importante proporción conformados por ácidos grasos poliinsaturados, que son muy vulnerables a la peroxidación (Figura 3); esta vulnerabilidad se debe a que los enlaces dobles carbono-carbono que debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino. El radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) al atacar los ácidos grasos insaturados, sustrae un átomo de hidrógeno y crea un nuevo radical, el cual es estabilizado por un rearrreglo interno que produce un dieno conjugado, que a su vez reacciona rápidamente con  $\text{O}_2$  para dar un radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ); este último puede atacar a un lípido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno, para producir un hidroperóxido y un nuevo radical. Los hidroperóxidos lipídicos son estables en estado puro, pero en presencia de metales de transición se descomponen dando un radical alcoxilo. Tanto los radicales peroxilos como alcoxilos estimulan la reacción en cadena, al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos. (Arenas 2004., Ambríz y col., 2012).

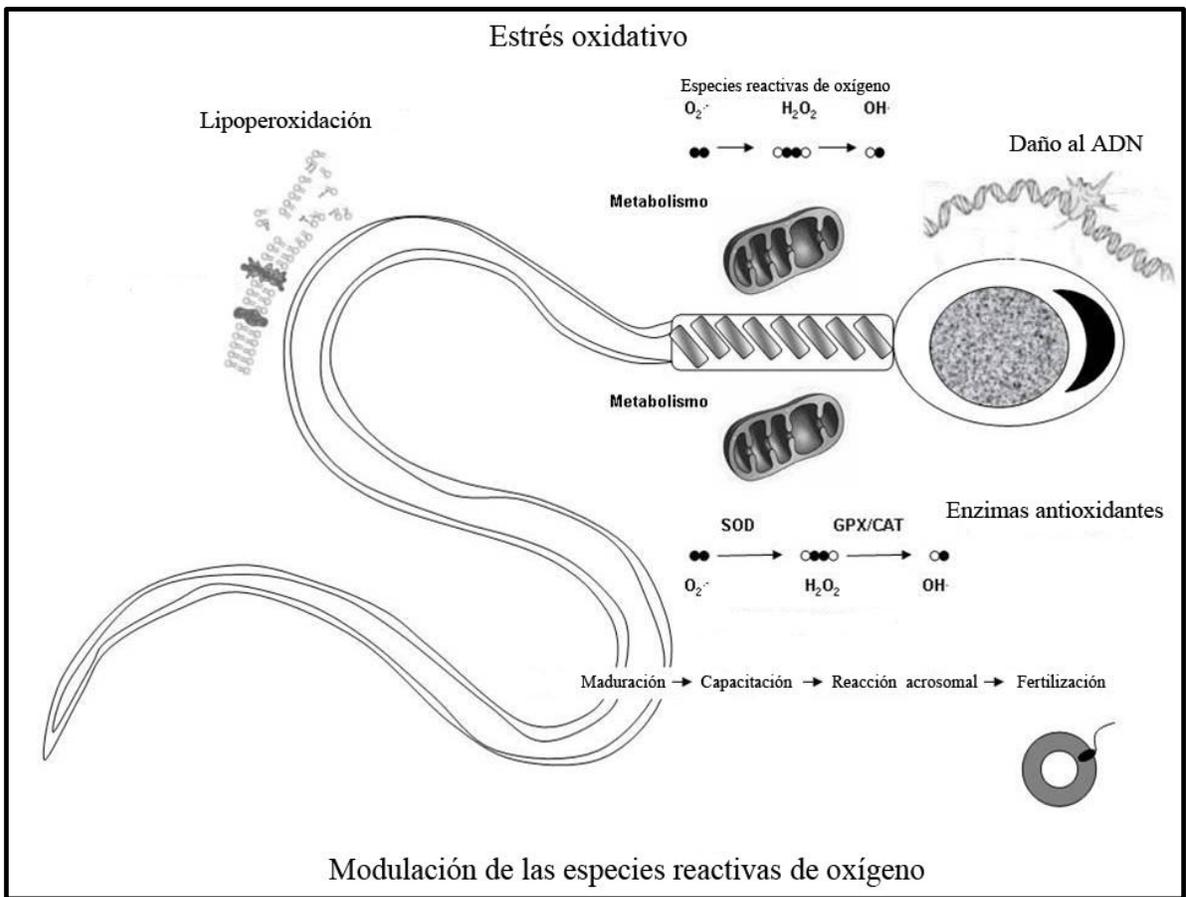


Figura 3. Mecanismos propuestos del estrés oxidante en espermatozoides. Tomado de Ambríz y colaboradores, (2012).

Se ha relacionado la lipoperoxidación como causa principal de la disminución en la movilidad del espermatozoide (Neil y col., 1992), lo que ha hecho suponer, que la disminución en la movilidad presente en los hombres obesos puede ser debida al estado oxidante anormal en el tracto reproductor masculino, que también pudiera provocar una elevada fragmentación del ADN (Michalakis y col. 2013).

### **2.2.3. Daño al espermatozoide por fragmentación al ADN**

El ADN es una molécula muy larga, que en su estructura tiene apariencia de doble hélice y su estructura primaria está formada por desoxirribonucleótidos, compuestos de tres diferentes subunidades: una base nitrogenada, una molécula de azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato; unidos por enlaces fosfodiéster a través de la unión del grupo 3'-OH hidroxilo del segmento del azúcar de un desoxirribonucleótido con el grupo 5'-hidroxilo del azúcar adyacente. La parte variable de la molécula, es su secuencia de bases. El ADN contiene cuatro tipos de pares de bases; dos púricas: adenina (A) y guanina (G), y dos bases pirimídicas: citosina (C) y timina (T). El esqueleto de ADN está compuesto de desoxirribosas, la presencia de varios grupos fosfato le confiere una carga sustancialmente negativa, dado que los grupos fosfato se encuentran ionizados a pH fisiológico, de modo que los cationes metálicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y los iones de H y Co pueden unirse al ADN. En una molécula de ADN, dos cadenas antiparalelas que son complementarias en su secuencia de nucleótidos están apareadas en una estructura de doble hélice con un giro hacia la derecha, formando aproximadamente 10 apareamientos de bases por cada giro helicoidal. Las bases púricas y pirimídicas se encuentran orientadas hacia el lado interior de la hélice, mientras que las unidades de fosfato y de desoxirribosa se orientan hacia el exterior. Las dos cadenas se mantienen unidas gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los pares de bases. La A se une con la T mediante dos puentes de hidrogeno ( $\text{A}=\text{T}$ ), y la guanina con la citosina mediante tres puentes ( $\text{G}\equiv\text{C}$ ). La secuencia u ordenamiento preciso que tienen las bases es lo que confiere la información genética y puede ser traducido para sintetizar proteínas, o puede copiarse (duplicación) para heredarse a la siguiente generación celular (Konigsberg y col., 2008).

Entre las diversas, moléculas afectadas por el estado prooxidante en la célula, el ADN es de singular importancia, ya que esta molécula es la que conlleva la información genética, además de que solo está presente en una única copia en cada célula. Las ERO y nitrógeno producen diferentes tipos de daño al ADN, como daños a las bases, azúcares, entrecruzamientos de proteínas con ADN, así como rupturas de doble cadena y cadena sencilla.

La G es la base nitrogenada que presenta el potencial de ionización más bajo entre los componentes de los ácidos nucleicos, por tanto, es la base más susceptible de ser oxidada por diferentes componentes oxidantes como los  $\text{OH}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$  y el  $\text{ONOO}^-$ . La guanosina tiene dos vías principales de descomposición que comprenden la adición inicial de un  $\text{OH}^\bullet$  en los carbonos C4 y C8 del anillo de las purinas. (Figura 4) (Konigsberg y col., 2008).

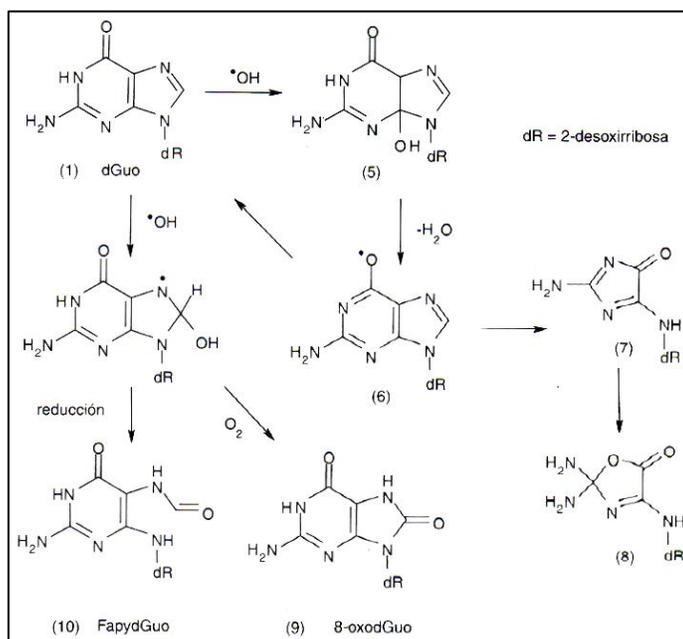


Figura 4. Modificaciones principales de los segmentos de guaninas del ADN por radicales hidroxilos.

La adición del radical  $\text{OH}^\bullet$  al C4 del segmento de guanina del ADN (1) genera dos productos de oxidación principales: 2,2-diamino-5-[2-desoxi-b-D-eritro-pentafuranosil amino]-5(2H)-oxazolona (8) y su precursor 2-amino-5-[2-desoxi-b-D-eritro-pentafuranosil amino]-4H-imidazol-4-ona (7). La adición de radical  $\text{OH}^\bullet$  al C8 del segmento de guanina conlleva a la formación del 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGua) (9), así como del 2,6-diamino-5-formamido-4-hidroxi pirimidina (FAPY-Gua)(10). (tomado de: Konigsberg y col., 2008)

Gogol y cols (2002) determinaron el daño al ADN usando la técnica de naranja de acridina por citometría de flujo, de un grupo de conejos NZB de diferentes edades, desde los 5 meses y hasta los 28 meses de edad. reportando un daño al ADN ( $\text{COMP } \alpha_t$ ) ( que es el parámetro que analiza el porcentaje de espermatozoides fuera de la población principal tendientes a la fluorescencia roja y que son los que presentan daño al ADN) de 3.2 % a los 5 meses de edad, 1.7 % a los 6 meses, 1.9 % a los 10 meses, 2.4 % a los 13 meses, 3.2 % a los 5 meses, 1.8 % a

los 16 meses, 2.7 % a los 20 meses, 2.7 % a los 24 meses y un 2.8 % a los 28 meses encontrando una gran variabilidad entre individuos y en los mismos a diferentes edades, aunque se sugiere que los espermatozoides de conejo de NZB son muy resistentes a la fragmentación del ADN. Destacando la variabilidad obtenida para el conejo NZB y que no se correlacionó a la edad con la fragmentación del ADN (Gogol y cols, 2002). Love (2005) determinó el daño al ADN de caballo utilizando la técnica de naranja de acridina por citometría de flujo, encontrando una relación negativa entre la fragmentación del ADN ( $COMP \alpha_t$ ) y la capacidad fertilizante (pc). Reportan un  $COMP \alpha_t$  del 10% con una pc del 60%, un  $COMP \alpha_t$  del 20% con un pc del 50% y un  $COMP \alpha_t$  del 40% con un pc del 35%. Argumentan que el daño al ADN no está correlacionado directamente en proporción con la pc del caballo, aunque, en esta especie es evidente el gran valor que presenta en el daño al ADN ( $COMP \alpha_t$ ).

#### 2.2.4. Técnica del ácido tiobarbitúrico para la determinación de oxidación en membranas

Para el daño a membranas producido por lipoperoxidación es utilizada la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA), que cuantifica la producción de malondialdehído (MDA) mediante un método colorimétrico, siendo el MDA uno de los subproductos de este proceso de degradación en las membranas celulares (Álvarez y Storey., 1982). El MDA es un dialdehído de tres carbonos, con grupos carbonilo en los carbonos C1 y C3 (Angelo, 1996). La reacción implica al ácido 2-tiobarbitúrico con el MDA (figura 5), produciendo un compuesto de color rojo, medido espectrofotométricamente a 532 nm de longitud de onda (de acuerdo con la metodología la longitud de onda puede variar, situándose alrededor de 500 a 550 nm). La formación del compuesto de TBA-MDA es en una proporción de 2:1 y es posiblemente iniciada en un ataque nucleofílico del C5 del TBA y el C1 del MDA, seguido de una deshidratación en reacción similar subsecuente de un compuesto intermediario con una segunda molécula de TBA en una proporción de 1:1 (Nair y Turner, 1984). La cuantificación del MDA se hace a partir de curvas de calibración construidas con concentraciones conocidas de MDA. Los patrones más frecuentemente utilizados son el 1,1,3,3,-tetrametoxipropano (TMP) y el 1,1,3,3,-tetraetoxipropano (TEP) que en condiciones ácidas de prueba sufren hidrólisis, resultando en la liberación de MDA. Los resultados pueden ser expresados en unidades de absorbancia por unidad de masa de la muestra o “Valor TBA” o “número TBA”, definidos como la masa en mg o ng de MDA por kg o g de muestra (Osawa y col, 2008).

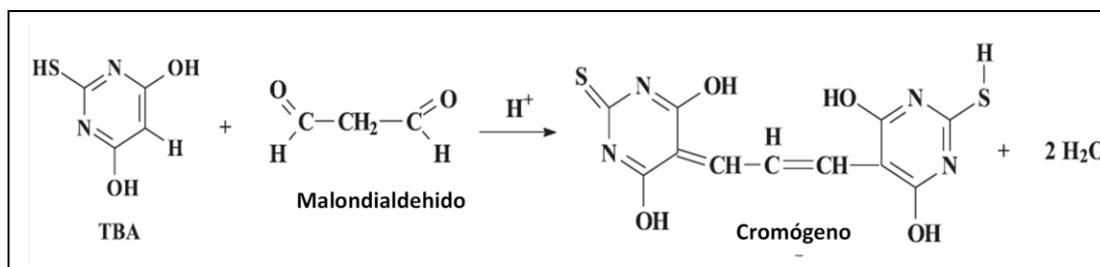


Figura 5. Reacción de la prueba de TBA entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el MDA, formando un compuesto color rojo, medido espectrofotométricamente a 532 nm (tomado de: Osawa y col, 2008).

### **2.2.5 Técnica de naranja de acridina y sus características de fluorescencia para determinar fragmentación del ADN**

La capacidad única del naranja de acridina (AO) de teñir los ácidos nucleicos con diferentes conformaciones deriva del hecho que este colorante metacromático muestra un cambio en la absorción y emisión de su espectro cuando se une a ADN de cadena doble o sencilla (Tabla 1). La AO se une al ADN de doble cadena por intercalación y esta forma de fluorescencia está en el espectro del verde cuando es excitado por luz azul. La máxima absorción del AO unido por intercalación al ADN es de 500 a 506 nm y su emisión es de 520 a 524 nm; esto es una clásica emisión de fluorescencia, con una vida corta (5-ns). La interacción del AO con el ADN de cadena sencilla es más complicada, un proceso de varios pasos inicia cuando se intercala el AO con las bases vecinas, se da la neutralización de la carga del polímero por los cationes del AO, después se da una condensación y aglomeración de los productos. La reacción de condensación es altamente cooperativa. En el producto final el AO está intercalado con las bases de ADN formando aglomerados de AO-ADN, esta forma más sólida tiene la virtud de estar más protegida hasta cierto punto de la interacción con las moléculas de oxígeno y agua. El espectro de absorción del AO en este caso de estado precipitado es desplazado hacia el azul, en comparación con el estado intercalado con una absorción máxima entre 426-458 nm. La emisión del AO precipitado varía entre los 630 y los 644 nm dependiendo de la composición de las bases. El tiempo de vida de la emisión roja a temperatura ambiente es de menos de 20 ns (Darzynkiewicz y col, 2004).

Tabla 1. Características espectrales de la naranja de acridina como colorante del ADN.

Colorante o complejo	Máxima absorción (nm)	Excitación recomendada (nm)	Máxima emisión (nm)	Filtros long-pass o band-pass recomendados
Naranja de acridina (AO)(monómero)	492	---	525	----
AO-ADN cadena doble (intercalado)	502	488	520-524	$520 \pm 15$
AO-ADN cadena sencilla (precipitado)	426-458	457	630-644	$> 640$

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El sobrepeso y la obesidad tienen grandes efectos sobre la salud y la capacidad de reproducción en humanos, una de las propuestas de daño en la reproducción es el causado por el estrés oxidante que se ve incrementado por el estado crónico de inflamación típico del sobrepeso y la obesidad (Teerds y col., 2011). Los espermatozoides y sus procesos fisiológicos son altamente sensibles al estrés oxidante, viéndose disminuidos parámetros espermatobioscópicos como la movilidad, la viabilidad, la concentración, la morfología, el estado de compactación nuclear, el estado redox y el estado de fragmentación del ADN nuclear. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que causan estos cambios no han sido reportados, por otro lado, los estudios se han realizado en sujetos que asisten a clínicas de fertilidad, existiendo un sesgo poblacional de muestreo, por lo que es importante el estudio en población abierta o a través de un modelo animal accesible para la inducción del sobrepeso y la obtención de muestras seminales como el conejo NZB, que permita determinar si existe un daño a la membrana del espermatozoide y un efecto de fragmentación o descompactación sobre el ADN.

#### **4. HIPÓTESIS**

El sobrepeso en el conejo NZB, provocará daño (fragmentación) en el ADN y lipoperoxidación en la membrana del espermatozoide.

#### **5. OBJETIVO**

Determinar daños en el espermatozoide del conejo NZB, provocados por sobrepeso tales como la fragmentación en el ADN y la lipoperoxidación de la membrana.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Inducir sobrepeso en el conejo NZB administrando una dieta hipercalórica.

Determinar si hay alteraciones en la concentración, viabilidad, movilidad y morfología en espermatozoides eyaculados de conejos con sobrepeso.

Evaluar la fragmentación y la descompactación del ADN nuclear en espermatozoides eyaculados de conejos con sobrepeso.

Evaluar la lipoperoxidación en la membrana en espermatozoides eyaculados de conejos con sobrepeso.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1. Grupos experimentales e inducción de sobrepeso en conejo NZB**

Se utilizaron 16 conejos NZB, desde los 35 días de vida, mismos a los que se les acondicionó un espacio en La Granja de Producción Animal, perteneciente a la UAM Iztapalapa, en condiciones óptimas de alimentación, suministro de agua, condiciones de luminosidad natural y espacio individual necesarios. Los animales fueron alojados en jaulas con medidas de 88 x 40 x 60 cm, con dos espacios por jaula.

Se formaron dos grupos de conejos NZB, uno fue usado como control (normopeso) (n=4) y el otro para inducción de sobrepeso (n=12). En el grupo de sobrepeso se dio un tratamiento para generar sobrepeso por medio de una dieta hipercalórica (3.2 Mcal/kg) conteniendo aceite vegetal comestible marca “Aurrera” (el cual se caracteriza por ser ampliamente utilizado y contener grasas poliinsaturadas principalmente compuestas por ácido linoléico (omega 3) y ácido linolénico (omega 6)) + alimento comercial marca “Malta Clayton” con una proporción de 120 g + 12 mL respectivamente, administrándose diariamente y con un suministro de agua *ad libitum* y en el grupo control (normopeso) se mantuvieron en una dieta de 150 g diarios (recomendado para sementales) de alimento comercial de la misma marca (2.8 Mcal/kg) ( el alimento se reporta con un contenido mínimo de: proteína 16.0%, grasa 2.5% y E.L.N del 43.5 %, con un máximo de: humedad 12%, fibra 16 % y cenizas del 10 %). En el presente trabajo se alcanzó el sobrepeso de los conejos, respondiendo al tratamiento 6 individuos de los 12 iniciales y fueron usados 4 para estudiar el sobrepeso. Como criterios de inclusión se utilizaron los animales que alcanzaron el mayor peso con respecto al grupo normopeso y que cumplieran con una adecuada calidad en los parámetros espermatozoides. Los individuos fueron pesados mensualmente para llevar a cabo el control de la inducción de sobrepeso.

## **7.2. Obtención de muestras seminales**

A partir del quinto mes y hasta el séptimo mes de edad, los machos fueron entrenados para la obtención del semen usando una vagina artificial y una hembra receptiva como estímulo sexual, con el fin de lograr el condicionamiento de los machos al manejo durante la toma de muestras seminales. La toma de las muestras seminales se realizó a los 26 meses (812 días) para la fase experimental de este estudio.

La vagina artificial consta de un cuerpo semi-rígido y un revestimiento interno o camisa (látex o goma). La temperatura interna para la colección del semen fue entre 45-50°C en la vagina artificial. Para obtener los eyaculados de la manera más higiénica y rápida posible, se utilizaron tantas vaginas y tubos colectores como eyaculados se obtuvieron al día. El ritmo de extracción de semen utilizado fue de dos extracciones por macho por semana. Para la colecta de los eyaculados se usó un tubo eppendorf de 2 mL (Magapor, 2012).

## **7.3. Procedimiento de lavado de espermatozoides**

A la suspensión de espermatozoides se le añadieron 500 µL de solución “Ringer” (solución de lavado: 95 mM NaCl, 5mM KCl, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), y se centrifugó a 500 g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete se suspendió con 1 mL de solución de lavado, y centrifugó nuevamente a 500 g por 5 minutos.

#### 7.4. Concentración espermática

Dilución: 1:100, 5  $\mu\text{L}$  de semen y 995  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se agitó la muestra en un tubo eppendorf. Se agregaron 15  $\mu\text{L}$  en cada lado de la cámara de Neubauer y se dejó reposar 1 minuto para que las células sedimentaran y se contaron al microscopio óptico con un aumento de 400.

Si los espermatozoides se encuentran entre las líneas, solo se cuentan si se encuentran en el lado superior izquierdo como lo muestran las flechas (Figura 6).

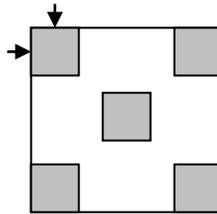


Figura 6. Sitios de la reglilla de la cámara de Neubauer, que indican los lugares donde deben ser contados los espermatozoides.

Para determinar la concentración de espermatozoides en millones por mL, se cuantificaron 5 cuadros por reglilla (10 cuadros en total) y se obtuvo la suma de estos, las sumas de las dos reglillas se promediaron y este resultado se dividió entre el factor de 0.4 (correspondiente a la dilución 1:100) y el resultado se expresó en millones de espermatozoides por mL ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) (WHO, 2012).

## 7.5. Viabilidad espermática

Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L de semen y se añadieron 5  $\mu$ L de eosina-nigrosina (eosina 1% y nigrosina 10% en agua destilada, proporción 2:3 (vol. / vol.) diluida en citrato de amonio). Se colocó en un portaobjetos. Se realizaron frotis. Se secaron a la flama del mechero, para evitar la formación de cristales, teniendo cuidado de sobrecalentar la muestra. Se observaron al microscopio óptico a 400 aumentos contando 100 espermatozoides, diferenciando entre vivos (no teñidos) y muertos (teñidos) (WHO, 2012).

## 7.6. Porcentaje de movilidad masal

La movilidad masal es el tipo de movimiento grupal que se puede apreciar en una muestra de semen a bajo aumento (100 aumentos).

Se colocaron 5  $\mu$ L de semen en el portaobjetos y se observó a 100 aumentos.

Se realizó la observación distinguiendo las categorías siguientes:

Categorías de movilidad masal

<p><b>0</b> inmóviles. <b>1</b> poco movimiento. <b>2</b> movimientos en forma de “olas”. <b>3</b> movimientos en forma de “remolinos”.</p>
---

Se reportan los porcentajes por categoría de movilidad masal.

### 7.7. Porcentaje de movilidad individual

Se colocaron 5  $\mu\text{L}$  semen y 5  $\mu\text{L}$  de “Ringer” en el portaobjetos y se observó a 400 aumentos utilizando un cubre objetos.

Se contaron 100 espermatozoides distinguiendo las siguientes categorías de movimiento individual:

- |  |
|--|
| <p><b>0</b> inmóviles</p> <p><b>1</b> movimiento progresivo</p> <p><b>2</b> movimiento no progresivo</p> |
|--|

El porcentaje de movilidad se reporta sumando el movimiento progresivo y el movimiento no progresivo.

### 7.8. Morfología espermática

Se realizó con base a la técnica de tinción de Papanicolaou para espermatozoides. Se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  de solución fijadora, se colocaron en un portaobjetos y se realizó un frotis que se dejó secar por 5 minutos. Se aplicó la siguiente corrida de tinciones: Solución Papanicolaou 1 (45 segundos), enjuague con agua corriente, alcohol amoniacal (2 minutos), alcohol al 70%, alcohol al 96%, solución Papanicolaou 2 (1 minuto), alcohol al 96% (x2), solución Papanicolaou 3 (1 minuto), alcohol al 96%, alcohol al 100% y por último xilol 5%

Se depositó una gota de entellan sobre un cubreobjetos que fue aplicado sobre el portaobjetos en xilol, la muestra se dejó secar por 24 horas. Se observaron al microscopio (400 aumentos) en campo claro. Se determinó la morfología espermática siguiendo los criterios:

Categorías de Morfología espermática:

- A) Normales
- B) Defectos de cabeza
- C) Defectos de cuello y pieza media
- D) Defectos de cola
- E) Residuos de gota citoplasmática

Se reportan los promedios de los valores de los parámetros correspondientes al análisis espermatooscópico.

### **7.9. Daño oxidante (lipoperoxidación) en la membrana espermática**

Para evaluar el daño oxidante a la integridad de la membrana espermática se utilizó la técnica del ácido tiobarbitúrico; específicamente se cuantificó la concentración de malondialdehído (MDA) mediante un método colorimétrico descrito por Álvarez y Storey (1982) modificado. Para el presente estudio se utilizaron muestras de espermatozoides de los grupos normopeso y sobrepeso de los conejos hasta completar una muestra de 12 determinaciones de MDA para cada grupo (3 muestras por individuo). Se utilizaron alícuotas de  $70 \times 10^6$  espermatozoides en una solución de medio Brackett (112 mM NaCl, 4.02 mM KCl, 0.52 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.83 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25 mM Piruvato de sodio, 2.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 37 mM NaHCO<sub>3</sub> y 13.9 mM Glucosa) en 500 µL. y se efectuó el siguiente proceso para cada muestra: Se agregaron 125 µL ácido tricloroacético 35% y se incubaron a 4° C por 15 minutos, se centrifugaron a 1750 g por 15 minutos, se tomaron 375 µL sobrenadante más 125µL ácido tiobarbitúrico 75%, se incubaron a 100° C (ebullición) por 15 minutos, se incubaron a 4° C por 15 minutos, se agregaron 1.5 mL de n-butanol y se mezclaron con vortex por 30 segundos, se centrifugaron a 2100 g por 15

minutos (el paso de butanol es descrito por Günter, 1992) y se cuantificó el sobrenadante con un espectrofotómetro de luz UV-visible marca Shimadzu modelo UV-1601PC y realizando la lectura a 532nm.

Para hacer la curva patrón de MDA se utilizó al tetrametoxipropano (TMP) en 6 concentraciones (0, 1, 2, 3, 4 y 5 nM) y se preparó como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Método de elaboración de la curva patrón con tetrametoxipropano. Se muestran las concentraciones de las sustancias, las cantidades, tiempo para cada paso, las g utilizadas y el intervalo de lectura en nm.

Tubo	[TMP] nm	TMP μL	Brackett μL	ATC 35% μL	ATB 0.75 %μL	Incubación 100°C	Hielo	Butanol mL	Centrifugación 2100 g 15min	D.O 532nm
1	0	0	250	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
2	0	0	250	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
3	1	50	200	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
4	1	50	200	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
5	2	100	150	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
6	2	100	150	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
7	3	150	100	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
8	3	150	100	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
9	4	200	50	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
10	4	200	50	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
11	5	250	0	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	
12	5	250	0	125	125	15 min	15 min	1.5	15 min	

Para los resultados se interpoló la concentración de MDA en base a la ecuación de regresión lineal resultante de la curva patrón de TMP. Para el presente estudio se utilizó para el daño oxidante (lipoperoxidación) en la membrana espermática en muestras de cada animal (grupo normopeso y grupo sobrepeso), elaborando la cuantificación de MDA por duplicado.

### 7.10. Daño en el ADN con naranja de acridina por citometría de flujo

Para la determinación del daño al ADN se utilizó la técnica de naranja de acridina por citometría de flujo propuesta por Villaverde y colaboradores. (2013), modificado.

Se lavaron las muestras con un “buffer TNE” (0.01 M TRIS-HCL, 0.15M NaCl y 1mM EDTA. pH 7.4) por centrifugación a 500 g (2 lavados). Se elaboraron alícuotas de  $3 \times 10^6$  de espermatozoides. Se realizó una fijación y permeabilización de membrana en metanol por 90 minutos. Se lavaron por centrifugación a 500 g utilizando el “buffer” de TNE. Se hizo una tinción con naranja de acridina por 30 minutos (naranja de acridina 10mL (10 $\mu$ g/mL) + 40 mL ácido cítrico 0.1 M + 2.5 mL fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0.3 M) agregando 1 mL al paquete resultante del lavado. Se realizó una suspensión de las células con ayuda de la micro pipeta, realizando el pipeteo varias veces.

Se utilizó un citómetro de flujo de la compañía Becton Dickinson, modelo FACScan, con un láser azul de argón de 488 nm.

Como resultados de esta técnica los espermatozoides con ADN estado nativo (doble cadena) presentaron fluorescencia en verde, mientras que los que presentaron fluorescencia en naranja, amarillo o rojo presentaron ADN con daño.

En la adquisición de las muestras se realizó el ajuste de los parámetros del citómetro utilizando una muestra de un conejo normopeso para obtener el comportamiento basal de las muestras y la autofluorescencia de las células. Se adquirieron las muestras utilizando estos ajustes. Se ajustó la lectura en el citómetro, específicamente en los fotodetectores: FL1 (Verde ADN nativo) y FL3 (rojo; ADN dañado). Se adquirieron 15000 células por muestra. El análisis de los datos se realizó utilizando el Flowing Software 2, se seleccionó la población celular en un gráfico de puntos de FL1 vs FL3 y se elaboró un “gate (R-1 (figura 7))” (selección de un área) eliminando el los restos celulares y los espermatozoides desnaturalizados (R-2 (figura 7)) y obteniendo los estadísticos para el índice de fluorescencia FL1 (fluorescencia verde) y FL3 (fluorescencia roja). Se calculó el COMP  $\alpha_t$  que es el parámetro

que analiza el porcentaje de espermatozoides fuera de la población principal tendientes a la fluorescencia roja (R-3 (figura 7)) y que se calculó utilizando la siguiente fórmula: (número de células tendientes a la fluorescencia roja (R-3 (figura 7)) x 100)/ el número total de células analizadas(R-1 (figura 7)) con el Flowing Software 2; se calculó el promedio y desviación estándar del COMP  $\alpha_t$  resultado de los análisis para cada muestra normopeso n=19 y sobrepeso n=19 y se presenta en acumulado en el gráfico 4 de la sección de resultados.

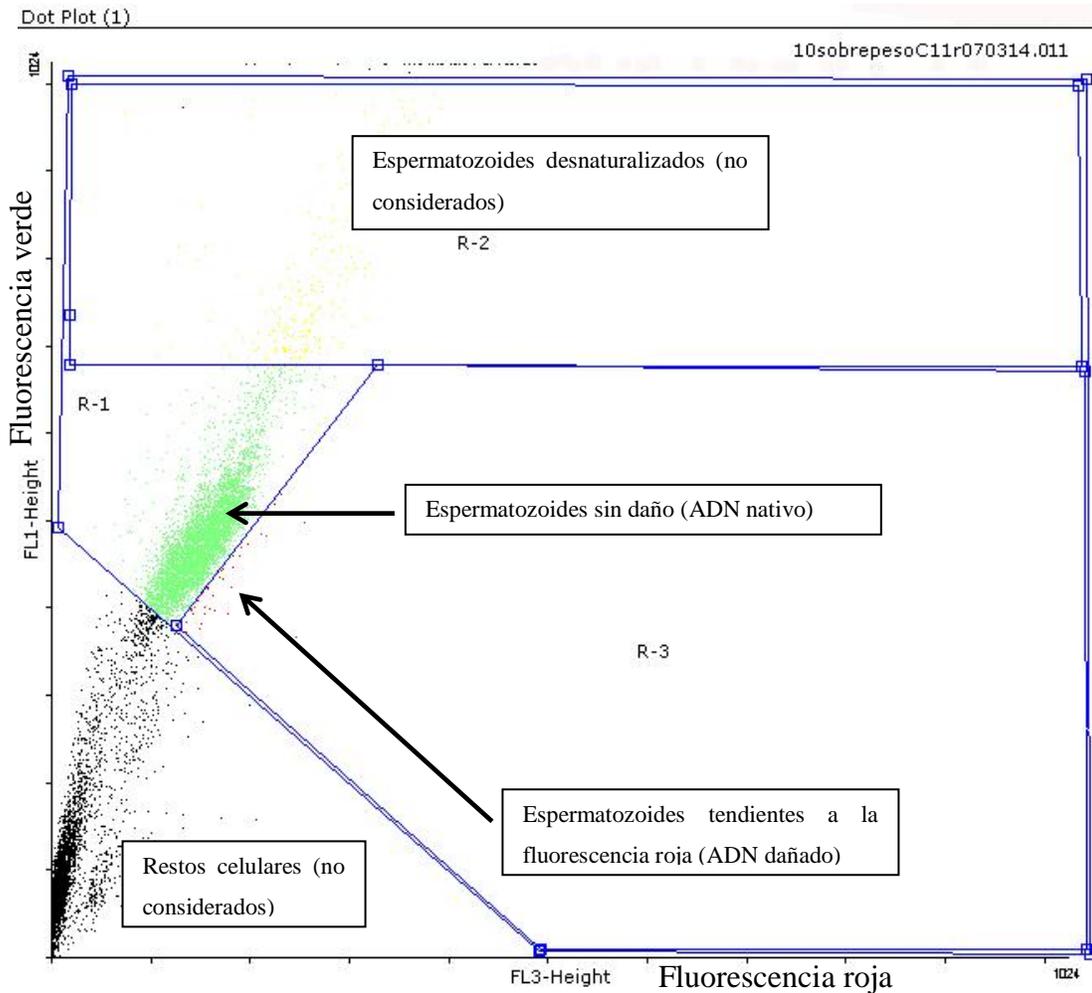


Figura 7. Ventana de adquisición y análisis en el Flowing Software 2 de una muestra de espermatozoides teñidos con naranja de acridina y analizados por citometría de flujo con el citómetro de flujo, modelo FACScan. Se calculó el COMP  $\alpha_t$  utilizando la siguiente fórmula: (número de células tendientes a la fluorescencia roja (R-3) x 100)/ el número total de células analizadas(R-1)” con el Flowing Software 2. Los Espermatozoides desnaturalizados y los restos celulares fueron excluidos del análisis.

### **7.11. Descompactación del ADN con azul de anilina**

La descompactación del ADN nuclear se cuantificó con la técnica de tinción con el colorante azul de anilina, siendo los núcleos con mayor contenido de lisina los que dan positivo a esta tinción y dado que las histonas tienen un gran contenido de lisina puede inferirse que no hubo un adecuado cambio de estas histonas por las protaminas características de un núcleo espermático adecuadamente compactado (Sellami y col., 2013).

Se realizaron frotis con 10µL de semen de 12 muestras del grupo normopeso y 12 muestras del grupo sobrepeso. Se secaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Se fijaron en metanol por 10 minutos. Se lavaron en agua destilada teniendo cuidado de no desprender los espermatozoides. Se secaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Se realizó la tinción con azul de anilina (Azul de anilina acuosa (5% P/V) y 5 % ácido acético glacial. pH: 3.5) por 3 minutos. Se lavaron en agua destilada teniendo cuidado de no desprender los espermatozoides. Se secaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Se realizaron las observaciones a 1000 aumentos al microscopio de luz. Se realizó un conteo de 200 células por cada muestra.

El resultado de esta técnica permite distinguir entre espermatozoides maduros (sin teñir) e inmaduros (con tinción presente en la cabeza del espermatozoide) (Sellami y col., 2013).

## **8. Análisis estadístico**

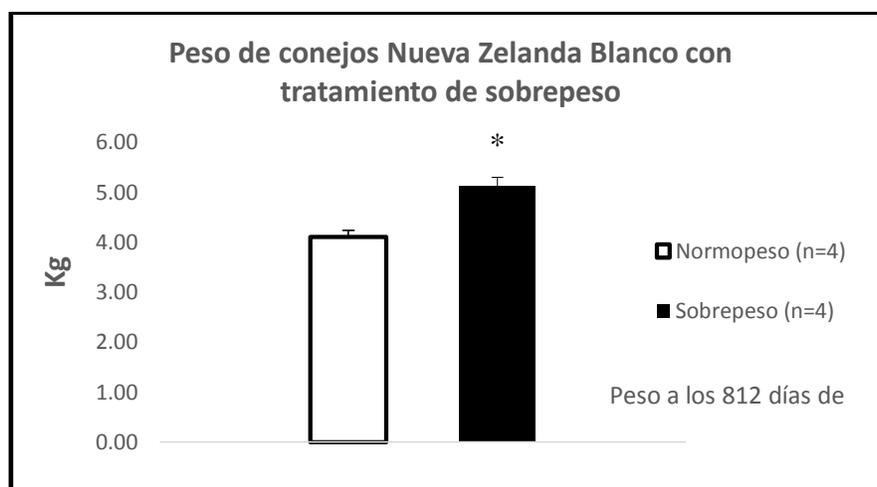
Los pesos corporales de los animales fueron analizados con una prueba estadística de t de Student; para las significancias estadísticas, se consideró una  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se consideró entre los grupos (grupo normopeso vs grupo sobrepeso).

Se utilizó un análisis estadístico de t de Student para la fragmentación del ADN, para el daño por lipoperoxidación a la membrana y para la determinación de la descompactación del ADN. Se consideró una  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se consideró entre el grupo normopeso vs grupo sobrepeso.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Peso de los grupos experimentales

Para el presente estudio se logró la obtención del sobrepeso en los conejos (gráfico 1) en el pesaje correspondiente a los 812 (26 meses) días de vida, se muestra la fecha correspondiente al pesaje de la última fecha en que se efectuaron los experimentos, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas de aumento de peso del grupo sobrepeso (n=4) con respecto al normopeso (n=4). Se muestran los promedios  $\pm$  desviación estándar de ambos grupos. Se registró un valor de  $4.10 \pm 0.16$  kg en el grupo normopeso y de  $5.11 \pm 0.07$  kg para el grupo sobrepeso, representando el aumento entre los grupos a favor del normopeso del 24% con una  $p=0.03$ . Se obtuvieron las muestras para el trabajo experimental desde el pesaje correspondiente al 29 noviembre del 2013 (714 días de vida) y hasta el 7 de marzo del 2014 (812 días de vida) fecha en la que se realizó el último experimento.



**Gráfico 1.** Comparación de los pesos de conejos Nueva Zelanda Blanco con tratamiento de sobrepeso (dieta hipercalórica; barra negra) y control (barra blanca). Los pesos de los grupos experimentales corresponden a los valores de:  $4.10 \pm 0.16$  kg en el grupo normopeso y de  $5.11 \pm 0.07$  kg para el grupo sobrepeso, representando el aumento entre los grupos a favor del normopeso del 24% con una  $p=0.03$  (\*). Este gráfico corresponde a la última fecha (812 días de vida) en que se realizaron los últimos experimentos. La n del experimento fue de 4 animales por grupo.

## 9.2. Análisis espermático

En los resultados de los análisis espermatozoides (tabla 3) de los grupos normopeso y sobrepeso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los parámetros presentaron los siguientes valores (tabla 3): volumen seminal de los grupos normopeso ( $0.92 \pm 0.26$  mL) y sobrepeso ( $0.95 \pm 0.40$  mL); en la determinación de la movilidad masal espermática o movilidad grupal los resultados tienen los valores de  $2.75 \pm 0.44$  para el grupo normopeso y de  $2.0 \pm 0.78$  en una escala de 0 a 3. En la categoría general de movilidad espermática los parámetros de movilidad progresiva (normopeso  $31.38 \pm 8.93$  % vs sobrepeso  $21.79 \pm 9.55$  %) y no progresiva (normopeso  $58.96 \pm 8.67$  % vs sobrepeso  $63.46 \pm 7.2$  %) así como los espermatozoides inmóviles que presentaron un porcentaje en el grupo de normopeso del  $9.5 \pm 3.67$  % en el grupo sobrepeso que presentó un  $14.96 \pm 7.16$  %, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La cuantificación de la concentración espermática fue evaluada en millones de espermatozoides por mililitro, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos normopeso con  $569.48 \pm 310.49 \times 10^6$ /mL y sobrepeso con  $454.17 \pm 236.83 \times 10^6$ /mL espermatozoides.

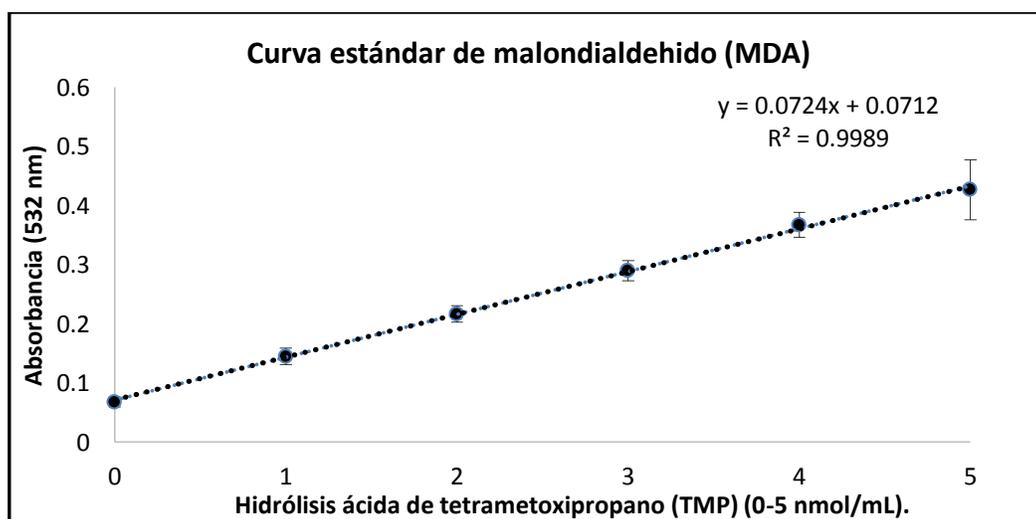
En la morfología espermática, la gota citoplasmática que se registró fue con una incidencia del 1 % en el grupo de normopeso (con un solo caso) y en el grupo sobrepeso se registró de gota citoplasmática con un valor de  $1.17 \pm 0.41$  %. No se detectaron diferencias significativas en otros parámetros morfológicos como: espermatozoides normales (normopeso  $83.54 \pm 4.79$  % vs  $79.25 \pm 5.07$  % sobrepeso), defectos en cabeza (normopeso  $1.27 \pm 0.46$  % vs  $1.41 \pm 0.62$  % sobrepeso), defectos de cuello y pieza media (normopeso  $1.79 \pm 2.27$  % vs  $1.55 \pm 0.83$  % sobrepeso) y defectos de flagelo (normopeso  $14.57 \pm 5.59$  % vs  $18.17 \pm 5.21$  % sobrepeso). En la viabilidad espermática no se encontraron diferencias significativas, siendo los valores de  $92.83 \pm 2.16$  % para el grupo normopeso y de  $86.38 \pm 5.8$  % en el grupo sobrepeso (tabla 3).

Tabla 3. Los resultados muestran una tendencia a ser menores en la calidad espermática en el grupo con sobrepeso con respecto al control, sin embargo, en el análisis estadístico no se presentaron diferencias significativas entre los grupos, con una  $p < 0.05$ . Los resultados son producto de 24 evaluaciones espermáticas de cada grupo experimental (normopeso y sobrepeso).

<b>Parámetro</b>	<b>Normopeso</b>	<b>Sobrepeso</b>	<b>Estadístico t de Student <math>p &lt; 0.05</math></b>
Volumen seminal (mL)	$0.92 \pm 0.26$	$0.95 \pm 0.40$	Sin diferencia ( $p = 0.997$ )
Movilidad Masal	$2.75 \pm 0.44$	$2.0 \pm 0.78$	Sin diferencia ( $p = 0.557$ )
Movilidad Individual			
Progresivo %	$31.38 \pm 8.93$	$21.79 \pm 9.55$	Sin diferencia ( $p = 0.111$ )
No progresivo %	$58.96 \pm 8.67$	$63.46 \pm 7.2$	Sin diferencia ( $p = 0.294$ )
Inmóviles %	$9.5 \pm 3.67$	$14.96 \pm 7.16$	Sin diferencia ( $p = 0.081$ )
Viabilidad %	$92.83 \pm 2.16$	$86.38 \pm 5.8$	Sin diferencia ( $p = 0.878$ )
Concentración ( $\times 10^6$ )	$569.48 \pm 310.49$	$454.17 \pm 236.83$	Sin diferencia ( $p = 0.757$ )
Morfología			
Normales	$83.54 \pm 4.79$	$79.25 \pm 5.07$	Sin diferencia ( $p = 0.389$ )
A) Defectos de cabeza %	$1.27 \pm 0.46$	$1.41 \pm 0.62$	Sin diferencia ( $p = 0.878$ )
B) Defectos de cuello y pieza media %	$1.79 \pm 2.27$	$1.55 \pm 0.83$	Sin diferencia ( $p = 0.703$ )
C) Defectos de flagelo %	$14.57 \pm 5.59$	$18.17 \pm 5.21$	Sin diferencia ( $p = 0.699$ )
D) Gota citoplasmática %	1	$1.17 \pm 0.41$	Sin diferencia (sin valor)

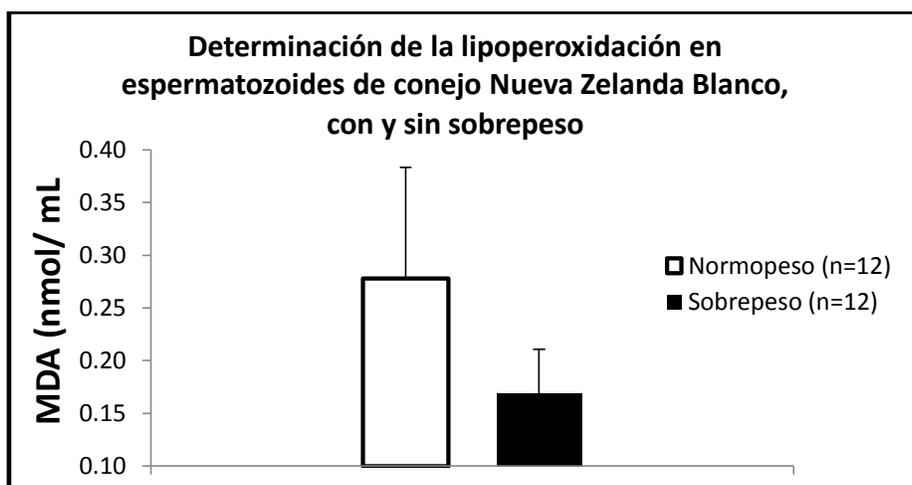
### 9.3. Daño oxidante (lipoperoxidación) en la membrana espermática

Para la determinación de la lipoperoxidación se elaboró una curva estándar de malondialdehído (MDA) (gráfico 2), usando concentraciones crecientes de tetrametoxipropano (TMP). La ecuación lineal obtenida de la curva estándar se utilizó para inferir las concentraciones de las muestras problema a través del despeje de esta ecuación de las absorbancias obtenidas de las muestras de 70 millones de espermatozoides para cada cuantificación. Se elaboró una curva estándar de MDA para cada experimento, evitando así posibles errores en la cuantificación del MDA.



**Gráfico 2.** Curva estándar de malondialdehído. La absorbancia (medida a 532 nm) es producto de la hidrólisis ácida de tetrametoxipropano (TMP) (0-5 nmol/mL). Cada punto representa el promedio +/- desviación estándar de 4 determinaciones. El promedio de la suma de todas las curvas, nos arrojó un valor de  $R^2$  de 0.9989, y dado que para el caso de la  $R^2$  existe una dependencia funcional lineal cuando esta se acerca a 1, los resultados nos indican que nuestras curvas estándar fueron confiables.

Los resultados del gráfico 3 reportan la cuantificación obtenida de la producción de MDA, producto de la lipoperoxidación de espermatozoides de los conejos con y sin sobrepeso, se cuantificó este parámetro a partir de alícuotas de 70 millones de espermatozoides para cada muestra problema de los dos grupos de conejos. Los resultados de la cuantificación de MDA en espermatozoides de los conejos no presentaron diferencias estadísticamente significativas obteniendo un valor de  $p=0.537$ . Los resultados muestran un valor de MDA para el grupo con sobrepeso de  $0.017 \text{ nmol/mL MDA}$  ( $\pm 0.04$  error estándar) y el grupo normopeso presentó  $0.028 \text{ nmol/mL}$  de MDA ( $\pm 0.10$  error estándar). Se utilizó el error estándar debido a la dispersión que presentaron los datos, y así, hacer una apreciación más adecuada en el gráfico 3.

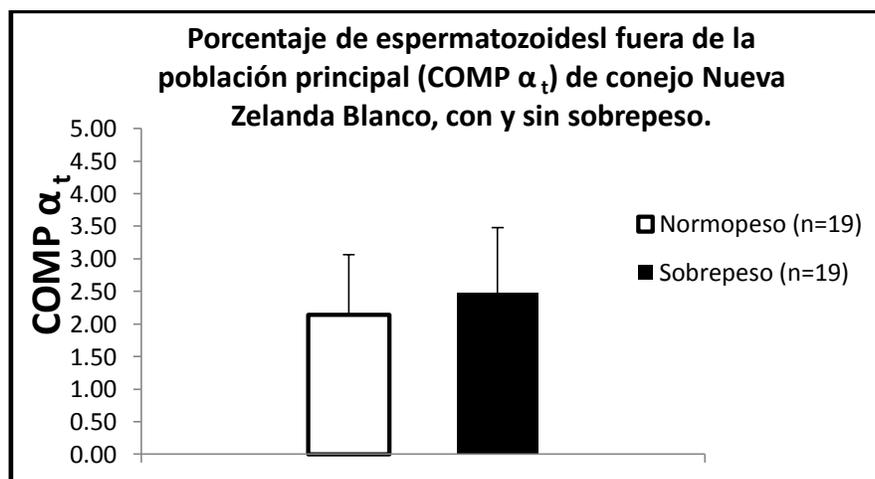


**Gráfico 3.** Resultados de cuantificación de MDA en muestras de conejos con sobrepeso y normopeso, se presenta el error estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos con una  $p=0.537$ .

#### 9.4. Daño al ADN determinado con naranja de acridina por citometría de flujo

Los resultados del análisis de los datos obtenidos del citómetro de flujo (FACScan de BD) con la técnica de tinción por naranja de acridina se expresan en el gráfico 4. Para el presente análisis se calculó el  $COMP \alpha_t$  que es el parámetro que analiza el porcentaje de espermatozoides fuera de la población principal tendientes a la fluorescencia roja (ADN dañado) y que se calculó utilizando la fórmula de: (número de células tendientes a la fluorescencia roja x 100)/ el número total de células analizadas.

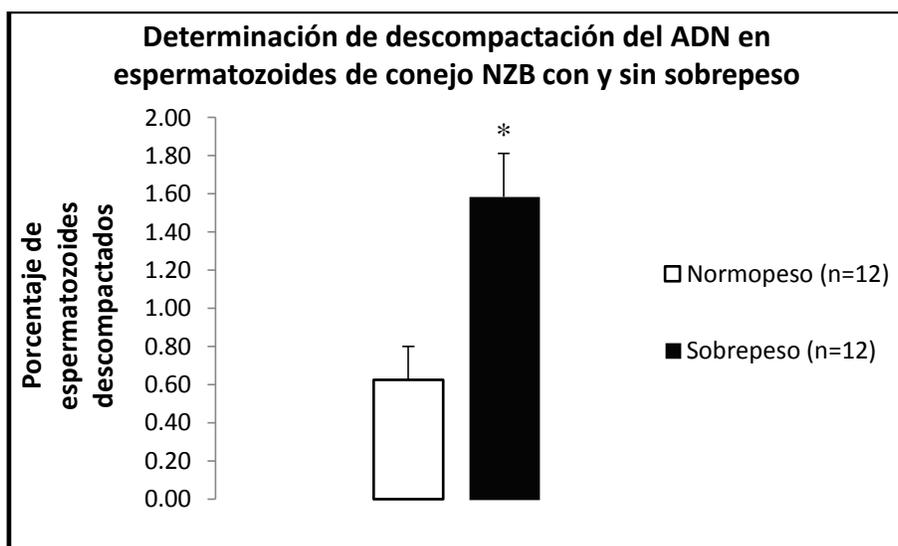
Los resultados presentaron un  $COMP \alpha_t$  de  $2.14 \pm 0.92$  para el grupo normopeso y del  $2.48 \pm 1.06$  en el grupo sobrepeso, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.883$ ) entre los grupos.



**Gráfico 4.** Determinación del daño al ADN en espermatozoides de los conejos, con y sin sobrepeso. Las barras representan el promedio  $\pm$  DS del  $COMP \alpha_t$  (porcentaje de espermatozoides fuera de la población principal tendientes a la fluorescencia roja (ADN dañado)). No se encontraron diferencias ( $p=0.883$ ) entre grupos. La n total fue de 38 determinaciones, 19 por grupo.

### 9.5. Descompactación del ADN determinado con azul de anilina

La descompactación del ADN nuclear se cuantificó con la técnica de azul de anilina, siendo los núcleos con mayor contenido de lisina los que dan positivo a esta tinción y dado que las histonas tienen un gran contenido de lisina puede inferirse que no hubo un adecuado cambio de estas histonas por las protaminas características de un núcleo espermático compactado. Los resultados (Gráfico 5) muestran una diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $p=0.002$  a favor (aumento) del grupo de conejos con sobrepeso presentando  $1.58 \% \pm 0.23$  con respecto al grupo normopeso de  $0.63 \% \pm 0.18$ .



**Gráfico 5.** Resultados de la cuantificación de la descompactación del ADN con azul de anilina en muestras de conejos con sobrepeso y normopeso, se presenta el promedio con desviación estándar del porcentaje de descompactación.. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (\*) entre grupos con una  $p=0.002$ .

## 10. DISCUSIÓN

Los reportes de la literatura especializada correlacionan al sobrepeso y la obesidad con la disminución de la calidad espermática y la fertilidad masculina. Sin embargo, la mayoría de los reportes y estadísticas surgen de estudios cuyos datos se obtienen de clínicas de fertilidad utilizando una estricta selección de los individuos con criterios de inclusión específicos, dando como resultado que el muestreo no corresponde a la población. Solo los individuos que ya presentan un problema reproductivo son considerados, y de estos, los que presentan obesidad, fueron tomados en cuenta para estudios de la relación de la obesidad con la reproducción masculina, encontrando que son estos individuos los que tienen un mayor estado de afectación en la calidad espermática, con respecto a un grupo de hombres que no presentaron problemas reproductivos (Hammoud y col., 2008; Fariello y col., 2012).

Por otro lado, en estudios que utilizan modelos animales de obesidad, se encuentran al conejo, la rata, y ratón. En ratones con una dieta alta en grasa, se logra la obesidad y a su vez, una disminución en la movilidad y aumento en la fragmentación del ADN espermático (Bakos y col. 2010); por otro lado, en estudios hechos por Viguera-Villaseñor y colaboradores (2009), se reportan en ratas Sprague-Dawley macho, sometidas a una dieta alta en grasa, que solo el 50% de los animales se les pudo inducir obesidad, lo que implica un componente de predisposición genética al aumento de peso y obesidad, así mismo reportan que el aumento de peso en el grupo de la dieta alta en grasa fue de 20% y que la acumulación de grasa en la zona del mesenterio y el epidídimo fue mayor en los individuos de la dieta alta en grasa. En ratas Long-Evans sometidas a una dieta alta en grasa, se registró un aumento del 20 % en el peso de las ratas con dieta hipercalórica en comparación con las de dieta normal, la categoría de sobrepeso es considerada como el aumento de peso en el intervalo de 10 al 25 % (Woods y col., 2003).

Con los estudios que se han reportado en conejo, por un lado, se tiene el reporte de Saez Lancellotti y colaboradores (2013), donde usando una dieta alta en colesterol encuentran una disminución en el volumen seminal, conteo espermático, movilidad, así como, un aumento en

las anormalidades espermáticas; pero no inducen sobrepeso/obesidad en conejos, si no que inducen un estado de hipercolesterolemia y en esto basan su trabajo debido a que la inducción de sobrepeso u obesidad en conejo es difícil de lograr. Por otro lado, Zhao y Col, 2007 reportaron el incremento del 22% en el peso de conejo utilizando una dieta alta en grasa, proponiendo que puede ser usado como un modelo adecuado para desarrollar estudios de sobrepeso y obesidad, y que estos estudios pueden ser útiles para la problemática del estudio en seres humanos debido a una similitud entre las características del sistema inmune que comparten con el humano (Zhao y col, 2007), pero por un lado en este reporte no definen sobrepeso u obesidad, y por otro, tampoco hacen la correlación entre sobrepeso/obesidad y ninguno de los parámetros reproductivos.

En el presente estudio se obtuvo un sobrepeso en conejos NZB del 22%, y de acuerdo a lo que se ha reportado en otras especies, y considerando al sobrepeso como una ganancia de peso de entre el 10 y el 25% (Woods y col., 2003), se puede decir que nuestro grupo experimental de conejos NZB cae en la categoría de sobrepeso.

De acuerdo con los reportes de los parámetros espermáticos en grupos de humano, rata y ratón con sobrepeso existen resultados controversiales, donde en algunos la concentración y la movilidad espermática, se encontraron disminuidas (Strain y col., 1982; Jensen y col., 2004; Kort y col., 2006; Hammoud y col., 2008; Bakos y col., 2011; Tunc y col., 2011 y Fariello y col., 2012), y en la morfología espermática se encontró un aumento en las anormalidades (Hammoud y col., 2008; Shayeb y col., 2011; Kort y col., 2006). Por lo que nuestros datos se contraponen con los reportes antes mencionados. Sin embargo, concuerdan con lo reportado por otros autores (Qin y col.; 2007; Pauli y col. 2008; Aggerholm y col. 2008 y Chavaro y col. 2010), donde no reportan cambios en los parámetros espermáticos como: concentración, movilidad y morfología espermática con respecto al grupo de sobrepeso en humano, rata y ratón. En el caso del presente estudio usando como modelo al conejo NZB, y en los casos reportados antes, usando especies como rata, ratón y humanos.

Lo anterior se puede explicar con los resultados obtenidos en el presente trabajo con el conejo NZB, ya que en el grupo de sobrepeso no se encontró un aumento en el daño a membranas, ni fragmentación del ADN, lo que pudiera haber provocado una disminución en los diferentes parámetros espermáticos, debido a los efectos del sobrepeso en estas moléculas. Otra posible explicación de los resultados obtenidos pudiera ser que un mayor control en las variables estudiadas esté correlacionada con el efecto sobre los parámetros estudiados. Debido a este problema son de suma importancia trabajos como el presente que colaboren a determinar el efecto de las diversas variables que puedan estar afectando a los parámetros que usualmente son estudiados.

Aun cuando se ha reportado en humano, que la acumulación de grasa en grandes cantidades, o sus productos, pueden generar estrés oxidante (Dandona y col., 2005; Davi y Falco, 2005), el desbalance entre las ERO y los antioxidantes a nivel celular está asociado con el sobrepeso y la obesidad (Ferranti y Mozaffarian, 2008). Se ha demostrado que el aumento en el tejido adiposo y estrés oxidante se relaciona con la producción y aumento en las señales inflamatorias, regulación de las adipocinas y resistencia a la insulina (Ferranti y Mozaffarian, 2008 y Alfadda y Sallam, 2012), debido a que la obesidad es catalogada como un estado de inflamación crónico, provocando el aumento de número y la actividad de monocitos y macrófagos en los tejidos (Das, 2001; Tunc y col., 2011). Mediadores activos como las citosinas, adipocinas y moléculas quimiotácticas aumentan el estado crónico de inflamación y provocan una excesiva producción de ERO (Alfadda y Sallam, 2012). Por lo tanto, el estado de sobrepeso/obesidad puede provocar la oxidación de lípidos, aminoácidos y carbohidratos, así como también daño en el ADN a los espermatozoides (Kasturi y col., 2008).

Los espermatozoides de hombres infértiles muestran gran daño oxidante en comparación con los de hombres fértiles (Kodama y col., 1997) y estas observaciones son confirmadas por estudios *in vitro* con la generación endógena de ERO que aumentan la fragmentación del ADN en espermatozoides (Aitken y col., 1998; Twigg y col., 1998). Kasturi y colaboradores (2008) concluyen que el estrés oxidante puede resultar en lipoperoxidación en la membrana del espermatozoide y que este daño puede disminuir su movilidad por una alteración en el cambio

de los iones de la membrana, y que al ser necesarios para la movilidad espermática, esta puede verse afectada (Rao y col, 1989).

Sin embargo, como se mencionó, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, creemos que la razón por la que no se encontraron diferencias en los parámetros espermáticos, es porque el estado de sobrepeso en conejos NZB, no provocó problemas de lipoperoxidación y daño al ADN de los espermatozoides. Lo anterior puede deberse, a que, de acuerdo con Cota (2014), el estado de sobrepeso en el conejo NZB, provocó un aumento en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) en espermatozoides, esto pudiera estar actuando de manera conjunta para metabolizar el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Con base en la actividad enzimática presente en el conejo NZB se puede decir que el espermatozoide está interactuando con este sistema en contra de las ERO y pudiera ser la razón por la que no se presenta un aumento de la lipoperoxidación del espermatozoide, así como tampoco, fragmentación del ADN en conejos NZB con sobrepeso. Se ha encontrado que el potencial redox del microambiente asociado con los espermatozoides y los mismos espermatozoides del conejo NZB, deben estar adecuadamente regulados a través de la formación/eliminación de las ERO.

Se puede mencionar que el daño al ADN nuclear del espermatozoide de conejo NZB fue bajo. Los resultados recabados en la fragmentación del ADN de los grupos de conejos con normopeso y con sobrepeso fueron bajos con respecto a lo reportado para otras especies, sin embargo la magnitud del resultado obtenido es semejante a lo reportado por Gogol y cols (2002) para el Conejo NZB y en las mismas edades de los individuos (28 meses aproximadamente). Podemos decir que el estado de fragmentación de nuestros grupos de conejos fue bajo y que en lo que respecta al estado de conservación del ADN nuclear espermático del conejo NZB, se le considera de buena calidad. Love (2005) determinó el daño al ADN de caballo, encontrando una relación negativa entre la fragmentación del ADN y la capacidad fertilizante (pc). Argumentan que el daño al ADN no está correlacionado directamente en proporción con el pc del caballo, aunque, en esta especie es evidente el gran valor que presenta en el daño al ADN. Estos antecedentes dan la pauta para poder inferir, que

si bien, el estado de conservación del ADN es de suma importancia, también se puede deducir que es diferente en proporción entre especies.

Por otro lado, son muchos los autores que han reportado una relación directa entre el sobrepeso y la obesidad con respecto a la disminución en los valores de la calidad espermática, señalando como causas posibles, el aumento en la concentración de estradiol concomitante a la reducción de la testosterona (Teerds y col., 2011), y que dado que el proceso de espermatogénesis, espermiogénesis y maduración epididimaria son procesos dependientes de andrógenos (testosterona), estos procesos fisiológicos se ven afectados.

En el epidídimo, esta dependencia, radica, en que, la integridad funcional y la morfología del epidídimo son dependientes de andrógenos (testosterona) (Turner y col., 2003). Con la regulación de andrógenos, las células epiteliales del epidídimo producen diferentes proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y fosfolípidos (componentes del fluido del epidídimo) que se necesitan para la formación y la supervivencia de los espermatozoides. Los productos de secreción se liberan en el lumen del epidídimo colaborando así con el proceso de maduración espermática epididimaria (Bilinska y col., 2008).

Por lo anterior creemos que, a pesar de no haber encontrado una disminución en los parámetros espermáticos como: la concentración, movilidad y anormalidades morfológicas; al parecer el sistema redox pareciera estar protegiendo a los espermatozoides para evitar daños en membranas y el ADN. Inferimos que el proceso de maduración espermática epididimaria, en los conejos NZB en estado de sobrepeso, pudiera estar siendo afectada. Por un lado, Ruiz (2014), reporta que en estado de sobrepeso en conejos NZB encontró una disminución en la capacidad para llevar a cabo capacitación espermática, proceso que se adquiere en el epidídimo como parte del proceso de maduración (Bilinska y col., 2008). Por otro lado, con base en lo mencionado se apoya el resultado encontrado en el presente trabajo, donde hay aumento en el contenido de descompactación nuclear registrado en los espermatozoides obtenidos de conejos NZB con sobrepeso (a pesar de que el resultado es muy bajo; alrededor del 2 %, comparado con porcentajes reportados mayores al 30% en otras especies), ya que, además de la capacidad para capacitarse y llevar a cabo reacción acrosomal, también la

compactación nuclear del espermatozoide (Oliva, 2006), son procesos que se relacionan con la maduración espermática epididimaria. Este último punto requiere estudios más profundos en los procesos del epidídimo con el conejo NZB y con otras especies que puedan discernir el posible efecto del sobrepeso y la obesidad.

## **11. CONCLUSIONES**

Se logró la inducción del sobrepeso para el conejo NZB en edad adulta a través de la administración de un régimen alimenticio hipercalórico. Este sobrepeso no se correlaciona con deficiencias en la calidad espermática entre los grupos de normopeso y sobrepeso de los conejos de este estudio.

La compactación nuclear de los espermatozoides de conejos con sobrepeso se vio afectada presentando una disminución en la compactación nuclear.

La lipoperoxidación espermática no se vio afectada entre los grupos de normopeso y sobrepeso.

No se presentaron diferencias en la fragmentación del ADN entre los grupos de normopeso y sobrepeso.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken R. J., Gordon E., Harkiss D., Twigg J. P., Jennings Z., Irvine D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 59:1037–1046.
- Angelo A. J. St. (1996). Lipid oxidation on foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 36:175-224.
- Alba Z. L. E., Monzón B.G., Peláez Y. L. A., y Quintero P. Y. (2000). Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 19:202-205.
- Alfadda A. A. y Sallam R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2012, Article ID 936486, 14 pages doi:10.1155/2012/93648
- Álvarez G. J. y Storey T. B. (1982). Spontaneous Lipid Peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: Its effects on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27:1102-1108.
- Alvariño M. R. (1993). Control de la reproducción en el conejo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Arenas-Ríos, E. (2004). Participación de las enzimas anti-substancias reactivas de oxígeno (SRO) en las funciones testiculares y epididimarias en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis de maestría en Biología Experimental.
- Arenas Ríos, E. (2009). Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas.

- Bakos H. W., Mitchell M., Setchell B. P. y Lane M. (2010). The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *International Journal of Andrology*. 30:402-410.
- Bilinska B., Wiszniewska B., Kosiniak Kamysz K., Kotula-Balak M., Gancarczyk M., Hejmej A., Sadowska J., Marchlewicz M., Kolasa A. y Wenda-Różewicka L. (2006). Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymidis. In vivo and in vitro approaches. *Biol Reprod* 6:43–158.
- Chen C. S., Chao H. T., Pan R. L., y Wei Y. H. (1997). Maintenance of human sperm motility and prevention of oxidative damage through co-culture incubation. *Andrology*. 29:227-233.
- Cota Magaña, A. I. (2014). Actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa , en el espermatozoide y líquido seminal de conejo nueva zelanda y su relación con el sobrepeso. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal.
- Dandona P., Aljada A., Chaudhuri A., Mohanty P. y Garg R. (2005). Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 111:1448–1454.
- Darzynkiewicz Z., Juan G. y Srouf E. F. (2004). Differential staining of DNA and RNA. En: *Current Protocols in Cytometry*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 7.3.1-7.3.16.
- Das U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 17:953–966.
- Davi G., y Falco A. (2005). Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus*. 14:760–764.
- Desikan R., Hancock J., y Neill S. (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules. pp. 169–191. In: N. Smirnoff (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 302 p.

- Du Plessis S. S., Cabler S., McAlister D. A., Sabanegh E. y Agarwal A. (2010). The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol.* 7, 153-161.
- Eddy E. M. (2006). The spermatozoon. En: E Knobil y DJ Neill, *Physiology of reproduction*, tercera edición. Academic Press. EUA, Pp 3-54.
- El-Habbato H. H. E., Radwan A. A., y El-Menoufy A. A. (1984). Testicular and epididymal sperm reserves in three breeds of rabbits under subtropical conditions. *Egypt poul Sc.* 4:63-80.
- Fariello R. M., Pariz J.R., Spaine D.M., Bertolla R.P. y Fraietta R. (2012). Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *British Journal of Urology International*, 110: 863-867.
- Ferranti S. y Mozaffarian D. (2008). The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clinical Chemistry* 54:6. 945–955.
- Flowers N.I. y Miles P. R. (1991). Alterations of pulmonary benzo[a]pyrene metabolism by reactive oxygen metabolites. *Toxicology.* 68:259-74.
- Gogol P, Bochenek M y Smoraż Z. (2002). Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod Dom Anim* 37, 92–95.
- Günter t., Vormann J., Höllriegl V., Disch G. y Classen H. G. (1992). Role of lipid peroxidation and vitamin E in magnesium deficiency. *Magnesium-bull* 14 : 57-66.
- Haslam D. W. y James W. P. (2005). Obesity. *The Lancet.* 366:1197–1209.
- Kanda Y., Hinata T., Kang S. W. y Watanabe Y. (2011). Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 89: 250–258.
- Kasturi S. S., Tannir J., y Brannigan R. E. (2008). The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl.* 29:251–9.

- Kodama H., Yamaguchi R., Fukuda J., Kasai H. y Tanaka T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*;68:519–524.
- Konigsberg F. M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Ediciones, El Manual Moderno, México D.F.
- Kort H. I., Massey J. B., Elsner C. W., Mitchell-Leef D., Shapiro D. B., Witt M. A. y Roudebush W. E. (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Androl*, 27:450-452.
- Love C. C. (2005). The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reprod Sci* 89:39–45.
- Macedo A. P. y Miguel O. (1986). Puberty in N. Z. W. rabbits. *Rev. da Fac. de Medicina Vet. e Zootecnia, Univ. De Sao Paulo*. 23: 55-67.
- Magapor. Manual de inseminación artificial en cunicultura. Consultado en: <httpwww.magapor.comimagesAyuda4> en noviembre 2012.
- Meredith A. (2012). Is Obesity a problem in pet rabbits? *Vet Rec* 171: 192-193.
- Michalakis K., Mintziori G., Kaprara A., Tarlatzis B. C. y Goulis D. G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*. 62:457-78.
- Nair V. y Turner G. (1984). The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids*.19:804-805.
- Neil K. N., Lamirande E., y Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril*. 58:809-816.

- Osawa C. C., De Felício P. E. y Gonçalves L. Ap. G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Quim. Nova.* 28:655-663.
- Quintero P. W., Mallea S. L., Machado C.A., Llopiz J. N., Céspedes M. E., Monzón B. G. y Yépes O. S. (2000). Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 19:183-185.
- Rao B., Soufir J. C., Martin M. y David G. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 24:127–134.
- Rivlin J., Mendel J., Rubinstein S., Etkovitz N. y Breitbart H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 70:518–522.
- Ruiz-Valderrama, L. (2014). Efecto del sobrepeso sobre la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de conejo nueva Zelanda blanco. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal.
- Saez-Lancellotti T. E., Boarelli P. V., Romero A. A., Funes A. K., Cid-Barria M., Cabrillana M. E., Monclus M. A., Simon L., Vicenti A. E. y Fornés M. W. (2013). Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit. *PLoS ONE* 8: e52386. doi:10.1371/journal.pone.0052386
- Sellami A., Chakroun N., Zarrouk S. B., Sellami H., Kebaili S., Rebai T. y Keskes L. (2013). Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: Useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. Hindawi Publishing Corporation. *Advances in Urology.* Article ID 578631, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/578631>
- Sweet H., Pearson A. J., Watson P. J. y German A. J. (2013). A novel zoometric index for assessing body composition in adult rabbits. *Vet Record.* 173: 369.

- Swiestra E. E. y Foote R. H. (1965). Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *An. J. Anat.* 116:401-412.
- Teerds K.; Rooij de D. G. y Keijer J. (2011) Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Human reproduction updates* 17: 667-683.
- Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 14:243-58.
- Tunc O., Bakos H. W. y Tremellen K. (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia.* 43:121-128.
- Turner T. T., Bomgardner D., Jacobs J. P. y Nguyen Q. A. T. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125:871-878.
- Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D. S. y Aitken R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod.* 13:1429–1436.
- Vigueras-Villaseñor R. M., Rojas-Castañeda J. C., Chávez-Saldaña M., Gutiérrez-Pérez O., García-Cruz M. E., Cuevas-Alpuche O., Reyes-Romero M. M. y Zambrano E. (2011). Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 113:214-20.
- Villaverde A. I. S. B., Fioratti E. G., Penitenti M., Ikowa M. R. V., Tsunemi M. H., Papa F. O. y Lopes M. D. (2013). Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology.* 80:730-737.
- WHO. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5ta edición. World Health Organization, Suiza.

Woods S. C., Seeley R. J., Rushing P. A., D'Alessio D. y Tso P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 133: 1081–1087.

Zhao S., Chu Y., Zhang C., Lin Y., Xu K., Yang P., Fan J. y Liu E. (2007). Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *Animal Physiol Animal Nutri.* 92:105-111.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00018

Matricula: 2123801241

DAÑO A LA INTEGRIDAD DEL ADN Y LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO CAUSADOS POR SOBREPESO

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de enero del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DRA. EDITH CORTES BARBERENA
- DRA. GISELA FUENTES MASCORRO
- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

Bajo la Presidencia del primero 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:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ALEJANDRO SOTO CASTRUITA

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, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Alejandro Soto C*

ALEJANDRO SOTO CASTRUITA  
ALUMNO

REVISÓ

*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

*[Signature]*

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

*[Signature]*

DRA. EDITH CORTES BARBERENA

VOCAL

*[Signature]*

DRA. GISELA FUENTES MASCORRO

SECRETARIO

*[Signature]*

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA