



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
ANIMAL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA POR:

BIÓL. EXP. LORENA RUIZ VALDERRAMA

**EFECTO DEL SOBREPESO SOBRE LA CAPACITACIÓN
Y REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES
DE CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO**

COMITÉ DE TUTORES:

Codirectores:

Dra. Edith Arenas Ríos

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Asesor:

Dr. Miguel Ángel León Galván

Lugar de realización:

Iztapalapa, México D.F. a 1 de Julio del 2014

COMITÉ DE TUTORES

Codirectores:

Dra. Edith Arenas Ríos

Adscripción: Departamento en Biología de la Reproducción.

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).

Correo electrónico: editharenas2000@yahoo.com.mx

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Adscripción: Departamento de Biología de la Reproducción.

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).

Correo electrónico: deme@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Miguel Ángel León Galván

Adscripción: Departamento de Biología.

Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos (AS-112)

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: león@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN

Dr. Alejandro Avalos Rodríguez

Adscripción: Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Área: Ecodesarrollo de la Producción Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Correo electrónico: avalosr@correo.xoc.uam.mx

Dr. Humberto González Márquez

Adscripción: Departamento de Ciencias de la Salud.

Área: Biología Celular.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: hgm@xanum.uam.mx

Dra. Gisela Fuentes Mascorro

Adscripción: Profesor Titular del Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal.

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

Correo electrónico: lirauabjo@gmail.com

Dr. Miguel Ángel León Galván

Adscripción: Departamento de Biología, UAM-I

Laboratorio de Biología y Ecología de Mamíferos (AS-112)

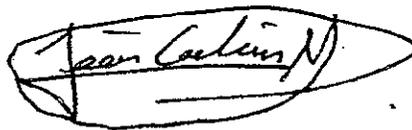
Correo electrónico: leon@xanum.uam.mx

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal Asistida (S-234) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Este proyecto contó parcialmente con el financiamiento de beca UAM y parcialmente beca CONACyT con el número: 302940. Además contó con el apoyo y financiamiento por parte del proyecto: Factores celulares, Genéticos y Endocrinos relacionados con Alteraciones en la Maduración Espermática, UAM-I-CA-136, SEP-PROMEP.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto del sobrepeso sobre la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de conejo Nueva Zelanda blanco" con fecha 1 de Julio 2014.

Presidente: Dr. Miguel Ángel León Galván



Secretario: Dra. Gisela Fuentes Mascorro



Vocales: Dr. Alejandro Avalos Rodríguez y Dr. Humberto González Márquez



Dedicatorias y Agradecimientos

Dedico la presente tesis a todas aquellas personas que me han acompañado en el camino de la formación científica, a mis profesores de la maestría y a los miembros de mi comité tutorial. Al Dr. Miguel Ángel León Galván que, sin él, simplemente no hubiera sido posible integrarme a este proyecto, porque me escuchó, me brindó su confianza, aclaró dudas y me apoyó todo este tiempo. Al Dr. Demetrio Ambríz García quién estuvo guiándome en una parte importante de mi trabajo, que me brindó sus conocimientos sin reservas y que estuvo conmigo todas las veces que requería de su ayuda. A la Dra. Edith Arenas Ríos que más que mi tutora ha sido mi maestra y amiga, le agradezco el tiempo, la comprensión, los consejos, los conocimientos y las oportunidades que me ha brindado.

Les dedico también a mis compañeros de trabajo, en especial a Ahiezer Rodríguez Tobón, quien me compartió sus conocimientos, me guió, fue mi acompañante durante todos esos días de trabajo y, además, también se convirtió en un gran amigo.

A mis seres queridos, mi familia y mis amigos, que me brindaron su apoyo, confianza, paciencia y sabiduría. A mi madre y mi padre que son los pilares de mi hogar, la fuerza y ejemplo para lograr cualquier cosa que antes haya sido una meta, propósito o sueño. A mis amigos que lograron que hicieran que mi poco tiempo libre fuera tan grato y que celebraron mis logros. A mi pareja y amigo que me ha colmado de felicidad y ha brindado su apoyo.

A mis sinodales que dedicaron tiempo y amablemente contribuyeron en el mejoramiento de esta tesis.

Gracias.

Lorena Ruiz Valderrama

Índice

Dedicatorias y Agradecimientos.....	v
Índice.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. Estructura del espermatozoide.....	1
1.2. Maduración espermática epididimaria.....	3
1.3. Capacitación espermática.....	5
1.4. Reacción acrosomal.....	9
2. Antecedentes.....	12
2.1. Sobrepeso y obesidad.....	12
2.2. Metabolismo del sobrepeso y obesidad.....	15
2.3. Sobrepeso y obesidad en la reproducción masculina.....	16
2.4. Modelos animales de sobrepeso y obesidad.....	20
3. Justificación.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. General.....	22
4.2. Específicos.....	22
5. Hipótesis.....	22
6. Material y métodos.....	23
6.1. Reactivos y soluciones.....	23
6.2. Material biológico.....	23

6.3.	Conformación de grupos e Inducción de Sobrepeso	23
6.4.	Condición de alojamiento de los conejos	24
6.5.	Evaluación básica de los espermatozoides	26
6.5.1.	Determinación de la movilidad en masa	26
6.5.2.	Determinación de la concentración espermática	27
6.5.3.	Determinación del porcentaje de Movilidad espermática	27
6.5.4.	Determinación de la viabilidad espermática	27
6.5.5.	Determinación de la Morfología espermática	27
6.6.	Evaluación de la Fisiología de los espermatozoides	28
6.6.1.	Capacitación	28
6.6.2.	Reacción acrosomal	28
6.7.	Análisis estadístico	30
7.	Resultados	31
7.1.	Inducción de sobrepeso	31
7.2.	Análisis Seminológico y Espermatobioscópico	32
7.3.	Capacitación	34
7.4.	Reacción Acrosomal	34
8.	Discusión	37
9.	Conclusiones	45
10.	Bibliografía	46

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del sobrepeso en los parámetros espermatozoides y en procesos fisiológicos como la capacitación espermática y la reacción acrosomal *in vitro* en espermatozoides de conejo Nueva Zelanda blanco. La dieta hipercalórica proporcionada indujo un estado de sobrepeso al grupo experimental, al presentar un aumento de peso del 18.5% más comparado con el grupo control. Al evaluar la calidad seminal se pudo observar que no fue afectada la movilidad masal, que fue de 2 y 3 (en escala de: 0 a 3), lo que se consideró valores máximos de movilidad masal y de buena calidad seminal; la viabilidad en el grupo con sobrepeso fue del 60 y del 75% en el de peso normal; la movilidad progresiva, el grupo de sobrepeso no presentó diferencia significativa con el grupo de peso normal (7 vs 65%, respectivamente); la concentración espermática fue de 400 vs 500 X10⁶ espermatozoides/ml. El volumen seminal mostró ligeros cambios (0.6 y 0.7ml respectivamente). El sobrepeso afectó la morfología espermática. El porcentaje de anomalías en el grupo normopeso fue de 19.5 ± 4.9 y 35 ± 13.3 en sobrepeso. La capacitación espermática *in vitro* disminuyó a causa del sobrepeso, observándose 25% en el grupo normopeso vs 15% en el grupo testigo. La variable que más se modificó fue la reacción acrosomal espontánea, que aumentó hasta 39.2% mientras que la reacción acrosomal inducida disminuyó en el grupo de sobrepeso 25.1% siendo las de los testigos 40.5%. En conclusión, el sobrepeso en conejos Nueva Zelanda aumenta el porcentaje de anomalías, además de que afecta los procesos de capacitación y reacción acrosomal.

ABSTRACT

The target for the present study was to evaluate the effect of overweight in seminal parameters and physiological processes such as sperm capacitation and acrosome reaction *in vitro* in white New Zealand rabbit sperm. The provided caloric diet induced overweight in the experimental group, presenting a rate of 18.5% more weight than the control group. When semen quality was evaluated, it can be observed that the basal motility was not affected by overweight, because the values in the two groups were 2 and 3, which were considered the maximum values of basal motility and good seminal quality; the sperm viability was not altered, the overweight group had a tendency to decrease at a rate of 60%, against 75% of the normal weight group. The progressive motility was not altered by overweight. The overweight group was similar to normal weight group, 70% and 65% percentage respectively; sperm concentration was between 400 and 500 million sperm per milliliter. Seminal volume showed slight differences, 0.6ml and 0.7ml respectively. The sperm morphology was affected by overweight. The abnormalities percentage was 19.5 ± 4.9 in control group and 35 ± 13.3 in overweight group. Sperm capacitation is altered because of overweight, the percentage of capacitated sperm decreased; the value in the normal weight group was 25% and 15% overweight. The spontaneous acrosome reaction increase excessively because normal weight group was 39.2% and induced acrosome reaction decreased in overweight group 25.1%. Which lead us to conclude that overweight in New Zealand rabbits increase the abnormalities percentage and affect the capacitation and acrosome reaction.

1. Introducción

Para comprender el efecto del sobrepeso y la obesidad en la reproducción masculina se ha considerado hablar de la estructura del espermatozoide, además, del proceso de maduración que experimenta en el epidídimo para obtener su capacidad fertilizante, y de la capacitación y reacción acrosomal, dos eventos primordiales que ocurren previos a la fertilización del ovocito. Posteriormente como parte de los antecedentes, se habla del sobrepeso y la obesidad, como se ha definido y qué relación directa existe con la infertilidad masculina.

1.1. Estructura del espermatozoide

El espermatozoide es una célula especializada con características funcionales y estructurales que le permite portar y proporcionar el genoma masculino al ovocito. Las estructuras principales del espermatozoide son la cabeza y el flagelo (Figura 1). La cabeza del espermatozoide se subdivide, a su vez en: núcleo, acrosoma, estructuras citoesqueléticas y citoplasma. El núcleo contiene la cromatina, muy condensada, la forma y tamaño del núcleo de la célula germinal del macho se reorganiza completamente observándose varios estados de compactación de la cromatina (Eddy, 2006). En la espermatida elongada la cromatina se condensa: las histonas se reemplazan por proteínas muy básicas específicas del testículo, las protaminas (Hecht, 1998). Esto se relaciona con el desarrollo de elementos, como la teca perinuclear, el acrosoma, proteínas y filamentos del citoesqueleto. El remodelamiento correcto de la cromatina es necesario para una espermatogénesis normal, estabilizando la forma y estructura nuclear. El remodelamiento anormal de la cromatina resulta en una espermiación fallida, ocasionando un núcleo esférico y una ausencia del acrosoma en la cabeza del espermatozoide (Dadoune, 1995; Lee *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000; Steger *et al.*, 2001).

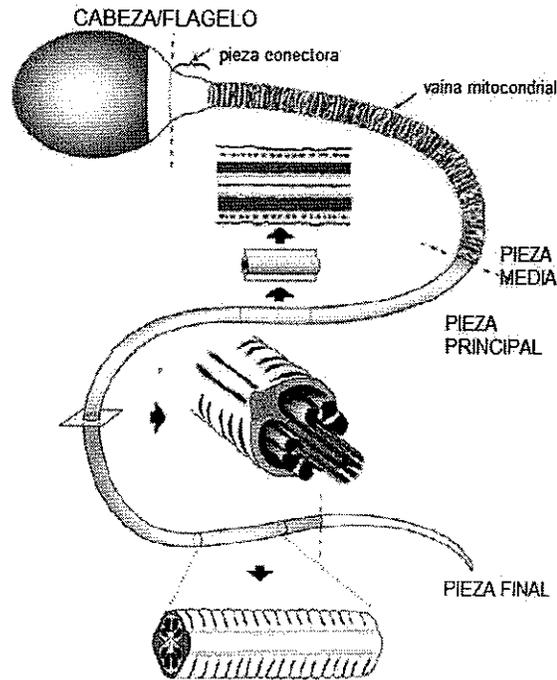


Fig. 1 Estructura general de un espermatozoide de mamífero (Eddy, 2006).

El acrosoma es una estructura conservada en organismos de fertilización interna, ya que en los de fertilización externa no hay acrosoma, pero comienza su diferenciación durante la espermiogénesis, se sintetiza desde los espermatocitos en paquíteno. El acrosoma consiste de dos segmentos, la capa acrosomal o el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial o acrosoma posterior. La membrana acrosomal interna limita con la parte anterior de la membrana nuclear externa (Eddy, 2006).

Normalmente, la región anterior del acrosoma es excitada cuando el espermatozoide pasa a través de las células del cumulus o interactúa con la zona pelúcida (reacción acrosomal), la parte ecuatorial o parte posterior es retenida después de la exocitosis y se incorpora al ovocito después de la fertilización (Manandhar y Toshimori, 2001).

El acrosoma está lleno de enzimas hidrolíticas (Tulsiani *et al.* 1998). Las principales son la hialuronidasa y la acrosina. La primera hidroliza el ácido hialurónico de la matriz extracelular, que une a las células del cumulus alrededor de los ovocitos. El espermatozoide penetra el cumulus ooforus por su liberación hidrolizando el ácido

hialurónico, y dispersando las células del cumulus (Zaneveld, 1982). La segunda es una enzima proteolítica parecida a la tripsina, que se involucra en la disolución y penetración de la zona pelúcida. Además de la acrosina y la hialuronidasa, el acrosoma del espermatozoide contiene otras enzimas glucolíticas y proteolíticas como aril sulfatasa A, neuroaminidasa, colagenasa, esterasa, glicosidasa, etc (Sutovsky *et al.*, 2004). El espermatozoide experimentará exocitosis cuando se una a la zona pelúcida del ovocito (Florman y Storey, 1982; Gerton, 2002).

Desde la pieza de conexión, el flagelo está dividido en la pieza intermedia, pieza principal y pieza final. Lo constituye un complejo central de microtúbulos, que forman al axonema, rodeado por fibras densas externas que se extienden desde el cuello hasta la pieza principal, la pieza media presenta mitocondrias (Eddy 2006).

La vaina fibrosa es un componente citoesquelético con una estructura única y localizada en la región de la pieza principal del flagelo, tienen conexión con las fibras densas, rodea al axonema y a la membrana plasmática. La función de la vaina fibrosa es darle flexibilidad al flagelo para poder tener movimiento (Si y Okuno, 1993).

1.2. Maduración espermática epididimaria

Cuando el espermatozoide sale del testículo, no tienen la capacidad para fertilizar al ovocito, la adquiere durante su paso por el epidídimo, por cambios que, en suma, se conocen como maduración espermática. Éste, se divide en 4 regiones anatómicas: el segmento inicial, la cabeza, el cuerpo y la cola-(Bedford, 1975; Orgebin-Crist *et al.*, 1975), las cuatro funciones principales del epidídimo son: el transporte de espermatozoides, desarrollo de la movilidad espermática, desarrollo de la habilidad fertilizante y la creación de un ambiente luminal que conduce al proceso de maduración a través de las actividades absortivas y secretorias del epitelio epididimario (Hinton, 2006; Orgebin-Crist, 2006; Robaire, 2006).

Los cambios más importantes que experimentará el espermatozoide durante el tránsito por el epidídimo son: la migración de la gota citoplasmica a lo largo del flagelo, la

reorganización acrosomal, cambios en la cromatina nuclear y cambios en la membrana plasmática (Hinton, 2006; Orgebin-Crist, 2006; Robaire, 2006).

La secreción y actividad del epitelio epididimario es, regionalmente, distinto y el sitio de secreción varía para cada proteína, y se produce bajo el control de andrógenos en el epidídimo y de estrógenos en los ductos eferentes. Las células epiteliales de los segmentos del epidídimo secretan glicerofosforilcolina, ácido siálico, proteínas específicas y compuestos de masa molecular baja, que, junto con la influencia de la composición bioquímica testicular, los espermatozoides y las hormonas (debido al suministro de andrógenos por la circulación sistémica y por el fluido de la red testicular), crean un microambiente que favorece que se lleven a cabo estos cambios (Turner *et al.* 2003).

La naturaleza de la superficie del espermatozoide, como son los fosfolípidos y proteínas de la membrana, se modifican, bajo la influencia del fluido luminal, mismo que contiene una gran variedad de secreciones como: electrolitos, enzimas y proteínas específicas, incluyendo a otras aún no caracterizadas derivadas de las células de Sertoli y de las células del epitelio del tracto genital. Algunas enzimas como las glucosidasas y glicosiltransferasas se han encontrado libres en el fluido epididimario o asociadas con la membrana plasmática del espermatozoide (Tulsiani *et al.*, 1998), y su deficiencia se relaciona con la infertilidad masculina (Corrales *et al.*, 2000).

Una cantidad pequeña de residuo citoplasmático se retiene en la gota citoplásmica en el espermatozoide después de la espermiación pero, ocasionalmente, este residuo excesivo permanece en el espermatozoide en el epidídimo. La gota se localiza en la región proximal del flagelo, en el testículo, y se mueve hacia la región distal cerca del anulus a la cola del espermatozoide (Toshimori, 2003), todos estos cambios no solo dependerán del paso por el epidídimo, si no que, en algunas especies como el murciélago, también son dependientes del tiempo (Cervantes *et al.*, 2008). En la mayoría de las especies de mamíferos, el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es de aproximadamente dos semanas, pero la duración exacta dependerá de cada especie (García, 2000).

De ese modo los espermatozoides presentes en el testículo y próximos al epidídimo son inmóviles e inmaduros (infértiles), sin embargo, aquellos en la parte distal del epidídimo son móviles y maduros (fértil) con el potencial para fertilizar, reconocer la zona pelúcida y con la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal (Lakoski *et al.*, 1978). Se ha reportado que la calidad seminal puede afectarse por el sobrepeso o la obesidad, provocado por un efecto negativo en la maduración epididimaria, pues, principalmente, se afecta la movilidad espermática (Martini *et al.* 2009).

El espermatozoide requiere de una serie de procesos maduracionales que comienza en el testículo, cuando se libera diferenciado, y termina en el tracto reproductivo femenino, después de que el espermatozoide ha sido eyaculado (Jha y Shivaji, 2002), es ahí donde ocurren dos eventos indispensables para fertilizar al ovocito: la capacitación y la reacción acrosomal.

1.3. Capacitación espermática

La capacitación es un proceso que implica cambios fisiológicos y bioquímicos que el espermatozoide experimenta, después de haber sido eyaculado y pasar a través del tracto reproductor femenino. Durante este tránsito puede haber modificaciones en la membrana, dadas por la eliminación y reorganización de algunas biomoléculas (Gadella, 2008). Los espermatozoides ya maduros son capaces de moverse activamente, pero todavía no pueden fertilizar hasta que experimenten capacitación, aparentemente el primer evento consiste en la separación o modificación de los factores descapacitantes (Eng y Oliphant, 1978; Reddy *et al.* 1982; Fraser *et al.* 1990; Han *et al.* 1990; Bonilla *et al.* 1996; García, 2000), principalmente se ha visto que se altera la distribución de glicolípidos de la membrana plasmática, hay eliminación de algunos componentes superficiales, que dejan al descubierto los receptores para progesterona, preparando al espermatozoide para la reacción acrosomal. Además también las proteínas y lípidos de membrana cambian, lo que permite que el espermatozoide sea capaz de unirse a la zona pelúcida (Gadella, 2008).

El sitio *in vivo* donde se lleva a cabo la capacitación del espermatozoide es en el tracto

reproductor femenino, completándose en el oviducto y/o útero, dependiendo de la especie. En mamífero, se han observado cambios característicos en la movilidad de los espermatozoides asociados con la etapa final de la capacitación, conocidos como hiperactivación, que es la movilidad vigorosa pero con poco desplazamiento progresivo, ahí los movimientos del flagelo son parecidos a un latigazo o abanicamiento, aumenta su movimiento lateral. La movilidad espermática es un parámetro importante, ya que posibilita el transporte hacia la región ampular de la trompa de Falopio y en la generación de la fuerza requerida para penetrar las capas de la célula de la granulosa y de la zona pelúcida del ovocito (Visconti *et al.*, 1998).

Nuevas técnicas bioquímicas han permitido establecer las condiciones necesarias para la capacitación de los espermatozoides *in vitro* (Teijeiro *et al.* 2011) (Figura 2). Esto ha permitido identificar los componentes que son necesarios para la capacitación. Varias moléculas del tracto genital femenino pueden inducir o regular la capacitación *in vitro* entre las que se encuentran: enzimas (ATPasas, neuraminidasa), glicosaminglicanos, catecolaminas, hormonas esteroides (progesterona, 17β - estradiol), proteínas (albúmina, lipoproteínas), nucleótidos cíclicos (AMPc, guanosin 5' monofosfato cíclico o GMPc), aminoácidos (taurina, hipotaurina, histidina), cationes mono (K^+ , Na^+ , Ca^+ , Zn^+) y divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+}) (Yanagimachi, 1994).

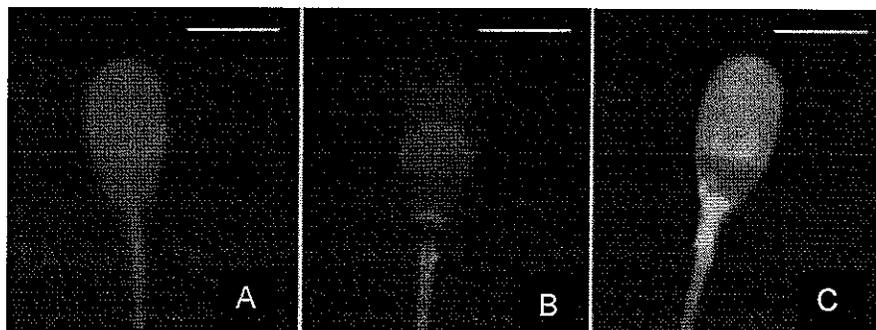


Fig. 2 Patrones obtenidos por tinción con CTC de espermatozoides de cerdo tratados con GBS (glicoproteína de unión a espermatozoide). A) No capacitado, B) Reacción acrosomal y C) Capacitado (Teijeiro *et al.* 2011).

Para la capacitación *in vitro* se utilizan espermatozoides de la cauda epididimaria o de eyaculado, utilizando medios que tengan composición similar a la del fluido oviductal. En muchos casos, los medios tienen sustratos energéticos como piruvato, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), proteína como albumina sérica bovina; bicarbonato y calcio (Visconti *et al.*, 1998).

Dentro de los componentes de los medios y sus funciones dentro de la capacitación están:

Albumina sérica bovina. Presente en el medio de capacitación para ratón, humano, cerdo y hámster. Colabora en la remoción del colesterol de la membrana plasmática, con el consecuente cambio de fluidez. Las proteínas de unión a colesterol, como las de alta densidad o las que transfieren lípidos, están presentes en el fluido oviductal o folicular. Se sabe, además, que el colesterol está presente en el semen humano y participa con efectos inhibitorios en la capacitación (Cross, 1998; Langlais and Roberts, 1985; Wolf *et al.* 1986).

Calcio. La concentración de calcio intracelular aumenta durante la capacitación, pasando de 70 a 250 mM. Actúa, además, como efector de enzimas involucradas en la transducción de señales (adenilato ciclasa, fosfodiesterasa nucleótido cíclica) (Baldi *et al.* 1991; DasGupta *et al.* 1993; Visconti *et al.* 1995).

Bicarbonato. La entrada de bicarbonato, provoca aumento del pH intracelular durante la capacitación; además, regula el metabolismo del AMP cíclico, estimula adenil ciclasa en el espermatozoide de mamíferos. Las concentraciones de bicarbonato son bajas en el epidídimo y altas en el plasma seminal y en el oviducto. La presencia de bicarbonato extracelular en el cerdo se correlaciona con la movilidad espermática, los cambios en la concentración de bicarbonato en el tracto reproductivo masculino y femenino juegan un papel importante en la supresión de la capacitación en el epidídimo y promoviendo la capacitación *in vivo* en el tracto reproductivo femenino (Brooks, 1983; Cross and Razy, 1997; Visconti, 1990).

También se conocen algunos efectores y mensajeros intracelulares involucrados en la

regulación de la capacitación como:

- *AMP cíclico*. Sus concentraciones aumentan durante la capacitación, en la reacción acrosomal aún es incierta su participación. Se ha demostrado solamente que la actividad de protein cinasa A (pk A) aumenta durante la capacitación espermática de ratón (Visconti *et al.* 1997; Yanagimachi, 1994).
- *Fosforilación de tirosinas*. Se han correlacionado con la capacitación espermática en ratón, bovino y humano y otras especies. Esta fosforilación regula funciones celulares como el crecimiento, el ciclo celular, el ensamble del citoesqueleto, intercambio iónico y actividad de receptores. El aumento en la fosforilación de tirosinas es dependiente de la presencia de bicarbonato, albumina sérica bovina y de calcio, la ausencia de estos componentes inhibe la fosforilación y, en consecuencia, la capacitación espermática. Además, se sabe que los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, no poseen la habilidad de capacitarse o de fertilizar, y no aumentan la fosforilación de tirosinas cuando se incuban bajo condiciones que conducen a la capacitación (Clark *et al.* 1994; Hunter, 1996; Yanagimachi, 1994).
- *pH*. El pH intracelular regula varios aspectos de la función espermática; sin embargo, los mecanismos que lo controlan no ha sido del todo estudiado Zeng *et al.* (1996) identificaron dos mecanismos por la salida de la célula cationes y aniones. Uno de ellos comparte las características con las células somáticas, que es dependiente de Na^+ y del intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. La segunda vía no requiere de iones extracelulares (Vredenburg-Wilberg and Parrish, 1995).
- *Potencial de membrana*. La capacitación se acompaña de hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide. Durante la capacitación el potencial de membrana es de -35 a -50 mV. Esta hiperpolarización está ligada a la permeabilidad al K^+ y puede relacionarse con una modulación inhibitoria. El potencial de membrana, puede modificar el estado de los canales de Ca^+ de una forma inactiva a activa, como consecuencia de la acción de un agonista inductor de despolarización (por ejemplo: la zona pelúcida) (Arnoult *et al.* 1996; Florman

et al. 1998).

- *Radicales libres.* La mayoría de los estudios relacionados abordan el papel que tienen estos en la lipoperoxidación membranal y en la viabilidad espermática. (Alvarez and Storey, 1982). Sin embargo, recientemente se estudio el papel del anión superóxido en la capacitación e hiperactivación (De Lamirande and Gagnon, 1995). Leclerc *et al.* (1997) encontró que las especies reactivas de oxígeno regulan positivamente la fosforilación de tirosinas de varias proteínas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aitken *et al.* (1995), quienes describieron también un aumento en la fosforilación de tirosinas, después de la estimulación por NADPH-oxidasa endógena y después de la adición de H₂O₂.
- *Glucosa.* Tiene tanto función estimulante como inhibitoria en la capacitación. En el espermatozoide de bovino, la glucosa inhibe la capacitación inducida por heparina, ejerciendo un efecto negativo en el metabolismo del AMP cíclico y reduciendo el pH intracelular. La glucosa es benéfica para la capacitación (Visconti and Kopf, 1998).

Una vez finalizado el proceso de capacitación, la reacción acrosomal se induce por un estímulo bioquímico, en el que también participa el ovocito.

1.4. Reacción acrosomal

La reacción acrosomal se lleva a cabo en el espermatozoide capacitado y cuando este puede unirse a la zona pelúcida del ovocito, provocando la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en varios sitios, liberando así, su contenido, en su mayoría de enzimas hidrolíticas (Gadella, 2008). Existen sitios de unión específicos entre la membrana acrosomal interna y las proteínas de la zona pelúcida, que conducirán al espermatozoide hasta el espacio perivitelino del ovocito, quedando en contacto la región ecuatorial con la membrana plasmática del ovocito (Frits *et al.*, 2001). De esta manera la cabeza del espermatozoide se interna en el citoplasma del gameto femenino.

En algunas especies, como ratón o hámster, los espermatozoides que ya se han capacitado pueden unirse a la zona pelúcida y después experimentar reacción acrosomal (Saling *et al.* 1979); en otras especies, como el conejo o el cobayo, los espermatozoides que previamente han realizado la reacción acrosomal son capaces de unirse a la zona pelúcida y permanecer ahí durante horas (Fleming y Yanagimachi, 1982; Kuzan *et al.*, 1984; García, 2000). El espermatozoide humano requiere la reacción acrosomal para poder atravesar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Singer *et al.*, 1985; Morales *et al.*, 1989; García, 2000).

Por otro lado, el espermatozoide que experimenta reacción acrosomal prematura no es capaz de penetrar el cúmulus del ovocito (Cherr *et al.*, 1986; Cummins y Yanagimachi, 1986) y pierde su potencial para fertilizar. Los espermatozoides pueden producir la reacción acrosomal de forma espontánea o en respuesta a estímulos, tales como proteínas de la zona pelúcida (ZP), líquido folicular o progesterona (Kim y Gerton, 2003). La reacción acrosomal inducida puede considerarse como un marcador de la capacitación ya que los espermatozoides no capacitados no estarán listos para llevar a cabo este proceso exocítico.

Utilizando la ZP fraccionada se ha podido conocer que la proteína ZP3, actúa como un agonista de los receptores de la membrana plasmática (Wasserman, 1988, 1991); además de que, a través de una cascada de transducción, se induce la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática (vesiculación). Asimismo, se demostró que eliminar las proteínas ZPA, ZPB y ZPC, disminuye o suprime la unión espermatozoide-ZP (Bleil y Wasserman, 1980; Ozgur *et al.*, 1998).

La reacción acrosomal, como la capacitación, son procesos que requieren de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Yanagimachi, 1994). La despolarización del potencial de la membrana plasmática (de -60mV a -20 mV) es una condición para que la zona pelúcida desencadene la reacción acrosomal (Leclerc y Kopf, 1999). Esto parece estar regulado por un canal catiónico poco selectivo; por la proteína G, misma que provocará un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa (Leclerc y Kopf, 1999); por la apertura de canales de Calcio dependientes de voltaje (Arnoult *et al.*, 1996) y por la

fosforilación de tirosinas, ya que está aumenta después de la unión con la zona pelúcida (Leyton y Saling, 1989). Algunas proteínas involucradas en este proceso son las proteínas SNARE (proteínas solubles en N-etilmaleimida, sensibles al factor de unión-receptor), mismas que están involucradas en la maquinaria de la fusión a la membrana y son responsables de la exocitosis acrosomal, además de las asociadas con vesículas (VAMP's), que se agregan en el extremo apical de la membrana acrosomal externa (Sorensen, 2005; Lam *et al.*, 2008). La reacción acrosomal también puede llevarse a cabo en ausencia de inductores naturales, usando el ionóforo A23187 (Florman and Storey, 1982; Aitken *et al.*, 1984; Byrd and Wolf, 1986). Este ionóforo induce la reacción acrosomal mediante el influjo de Calcio requerido y activando los mecanismos de señalización intracelular que controlan este influjo (Bailey and Storey, 1994). La reacción acrosomal inducida por esta vía, permite evaluar la capacidad fertilizante de un espermatozoide *in vitro* (Byrd and Wolf, 1986; Cummins *et al.*, 1991). Aitken *et al.* (1991). La progesterona es capaz de inducir la reacción acrosomal, promoviendo la entrada de Calcio, lo que es inhibido por las tirosin cinasas (Bonascorci *et al.*, 1998). Esto significa que la progesterona actúa vía fosforilación de tirosinas. Se sabe que el líquido folicular contiene progesterona (0.3 µg/ml), utilizándola *in vitro*, se puede inducir reacción acrosomal en varias especies de mamíferos. Además, se han reportado otros componentes para la regulación de la reacción acrosomal, en el caso del hámster, dos moléculas como DIDS y SITS, que actúan como bloqueadores del transporte de aniones, particularmente de bicarbonato y de sulfato y son capaces de inhibir la reacción acrosomal hasta en 50%.

Por otro lado, algunas de las técnicas que se han reportado para la evaluación de la reacción acrosomal son microscopia de luz, útil en aquellas especies que poseen acrosomas grandes (cobayo y hámster). Sin embargo, en muchos mamíferos, incluido el humano, el acrosoma es pequeño y difícil de visualizar, por lo tanto, se ha recurrido al uso de técnicas de tinción, marcaje con lectinas y marcaje con anticuerpos (Koehler, 1978; Talbot and Chacon, 1980; Wolf *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 1986). El ensayo fluorescente con clortetraciclina para determinar capacitación, originalmente se desarrollo para espermatozoide de ratón (Saling and Storey, 1979; Ward and Storey,

1984) y, posteriormente, en humano (Lee *et al*, 1987). Benoff *et al.* (1993) demostraron que modifica el patrón de unión a albumina sérica bovina manosiada y marcada con fluoresceína. En espermatozoides de humano, porcino, bovino, conejo, cobayo y murino, se ha utilizado la tinción de azul de Coomassie G-250 para observar espermatozoides con reacción acrosomal de manera eficiente (Larson y Miller, 1999; Pietrobón *et al.*, 2001). Una determinación rápida y que puede utilizarse en la mayoría de las especies de mamíferos.

2. Antecedentes

La obesidad es un problema de salud mundial que, recientemente, se ha relacionado con problemas de subfertilidad e infertilidad masculina. Sin embargo, aún no se conoce con certeza las causas que la provocan. Se ha relacionado, principalmente en humanos y otros mamíferos con sobrepeso/obesidad, con disminución en los parámetros de la calidad espermática, entre los que podemos encontrar: disminución de movilidad, concentración o daño en la estructura normal del espermatozoide.

Por lo tanto es necesario conocer las definiciones de estas condiciones de salud (sobrepeso/obesidad), su metabolismo y que se ha reportado acerca de sus efectos en la reproducción masculina.

2.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad son condiciones irregulares del organismo, que se generan por la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo, como resultado de la combinación de factores genéticos, alimentación inadecuada y falta de actividad física regular (Cachofeiro *et al.*, 2006). La obesidad es un problema muy importante a nivel mundial que ha aumentado rápidamente, alcanzando características de pandemia. Se considera que en los próximos años la mayor parte de la población será obesa o tendrá sobrepeso (Pi-Sunyer, 2002). La obesidad es un padecimiento crónico complejo de etiología multifactorial que se desarrolla por un desequilibrio entre la energía ingerida y la energía gastada, es decir, una acumulación anormal o excesiva de energía en forma

de grasa en el tejido adiposo (Blancas-Flores *et al.* 2010). El exceso de energía se almacena en los adipocitos, los cuales aumentan en tamaño, hipertrofia, o número, hiperplasia. Este desequilibrio es el resultado de la combinación de varios factores fisiológicos, psicológicos, metabólicos, genéticos, socioeconómicos, culturales y emocionales (Palou *et al.*, 2004). La obesidad se asocia, también, con muerte prematura, ya que es un factor de riesgo para enfermedades crónicas; así como con problemas respiratorios, musculoesqueléticos crónicos, lumbago, de la piel e infertilidad (Kanasaki, 2011).

La obesidad no existió significativamente para la humanidad hasta hace unos 10, 000 años. Con el advenimiento de la agricultura y, más intensamente, con la llegada de la revolución industrial, la obesidad se convierte en la primera de las enfermedades de la civilización (Trowill y Burkitt, 1981). La obesidad puede presentarse como una condición adaptativa ventajosa o como una enfermedad, según si la acumulación de reservas resulte preventiva cuando el alimento sea escaso o que se convierta en una sobrecarga metabólica. Las reservas se acumulan transitoriamente, solo durante la época de abundancia de alimentos, mientras que en otra situación pueden mantenerse en forma permanente y no ser utilizadas. Por lo tanto la obesidad-prevención y obesidad-enfermedad, han estado presentes en la historia del hombre, con un significado social cambiante según las características y las condiciones de vida en los distintos momentos evolutivos de la humanidad.

Anteriormente, el sobrepeso y la obesidad se consideraban problemas propios de los países con ingresos económicos altos, pero en la actualidad ambos trastornos aumentan de manera alarmante en países de ingresos bajos y medianos, particularmente en los entornos urbanos (OMS, 2013). Por su parte, Lambert en el 2006, describió algunos factores socioeconómicos, en la población alemana, vinculados con el sobrepeso y la obesidad, determinando tres indicadores principales como su causa: los ingresos económicos, la educación y la posición o dedicación ocupacional. Cuando analizó esto por género encuentra que, en los hombres, influyen principalmente los dos últimos, no siendo relevante el de ingresos económicos.

La Organización mundial de la salud reportó que, a nivel mundial en el año 2008, 1400 millones de personas mayores de 20 años presentaron sobrepeso y que el 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad cobran más vidas que la insuficiencia ponderal. Por lo anteriormente expuesto, se ha ubicado al sobrepeso y la obesidad como el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo (OMS, 2013).

La Secretaría de Salud del Distrito Federal en México reporta que el sobrepeso y la obesidad son el problema de salud pública principal, porque es el país con el primer lugar mundial en niños con obesidad y sobrepeso, y el segundo en adultos. México gasta 7% del presupuesto destinado a la salud para atender la obesidad, tan solo debajo de Estados Unidos que destina el 9%. Estadísticas del INEGI indican que, en México en el 2005, 20.52 millones de mujeres mayores de 20 años (70%) presentan sobrepeso u obesidad, 16.96 millones de hombres mayores de 20 años (66%) y 5.54 millones de niños en edad escolar (26%) las presentan (INEGI, 2005; Olaiz-Fernández *et al.* 2006).

El índice de masa corporal (IMC) para determinar el sobrepeso y obesidad en humanos, el índice se obtiene a partir de la relación entre el peso y la talla (OMS, 2004). Fue creado por el naturalista Lambert Jaques Quetelet, de origen belga en 1871, como resultado de sus estudios antropométricos en el hombre. Esta medida se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2) (OMS, 1995).

Durante los últimos años se han reportado casos de varones con obesidad que presentan una alteración en sus parámetros seminales, y donde se advierte del elevado riesgo de subfertilidad (OMS, 2013). La infertilidad y la subfertilidad afecta a una porción significativa de la humanidad (OMS, 2013). La infertilidad masculina se define por la Organización mundial de la salud como la imposibilidad de lograr un embarazo luego de un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de métodos anticonceptivos. Actualmente, en Europa, una de cada 5 parejas son infértiles. De éstas, el factor masculino, es decir, cuando el hombre es teóricamente el responsable

en forma completa o parcial de la infertilidad, es el 50% de los casos. El sobrepeso y la obesidad se asocian con una alta incidencia en el factor de infertilidad masculina (Du Plessis, *et al.* 2010).

2.2. Metabolismo del sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad pueden ser el resultado de procesos fisiológicos y metabólicos inadecuados, tales como, las señales que pueden contribuir a la regulación de la ingesta y del peso corporal. Se debe puntualizar que, a corto y largo plazo, están controlados por mecanismos distintos pero que interaccionan. Algunas señales, como nutrientes u hormonas gastrointestinales actúan como determinantes de saciedad a efecto de limitar la cuantía de cada comida (Barreno, 2007).

Las señales que operan a corto plazo en la regulación de la ingesta, como la colecistoquinina, grelina y obestatina tienen una función diferente a los reguladores de largo plazo, como son la insulina y la leptina (Barreno, 2007). Estas últimas se activan en proporción de las reservas de tejido adiposo y de la cantidad de energía consumida en periodos prolongados, ambas regulan la ingesta de alimentos y el gasto calórico para asegurar la homeostasis energética. El cambio en la adiposidad corporal, que es lo que ocurre en el sobrepeso y la obesidad, se acopla a modificaciones que compensan la ingesta de alimentos. Leptina e insulina son señales adipocíticas secretadas en proporción al contenido de grasa corporal y actúan en el hipotálamo, induciendo un estímulo catabólico e inhibiendo vías anabólicas. Los circuitos catabólicos y anabólicos ejercen efectos opuestos sobre el balance energético (diferencia entre calorías ingeridas y gasto energético), que, a su vez, determinan la cantidad de combustible que se almacena como grasa (Barreno, 2007).

La hipótesis de que la obesidad se pueda deber a una resistencia a la leptina surgió debido al hallazgo de concentraciones plasmáticas elevadas de la hormona en pacientes con sobrepeso (Fig. 2). Esta hipótesis apunta a que, algunos casos de obesidad humana, pueden deberse a una acción reducida de leptina en el sistema nervioso central, y que los individuos afectados son incapaces de responder a un

tratamiento con leptina (Barreno, 2007). Varias vías que contienen neuropéptidos hipotalámicos son mediadoras de las acciones de la leptina y la insulina en el sistema nervioso central (SNC). La vía de efecto anabólico más conocida es la del neuropéptido Y (NPY), está se encarga de estimular el apetito, de incrementar la ingesta y de reducir el gasto energético a la vez que induce la síntesis de enzimas lipogénicas en el hígado y tejido adiposo blanco; por ello, la administración continua de NPY induce obesidad.

2.3. Sobrepeso y obesidad en la reproducción masculina

Los problemas reproductivos ligados con el sobrepeso y la obesidad, en el macho, se asocian con un efecto negativo y significativo de procesos hormonales. En el hombre esta relación se ha caracterizado escasamente, aunque se conoce que el aumento de los adipocitos en número y tamaño, provoca la secreción de concentraciones anormales de adipocinas y hormonas como testosterona, que alteran la fertilidad (Fig. 3) (Du Plessis, *et al.* 2010).

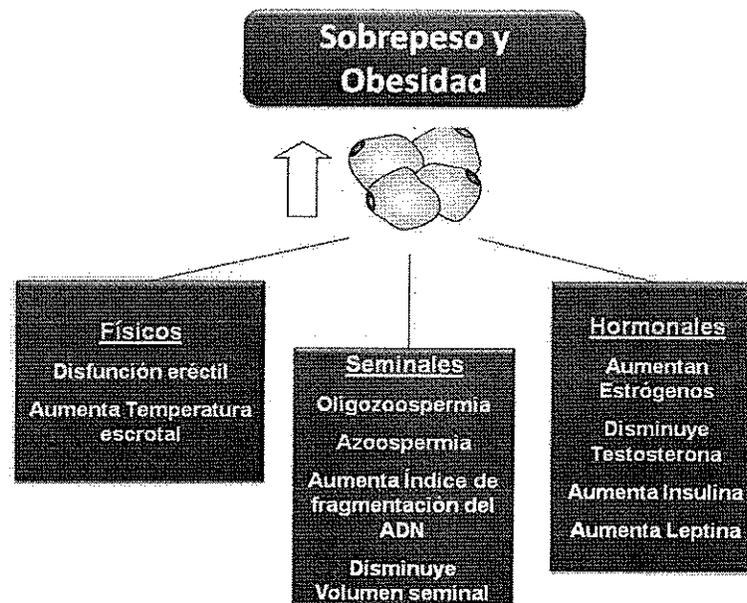


Fig. 3 El rol de los adipocitos en la infertilidad masculina. El aumento en número y tamaño como resultado de la obesidad genera cambios físicos y hormonales (Du Plessis *et al.* 2010).

La grasa total del cuerpo, la abdominal y la subcutánea se han asociado con la disminución de testosterona en los hombres, y este resultado se explica por la hiperactividad de la enzima citocromo p450 aromatasa expresada en concentraciones altas en el tejido adiposo blanco, responsable de pasos clave en la biosíntesis de estrógenos. Los niveles de estrógenos altos en los hombres mayores de 20 años resultan de la conversión de andrógenos a estrógenos, gracias a la biodisponibilidad alta de la enzima aromatasa. Los niveles anormales de hormonas sexuales pueden causar cambios importantes en la espermatogénesis y otros aspectos de la reproducción masculina (Du Plessis, *et al.* 2010).

Algunos estudios reportan que los parámetros metabólicos asociados con la obesidad, como son los niveles altos de colesterol y triglicéridos tienen efectos directos en la función testicular, llevando a una baja calidad espermática (Jones, *et al.* 1979; Padron, *et al.* 1989; Teerds *et al.*, 2011). Una correlación negativa entre los parámetros seminales y la obesidad se confirmaron por Kort *et al.* (2006) reportando una disminución significativa del porcentaje de movilidad espermática.

El efecto de la obesidad en los parámetros seminales y su asociación con la disfunción eréctil, en individuos con problemas de infertilidad que acuden a centros especializados en reproducción, fueron: incidencia alta de oligozoospermia y la prevalencia de movilidad progresiva baja (Hammoud, *et al.*, 2008).

Los individuos con sobrepeso y obesidad presentan alteraciones en la funcionalidad reproductiva y uno de los mecanismos propuestos por Teerds *et al.*, 2011 para explicarlo, es la resistencia al sistema KISS 1 y a la leptina. El aumento en el volumen del tejido adiposo, facilita la presencia de más testosterona que será convertida en estradiol. La hormona leptina, en grandes cantidades, induce la inhibición de la producción de testosterona (Teerds *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha observado el efecto de la obesidad en el epitelio germinal y epididimario, evaluando la morfología epididimaria y testicular, la lipoperoxidación en el

epidídimo, niveles séricos de leptina, hormonas esteroides, insulina, colesterol, triglicéridos y algunos parámetros espermatozoides, utilizando como modelo experimental de rata, partiendo de dos grupos, uno con peso normal y uno con obesidad inducida (Vigueras, *et al.* 2009). En este estudio no se encontraron diferencias en los niveles séricos de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos. Sin embargo, los niveles séricos de leptina y estradiol, mostraron un aumento considerable, disminuyendo los niveles de testosterona. En la histología de la cabeza de epidídimo encontraron diferencias morfológicas considerables con respecto a las ratas con peso normal; sin embargo, no hubo diferencias significativas en la morfología testicular. El grupo obeso presentó lipoperoxidación elevada en el epidídimo y reducción en la viabilidad -28.8%, movilidad -26.49% y concentración espermática -23.86%. Por lo tanto, es claro que hay un daño en los espermatozoides de rata obesa y que esto parece ocurrir a nivel de epidídimo.

Además, otros estudios evalúan las repercusiones posibles en la función epididimaria, glándulas accesorias, niveles de testosterona en semen y calidad espermática asociada con el sobrepeso, por ejemplo: A las muestras de semen de 794 pacientes de un laboratorio de reproducción y andrología, fueron evaluadas midiendo los niveles de alfa-glucosidasa neutral, fructosa, ácido cítrico y testosterona. La calidad seminal se evaluó observando: volumen, densidad, movilidad, morfología, viabilidad y madurez nuclear (Martini, *et al.* 2009). Se encontraron niveles bajos de alfa-glucosidasa neutral, que es un marcador de la función del epidídimo y se observó una asociación negativa entre el aumento de índice de masa corporal, la movilidad total y movilidad rápida de los espermatozoides (Martini *et al.*, 2009). El sobrepeso y la obesidad están asociados con un incremento en el estrés oxidante y con lipoperoxidación (Vincent *et al.*, 2007; Teerds *et al.*, 2011). Varios estudios han reportado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) son las causantes de la lipoperoxidación y que, en concentraciones altas, pueden ser muy tóxicas para el espermatozoide (Jones *et al.*, 1979; Selly *et al.*, 1991; Teerds *et al.*, 2011). También tienen un rol importante en el estrés oxidante causante de la infertilidad masculina (Agarwal *et al.*, 2009; Keffer *et al.*, 2009; Teerds *et al.*, 2011; Tremellen, 2008). Los espermatozoides de hombres infértiles muestran más

daño oxidante que hombres sin problemas de fertilidad. Estas observaciones fueron confirmadas en un estudio *in vitro* en el que se generaron EROs, y esto hizo que se incrementara la fragmentación del ADN del espermatozoide (Aitken *et al.*, 1998; Twigg *et al.*, 1998; Du Plessis *et al.*, 2011). Kasturi *et al.*, 2008 concluyeron que el estrés oxidativo resulta en la lipoperoxidación de la membrana plasmática del espermatozoide. Esto puede llevar a una disminución de la movilidad y a una disfunción membranal (Rao *et al.*, 1989; Teerds *et al.*, 2011). Tavalani *et al.*, (2008), estudiaron la relación entre la actividad de enzimas las antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) con la astenozoospermia; proponiendo que la lipoperoxidación podría estar provocando la pérdida en la movilidad de los espermatozoides.

Otros estudios señalan que el aumento en la temperatura escrotal puede afectar la espermatogénesis (Jung *et al.*, 2005; Sermodande *et al.*, 2012). La temperatura es uno de los factores que pueden involucrarse en el mal funcionamiento de la maquinaria del espermatozoide, la cual, en relación con la movilidad espermática está bien documentada en la literatura andrológica (Mazzilli *et al.*, 1995; Esfandiari *et al.*, 2002). Se sabe que una ganancia de energía en el espermatozoide resulta en el aumento de la actividad mitocondrial, promoviendo el movimiento del axonema en el flagelo del espermatozoide. Sin embargo, la transferencia excesiva de energía en forma de calor, conduce a una excesiva producción de ERO en la cadena respiratoria, lo que compromete la integridad estructural y funcional del espermatozoide. Al respecto, los pacientes con varicocele son un ejemplo del mecanismo del efecto de la temperatura sobre la infertilidad masculina, por una producción excesiva de ERO (Kim y Goldstein, 2008). La estructura especial de las membranas del espermatozoide, que particularmente son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, puede predisponer a una lipoperoxidación mayor y, en consecuencia, conducir a un estrés oxidante (Agarwal *et al.*, 2004; Weir y Robaire, 2007).

2.4. Modelos animales de sobrepeso y obesidad

Se dice que el humano es obeso cuando existe un IMC mayor a los 30kg/m^2 (Kopelman, 2007). En otras especies, como el ratón, se encuentran diferencias específicas en la respuesta a dietas altas en grasa, la cepa C57BL/6J de ratón es la más usada para la inducción de obesidad con una dieta alta en grasa porque exhibe anomalías metabólicas como el humano (Collins *et al.*, 2004). Las ratas cepas Sprague Dowley y Long Evans se utilizan también como modelos para obesidad inducida por dieta alta en grasas (Srinivasan y Ramarao, 2007).

También existen otros modelos para obesidad; como los monos, macacos y babuinos, mismos que han provisto información importante sobre la obesidad en humano (Keizo y Daisuke, 2011). El mono Rhesus exhibe obesidad, junto con un desarrollo de enfermedades asociadas. Macacos cautivos despliegan obesidad cuando reciben alimento *ad libitum*, desarrollan diabetes tipo 2 y sus complicaciones. El ejercicio reducido en los macacos aumenta su susceptibilidad. La obesidad espontánea ha sido encontrada en babuinos silvestres y en monos Rhesus de vida libre (Budkin *et al.*, 1993; Hansen y Bodkin, 1986).

La obesidad en el conejo Nueva Zelanda se ha reportado de manera anecdótica (solo como mascotas), y aún no se ha referido, ni propuesto, un índice de masa corporal como en el humano. Sin embargo, al igual que en otras especies, la condición corporal se ha utilizado para determinar obesidad con datos provenientes de estudios en mascotas estableciendo una escala, de acuerdo con las características apreciativas de huesos, músculo y acumulación de grasa es: 1 = Muy flaco, 2 = Flaco 3 - 4 = Peso ideal, 5 = Obeso (Meredith, 2012).

Se han realizado estudios en conejo Nueva Zelanda blanco determinando alteraciones funcionales de su organismo, producto del uso de dietas altas en carbohidratos y lípidos, específicamente de hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis, mostrando también que una dieta alta en lípidos administrada antes de la pubertad induce alta adiposidad y dislipidemia, pero no obesidad (Picone *et al.*, 2011).

Al inducir hipercolesterolemia en el conejo Nueva Zelanda blanco, los parámetros seminales como movilidad y morfología espermática resultan alterados, disminuyendo porcentualmente, además de que presentan poco volumen seminal (Lancellotti *et al.*, 2013). El aumento significativo de colesterol en sangre y en la membrana del espermatozoide, disminuye funciones específicas como: resistencia osmótica, reacción acrosomal y capacitación espermática (Lancellotti *et al.*, 2013).

Sin embargo, habrá que aclarar que el término de obesidad en el orden lagomorfo, aun no se ha definido científicamente, razón por la que la condición de los conejos utilizados en el presente trabajo será referido exclusivamente como sobrepeso, el cual se indujo mediante una dieta alta en energía.

3. Justificación

Se ha determinado que el sobrepeso puede afectar algunos parámetros seminales, entre los que se encuentran: disminución del volumen seminal, de la concentración y viabilidad espermáticas y en el espermatozoide, disminución de su movilidad progresiva, así como modificaciones en la morfología. Lo anterior, se relaciona con alteraciones en el eje neuroendocrino, por la modificación en las concentraciones de hormonas, disminuyendo testosterona y aumentando la concentración de estrógenos, lo que puede modificar procesos como la maduración espermática epididimaria, y en consecuencia afectar la capacidad de capacitación y reacción acrosomal. La relación del sobrepeso/obesidad con la subfertilidad se ha reportado en varones en clínicas de fertilidad, sin embargo el abordaje para estos estudios en humanos es complejo ante lo cual existe la posibilidad de utilizar como modelo de estudio al conejo Nueva Zelanda blanco, por la facilidad de obtener muestras frecuentes de eyaculado y evaluar la repercusión que tiene el sobrepeso en parámetros seminológicos, espermaticos, además, dado que no hay muchos estudios que hablen del efecto del sobrepeso/obesidad en la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*.

4. Objetivos

4.1. General

Determinar el efecto del sobrepeso sobre algunos aspectos de la reproducción masculina en conejo Nueva Zelanda blanco.

4.2. Específicos

- Valorar el efecto del sobrepeso inducido en el conejo Nueva Zelanda blanco sobre los parámetros seminológicos y espermátobioscópicos generales.
- Evaluar si el sobrepeso afecta la capacitación y reacción acrosomal *in vitro* en los espermatozoides del conejo Nueva Zelanda blanco.

5. Hipótesis

Si el sobrepeso afecta las funciones del testículo y el epidídimo del conejo Nueva Zelanda blanco, entonces, las alteraciones se verán reflejadas en una mala calidad seminal y espermática, así como en una disminución en el porcentaje de espermatozoides que llevan a cabo la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*, en comparación con los valores de estos mismos parámetros de individuos en normopeso.

Material y métodos

5.1. Reactivos y soluciones

Solución Ringer (pH 7.2) para lavado de espermatozoides: Cloruro de Sodio 95 mM (NaCl), Cloruro de Potasio 5 mM (KCl), Cloruro de Calcio 1.7 mM (CaCl), Fosfato de Potasio 1.1 mM (KH₂PO₄). Solución Eosina-Nigrosina para evaluar viabilidad (Apéndice 1), kit de reactivos Espermaform (DESEGO, México) para evaluar la morfología (Apéndice 1), Hidrocloruro de Clortetraciclina (CTC) de Sigma-Aldrich, azul brillante de Coomassie G250 (CBB), ácido pirúvico, Tris (tris-(hidroxi-metil) aminometano), albumina sérica bovina (libre de ácidos grasos), D-(+) Glucosa, Progesterona soluble en agua (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 3.18 mM. Todos los demás fueron soluciones y reactivos de grado analítico.

5.2. Material biológico

Se usó un grupo de 8 conejos de la raza Nueva Zelanda blanco, adquiridos en la granja CEIEPA UNAM, a los 35 días de edad, los gazapos (machos) se mantuvieron en la granja de la Licenciatura en Producción Animal de la UAM-I, y al llegar a la edad adulta (5 meses), se comenzaron a entrenar para la obtención de la muestra de semen.

5.3. Conformación de grupos e Inducción de Sobrepeso

Los conejos se dividieron en dos grupos. En edad adulta, el grupo normopeso (n=4) recibió una dieta conformada por 150 gramos de alimento balanceado comercial (marca Malta Clayton, línea conejo ganador, etapa reproductor) y el grupo sobrepeso (n=4) recibió una dieta hipercalórica conformada por 120 gramos del mismo alimento y además 12 ml de aceite vegetal mixto (marca libre Bodega Aurrera). El aporte calórico de la dieta normopeso fue de 2.8 mega calorías por kilogramo y de la de sobrepeso fue de 3.2 mega calorías por kilogramo.

En el presente trabajo se prefirió la utilización de aceites vegetales, dada su disponibilidad y, además de que en la dieta común de las personas son los que

actualmente se consumen preferentemente, aún a pesar de la mayor palatabilidad que puedan tener las grasas o aceites de origen animal. El aceite vegetal mixto utilizado en este trabajo, tiene grasas poliinsaturadas principalmente, compuestas por ácido linoléico (omega 6) y linolénico (omega 3). El aceite vegetal mixto fue adecuadamente aceptado en la dieta por los animales y mostraron buena palatabilidad y sin presencia de trastornos digestivos a lo largo de todo el experimento. Durante el estudio no se utilizaron aceites que tuvieran signos de rancidez que pudieran motivar un consumo menor.

5.4. Condición de alojamiento de los conejos

Los conejos se mantuvieron en jaulas de 88 cm x 40 cm x 60 cm, suspendidas en sistema flat deck, para facilidad de limpieza y manejo. Se contó con disposición de agua *ad libitum* a través de bebederos automáticos (Fig. 4). Los individuos se mantuvieron en condiciones de luz y ventilación natural. La temperatura y humedad fueron monitoreadas por un termómetro/higrómetro. El alimento se colocó dos veces a la semana y se retiró del comedero el que no fue consumido para evitar enranciado. Comederos y bebederos se lavaron con frecuencia y, se realizó la limpieza de toda el área experimental. Obtención y lavado de espermatozoides

La obtención de semen se realizó dos veces por semana, procurando que fuera por la mañana (Fig. 6). Se utilizó una hembra adulta como estímulo (Fig. 5), también procedente del CEIEPA UNAM. Se usó una vagina artificial y un micro tubo colector de 1.5 ml (Fig. 6). La vagina se llenó con agua a 47-50°C y la muestra seminal fue trasladada inmediatamente al laboratorio, cuidándola de los cambios de temperatura con un baño seco (36.5°C - 37°C) que además la cubrió de la luz. Una vez considerado que el sistema de colección de muestras era eficiente (300 días de edad) se comenzaron a hacer las evaluaciones seminológicas (color, volumen) y espermatozoides. Cabe señalar que, como era lo esperado, se detectaron variaciones individuales en las características de monta y ejecución eyaculatoria, las

cuales, se consideraron dentro de lo normal para el patrón de conducta sexual de la especie y no tuvieron injerencia mayor que produjeran algún sesgo en los resultados.



Figura 4. Condiciones en las que se mantuvieron a los conejos Nueva Zelanda blanco.

El lavado se realizó con solución Ringer, la muestra de semen se llevó a 1 ml y se centrifugó a 500 g por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, y el botón celular se resuspendió nuevamente en 1 ml de solución Ringer, a esta muestra se le denominó espermatozoides eyaculados lavados.



Figura 5. Pareja de conejos Nueva Zelanda blanco donde la hembra fue el estímulo para la obtención de semen con vagina artificial.



Figura 6. Obtención de semen de conejo Nueva Zelanda blanco.

5.5. Evaluación básica de los espermatozoides

5.5.1. Determinación de la movilidad en masa

La determinación de la movilidad masal y la evaluación de la morfología espermática se realizaron primero en el semen sin lavar y posteriormente de ser lavado para contar con parámetros de control propio del análisis seminal. Se colocaron 5 μ l de semen en un portaobjetos atemperado a 36.5°C y se observó el movimiento en masa de los espermatozoides, en el contraste de fases de un microscopio óptico a 10x. Se clasificó de acuerdo con el siguiente criterio: 0=nula, 1=poca movilidad, 2=movilidad media y 3=mucha movilidad.

Las siguientes evaluaciones se realizaron de acuerdo al manual de la Organización Mundial de la Salud (2010).

5.5.2. Determinación de la concentración espermática

Se realizó una dilución 1:100 en un tubo Eppendorf, colocando 990 μl de agua destilada y 10 μl de la muestra de semen, se homogenizó en vortex y se tomaron 10 μl de la dilución para colocarla en la cámara de Neubauer, en donde se realizó el conteo, se dejó reposar unos minutos para que las células sedimentaran. El conteo se realizó observando la muestra en el contraste de fases del microscopio óptico a 40x.

5.5.3. Determinación del porcentaje de movilidad espermática

En un portaobjetos se colocaron 5 μl de espermatozoides lavados en un portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico a 40x. Se evaluó el movimiento contando hasta 200 espermatozoides, según las categorías: con movilidad progresiva (movimiento lineal o en círculos rápidos direccionalmente), movilidad no progresiva (vibran o se mueven en círculos en un mismo lugar) e inmóviles.

5.5.4. Determinación de la viabilidad espermática

Se colocaron 5 μl de la muestra de semen lavada y 5 μl del colorante Eosina-Nigrosina en un portaobjetos, y se realizó un frotis, se secó a la flama del mechero. Se observó bajo el microscopio óptico a 40x. Se contaron 200 espermatozoides distinguiendo entre muertos (teñidos de coloración morada o rosa oscuro) y vivos (sin teñir).

5.5.5. Determinación de la morfología espermática

Se realizó una dilución 1:30 tomando 10 μl de la muestra de semen lavada y 20 μl de solución fijadora, posteriormente se realizó un frotis en un portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente, y se sumergió en la solución A por 3 minutos, se retiró la solución con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Nuevamente el frotis se sumergió en la solución B por 5 minutos, se retiró la solución con agua destilada, se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando el frotis se secó totalmente, se colocó Entellan y se cubrió con un cubreobjetos. Se observó al microscopio óptico a 100x. (Todo, de acuerdo con las instrucciones del estuche Espermaform). Se registraron las anomalías en cabeza, flagelo y presencia de gota citoplasmática.

5.6. Evaluación de la Fisiología de los espermatozoides

5.6.1. Capacitación

La capacitación espermática se determinó de acuerdo a las especificaciones establecidas por Avalos Rodríguez *et al.*, 2004, y Cervantes *et al.*, 2008; a partir de una muestra de espermatozoides previamente lavados (x2) y resuspendidos en solución de Ringer, al término de cada lavado se determinó la concentración espermática. Se cambiaron de medio los espermatozoides a medio Brackett con albumina sérica bovina (BSA) en una proporción de 10 mg/10 ml. Un primer registro de capacitación espermática se realizó inmediatamente de haber transferido los espermatozoides al medio Brackett y el valor obtenido fue considerado como control (tiempo cero), este consistió de 10 μ l de solución de espermatozoides en un tubo cónico de polipropileno, al que se adicionaron 10 μ l de solución fijadora (paraformaldehído 12%) y 20 μ l clorotetraciclina, cubriéndose de la luz. Se incubó el resto de la muestra de espermatozoides en una atmosfera de 5% de CO₂/ 95% de aire durante 6 horas a 37°C. A las 6 horas de incubación se tomó una alícuota de 10 μ l a la que se le adicionó 10 μ l de solución fijadora (paraformaldehído 12%) y 20 μ l de clorotetraciclina, cubriéndose de la luz. Las preparaciones de espermatozoides teñidos con clorotetraciclina fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia 100x, donde se registraron los patrones de fluorescencia, distinguiendo entre los espermatozoides capacitados y los no capacitados.

5.6.2. Reacción acrosomal

De cada muestra de espermatozoides se prepararon dos tubos eppendorf por muestra, uno para determinar la reacción acrosomal espontánea y otro para determinar la reacción acrosomal inducida, de acuerdo al método descrito por Cervantes *et al.*, 2008.

A) Para determinar la reacción acrosomal inducida, se tomaron 25 μ l de espermatozoides lavados en Ringer, que fueron centrifugados a 500 x g por 5 minutos, al término el sobrenadante fue descartado. El botón celular se resuspendió con una mezcla de 50 μ l de paraformaldehído al 8%, 25 μ l de medio Brackett + BSA 0.3% y 10

μl de progesterona (a una concentración final de $3.18 \mu\text{M}$). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se realizaron dos lavados con acetato de amonio (0.1 M), estos lavados consistieron en agregar $330 \mu\text{l}$ de este mismo y centrifugar a $500 \times g$ por 5 minutos. En cada centrifugación se descartó el sobrenadante, y el botón celular se resuspendió con $25 \mu\text{l}$ de acetato de amonio. En un portaobjetos previamente cubierto con poli-L-lisina (0.1%) se colocaron $10 \mu\text{l}$ de la suspensión de espermatozoides lavados, y se agregó suficiente colorante Azul de Coomassie G-250 (CBB) (2%) en un tiempo de 2 minutos, al término del cual se retiró el colorante por lavado con acetato de amonio y la laminilla se dejó secar al aire.

B) Para determinar la reacción acrosomal espontánea, se tomaron $10 \mu\text{l}$ de espermatozoides lavados en Ringer, que fueron centrifugados a $500 \times g$ por 5 minutos, al término el sobrenadante fue descartado. El botón celular se resuspendió con una mezcla de $20 \mu\text{l}$ de paraformaldehído al 8% y $10 \mu\text{l}$ de medio Brackett + BSA 0.3%, sin progesterona. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se realizaron dos lavados con acetato de amonio (0.1 M), estos lavados consistieron en agregar $120 \mu\text{l}$ de este mismo y centrifugar a $500G$ por 5 minutos. En cada centrifugación se descartó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en $25 \mu\text{l}$ de acetato de amonio. En un portaobjetos previamente cubierto con poli-L-lisina (0.1%) se colocaron $10 \mu\text{l}$ de la suspensión de espermatozoides lavados, y se agregó suficiente colorante CBB (2%) en un tiempo de 2 minutos, al término del cual se retiró el colorante por lavado con acetato de amonio y la laminilla se dejó secar al aire.

La reacción acrosomal espontánea e inducida se determinó al término de la capacitación (6 horas) y a las 7 horas (tiempo final). Para realizar el tubo de reacción acrosomal inducida, se tomaron $25 \mu\text{l}$ de espermatozoides ya capacitados, se les colocó $50 \mu\text{l}$ de paraformaldehído al 8% y $7.5 \mu\text{l}$ de progesterona (a una concentración final de $3.18 \mu\text{M}$). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con acetato de amonio, estos lavados consistieron en agregar $83 \mu\text{l}$ de este mismo y centrifugar a $500 g$ por 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes, al

término de los dos lavados se resuspendió en 25 μ l de acetato de amonio. Se toman 10 μ l de la suspensión y se colocaron en un portaobjetos previamente cubierto con polilisina 0.1%, y se tiñó con CBB 2%, se retiró el colorante con acetato de amonio y se dejó secar al aire.

5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en comparar los datos espermatobioscópicos, de capacitación y reacción acrosomal, de conejos normopeso vs sobrepeso. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student y U de Mann Whitney. El valor de significancia fue el mismo para las dos pruebas $p < 0.05$. Para el análisis estadístico se usó el paquete SPSS, IBM (Statistical Package for the Social Sciences).

6. Resultados

6.1. Inducción de sobrepeso

En la Figura 7, se muestran los pesos promedio de los conejos de 400 días edad, cuando se obtuvieron las muestras seminales para el estudio. El grupo normopeso alcanzó 4.09 ± 0.11 kg en tanto que el grupo con sobrepeso, 5.10 ± 0.19 kg, la diferencia fue de 19.8% con significancia estadística ($p < 0.05$, con la prueba t Student). La diferencia de pesos entre grupos fluctuó desde 16 al 18.5%.

Son escasos los artículos de investigación en conejos que relacionen el sobrepeso con aspectos de fertilidad masculina, incluso como se anotó anteriormente, la condición de sobrepeso u obesidad en esta especie, no está caracterizada, en contraste abundan trabajos en relación a calidad espermática, dada la ventaja de obtener sus muestras seminales de manera muy accesible, frecuente y por tiempo considerable. Ante este vacío de información los resultados aquí obtenidos, nos permitieron conocer que la condición de sobrepeso con la administración de una dieta hipercalórica (15% mayor de energía que la dieta comercial), mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) después de pubertad (60-70 días de edad) y permaneció durante todo el tiempo de estudio (400 días de edad, 4.1 ± 0.2 normopeso vs 4.7 ± 0.1 sobrepeso, con una $p < 0.05$).

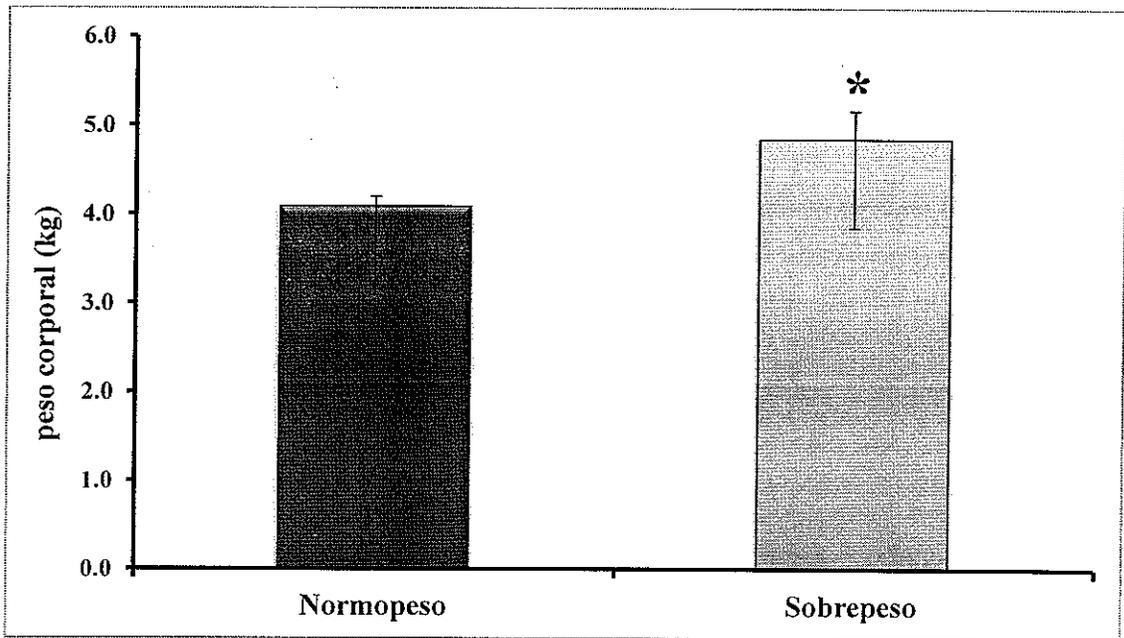


Figura 7. Peso corporal promedio (\pm DE) de conejos Nueva Zelanda blancos normopeso y sobrepeso. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en el peso de los grupos de conejos (t Student, $p < 0.05$, $n=4$).

6.2. Análisis Seminológico y Espermatooscópico

Se detectaron variaciones individuales en las características de monta y ejecución eyaculatoria, las cuales estuvieron dentro del patrón de la especie. El color de las muestras seminales (blanco amarillado) fue muy similar entre grupos. El volumen seminal del grupo sobrepeso presentó, contrario a lo esperado, un volumen ligeramente menor ($0.69\text{ml} \pm 0.19\text{ml}$ vs $0.64\text{ml} \pm 0.13\text{ml}$), sin diferencia significativa (U de Mann Whitney, $p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas para los parámetros de movilidad en masa ya que al tener como valores máximos al número 2 y 3, ambos grupos presentan buena calidad seminal, pues los normopeso tuvieron 100% y el grupo sobrepeso tuvo el 63%, de concentración espermática ($483.08 \times 10^6 \pm 386.46 \times 10^6$ normopeso vs $569.5 \times 10^6 \pm 453.77 \times 10^6$ sobrepeso), movilidad progresiva ($53.3 \pm 20.64\%$ normopeso vs $53.7 \pm 24.0\%$ sobrepeso) y viabilidad ($75.59 \pm 9.65\%$ normopeso vs $70.4 \pm 10.3\%$ sobrepeso). En todas las anteriores los valores promedio fueron ligeramente superiores para los conejos con peso normal pero, como ya se

mencionó, sin haber diferencias significativas. Los únicos parámetros donde si se presentó una diferencia significativa fue para el porcentaje de espermatozoides inmóviles, donde fue mayor para el grupo sobrepeso ($18.6\% \pm 14.9\%$ normopeso vs $17.9 \pm 8.4\%$ sobrepeso respectivamente U de Mann Whitney, $p < 0.05$) y en el porcentaje de anomalías en cabeza y flagelo, fueron mayores para el sobrepeso con respecto al normopeso $35 \pm 13.3\%$ vs $19.54 \pm 4.91\%$ respectivamente (con una significancia de $p < 0.05$, prueba t Student) (Tabla 1).

Tabla 1. Datos comparativos de los parámetros espermatozoides de las muestras de conejos normopeso y con sobrepeso. Los datos representan los valores promedio \pm DE para cada una de las variables analizadas. Letras diferentes (superíndices) indican diferencia significativa en la comparación de los valores del grupo de conejos con sobrepeso respecto a los normopeso (U de Man Whitney, $n=20$).

	PESO NORMAL	SOBREPESO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
% Movilidad Progresiva	53.3 ± 20.6	53.7 ± 24.0	$p=0.306$
% Viabilidad	75.5 ± 9.6	70.4 ± 10.3	$p=0.070$
% anomalías (cabeza/flagelo)	$19.5^a \pm 4.9$	$35^b \pm 13.3$	$p < 0.05$
Concentración espermática ($\times 10^6$ spz/mililitro)	483 ± 386.4	569.5 ± 453.7	$p=0.412$

6.3. Capacitación

En promedio, ambos grupos presentaron 5% de capacitación espermática a las 0 horas y, mientras que a las 6 horas, se presentó una diferencia significativamente mayor en espermatozoides del grupo de conejos normopeso ($24.8 \pm 8.13\%$ en promedio) con respecto a las muestras de espermatozoides de los conejos con sobrepeso ($16.5 \pm 6.80\%$ en promedio) (U de Mann Whitney, $p < 0.05$). Lo que indica que los espermatozoides de conejo con sobrepeso, se capacitan menos.

Se contaron 100 espermatozoides en cada una de las condiciones experimentales, y se clasificaron de acuerdo al patrón de fluorescencia que se observó en la región de la cabeza. El patrón de espermatozoides no capacitados, muestran presencia de CTC en toda la cabeza de forma homogénea, es decir, fluoresce toda la cabeza; mientras que el patrón de espermatozoides capacitados muestra fluorescencia en la región anterior de la cabeza o el área que corresponde al acrosoma (Fig. 8).

6.4. Reacción Acrosomal

La reacción acrosomal espontánea a las 0 horas, fue ligeramente mayor (sin diferencia estadística) en los espermatozoides de los conejos con sobrepeso 30.6% vs 28.5% normopeso. Al cabo de 7 horas, la reacción acrosomal espontánea mostró marcadas diferencias entre grupos ($39.2 \pm 8.8\%$ normopeso vs $20.6 \pm 4\%$ sobrepeso, t Student, $p < 0.05$). En la reacción acrosomal inducida por progesterona se encontró un comportamiento diferente, con diferencias significativas en el tiempo 0 horas ($40.5 \pm 11.9\%$ normopeso y $25.1 \pm 7.3\%$ sobrepeso respectivamente) y sin diferencias luego de 7 horas de inducción (34% normopeso y 38.5% sobrepeso) (Tabla 2).

Se contaron 100 espermatozoides por cada laminilla y en todos los casos se clasificaron a los espermatozoides de acuerdo al patrón de tinción de sus acrosomas. Los espermatozoides que no han experimentado reacción acrosomal presentan una tinción azul marcada en la membrana acrosomal de la cabeza, mientras que los espermatozoides reaccionados no presentan esa tinción, siendo evidente la pérdida del acrosoma (Fig. 9).

Tabla 2. Comparación de los valores promedio \pm DE del porcentaje de capacitación y de reacción acrosomal *in vitro* de las muestras de espermatozoides de conejos Nueva Zelanda normopeso y sobrepeso. Letras diferentes (superíndices) indican diferencia significativa en la comparación de los valores del grupo de conejos con sobrepeso respecto a los normopeso (**capacitación**, n= 12, U de Man Whitney, p<0.05; **reacción acrosomal**, n=10, t Student, p<0.05).

	PESO NORMAL	SOBREPESO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
% Capacitación Tiempo inicial (0 hr)	4.8 \pm 0.5	5.3 \pm 3.7	p=0.952
% Capacitación Tiempo final (6 hr)	24.8 \pm 8.1	16.5 \pm 6.8	p<0.05
% Reacción Acrosomal Espontánea (0 hr)	28.5 \pm 8.7	30.6 \pm 19.7	p=0.729
% Reacción Acrosomal Espontánea (7 hr)	39.2 \pm 8.8	20.6 \pm 4	p<0.05
% Reacción Acrosomal Inducida (0 hr)	40.5 \pm 11.9	25.1 \pm 7.3	p<0.05
%Reacción Acrosomal inducida (7 hr)	34 \pm 13.7	38.5 \pm 17.1	p=0.407

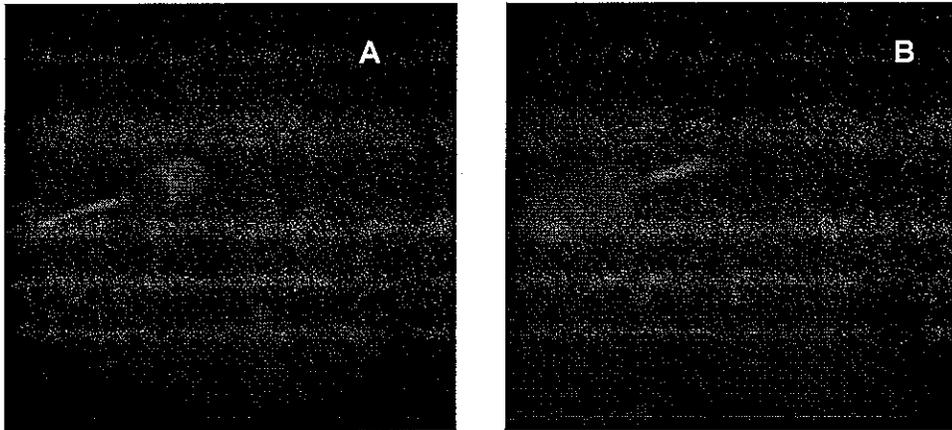


Figura 8. Patrones de capacitación obtenidos con Clortetraciclina (100x, microscopia de epi-fluorescencia). A) Espermatozoide capacitado, B) Espermatozoide no capacitado.

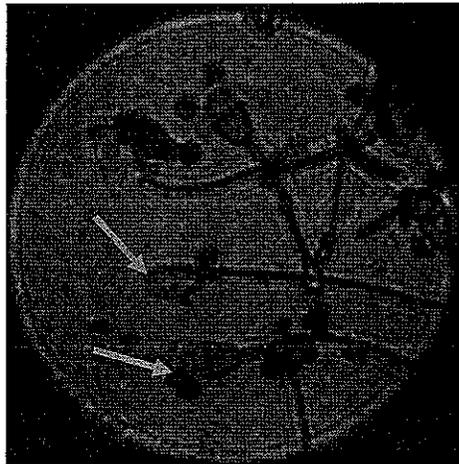


Figura 9. Patrones de reacción acrosomal, tinción azul de comassie G250 (100x microscopia de campo claro). Espermatozoide reaccionado (flecha naranja) y espermatozoide no reaccionado (flecha azul).

7. Discusión

El sobrepeso (SP) y la obesidad (OB), se han estudiados en varios modelos animales, como en el ratón, donde se ha reportado que inducen desde modificaciones genéticas hasta deficiencias hormonales, que se han relacionado con infertilidad en el macho. La inducción de sobrepeso y obesidad con dietas altas en energía también se ha estudiado en la rata. En el humano, estas condiciones se han definido mediante el índice de masa corporal (IMC), que es la relación entre la estatura y el peso corporal, en donde una persona con $IMC > 25$ es categorizada en sobrepeso y con $IMC \geq 30$ en obesidad. Sin embargo, en el conejo no existe en la literatura evidencia de la condición de sobrepeso y obesidad en conejos de compañía o mascota (Ikeda *et al.*, 1981; OMS, 2011; Srinivasan y Ramarao, 2007) o acaso un intento de definirla basándose en condición corporal (Meredith, 2012). En los modelos animales de SP y OB se ha preferido el uso de omnívoros, entre los que figuran los roedores; sin embargo, la utilización de un herbívoro, como el conejo, es compleja dado que tiene un metabolismo energético diferente y la autorregulación energética propicia que la inducción para el sobrepeso y obesidad sea más complicada. El modelo conejo, seleccionado para el presente trabajo, soluciona la necesidad de obtener muestras seriadas de semen y la posibilidad de hacer, en otro momento, tratamientos preventivos o reversibles del SP y la OB. En la literatura se encuentran trabajos en relación con el efecto de dietas hipercolesterónemicas, que utilizan como modelo al conejo e incluso donde se han dedicado a observar sus efectos en la reproducción, pero también señalan que sería aventurado categorizarla como sobrepeso y obesidad (Lancellotti *et al.*, 2013). En este trabajo se prefirió la utilización de aceites vegetales, dada su disponibilidad y, además de que en la dieta común de las personas son los que se consumen preferentemente, aún a pesar de la mayor palatabilidad que puedan tener las grasas o aceites de origen animal. El aceite vegetal mixto utilizado en este trabajo, contiene, principalmente, grasas poliinsaturadas compuestas por ácido linoléico (omega 6) y linolénico (omega 3). Este aceite vegetal mixto fue aceptado adecuadamente en la dieta de los animales, los que mostraron buena palatabilidad y no

desarrollaron trastornos digestivos a lo largo del experimento. Es importante mencionar que consideramos el peso promedio de los conejos que recibieron la dieta de alimento balanceado como peso normal (o normopeso) en tanto que, a la diferencia de peso con el grupo que recibió el balanceado más aceite como sobrepeso. La diferencia de consumo energético 320 kcal vs 435.5 kcal entre grupos, permitió alcanzar una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) de peso promedio desde que los animales alcanzaron la pubertad (3 meses de edad, Alvariño, 1993 y Martínez, 2004) y estas diferencias de pesos se mantuvieron durante todo el tiempo con una oscilación de diferencia de peso entre grupos del 16 al 18.5%. Estas diferencias de pesos son similares a las encontradas por Lancellotti *et al.* (2013) para conejos y Viguera *et al.* (2009) para ratas, donde, además especifica que la inducción al sobrepeso con una dieta especialmente balanceada y alta en energía, lograron tener efecto solamente en una de cada dos ratas, es decir una eficiencia de inducción a obesidad del 50%; en el presente trabajo se logró también el efecto en uno de cada dos conejos, así para poder presentar una $n=4$ en nuestro grupo con sobrepeso, se iniciaron con poco más del doble de conejos ($n=10$). Por otro lado, se ha reportado que, en varones, el sobrepeso y la obesidad se alteran las concentraciones hormonales, aumentando la de estradiol y disminuyendo la de testosterona, con lo cual existe una disminución de las funciones y parámetros reproductivos (Hammoud *et al.*, 2008; Teerds *et al.*, 2011). Por su parte, Du Plessis *et al.* 2010 sugieren que al aumentar el número y tamaño de adipocitos, como origen y consecuencia de la obesidad, se desencadenan cambios físicos y hormonales, como el incremento en la concentración de leptina, estrógenos e insulina y la disminución en la concentración de testosterona. Uno de los cambios seminales más evidentes reportado en la literatura ha sido la disminución en el volumen seminal, como consecuencia de la disminución de la testosterona y su efecto sobre testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias, sin embargo; en el presente trabajo no se encontró una relación entre el sobrepeso y el volumen seminal ($0.69 \text{ ml} \pm 0.19 \text{ ml}$ en normopeso y $0.64 \text{ ml} \pm 0.13 \text{ ml}$ en sobrepeso, $p > 0.05$, U de Mann Whitney). El volumen seminal es congruente con lo reportado por Lancellotti (*et al.*, 2012), dado que este parámetro, en conejos normopeso, fluctúa entre 0.25 y 1ml, en tanto que en

conejos no hipercolesteronémicos obtuvieron un volumen seminal de $0.8\text{ml} \pm 0.6\text{ml}$; esta amplia variación obedece a muchos factores, entre los que se encuentran época del año (menores en otoño y altos en primavera), edad, frecuencia de colección, tipo de estimulación, sistema de colección, estado nutricional y condición corporal. Otros autores señalan haber encontrado diferencias significativas en volumen seminales entre normopeso vs sobrepeso y obesidad, en especies como: humano y rata (Vigueras *et al.*, 2009; Du plessis *et al.*, 2010) lo que, en el presente trabajo, no se encontró.

Algunas investigaciones (Bakos *et al.*, 2010 y Ghanayem *et al.*, 2010) reportaron que en ratón obeso, existe una sensible disminución de la movilidad espermática (20%, en hiperactivación). En conejos, alimentados con 0.05% de colesterol en la dieta, se reportó una disminución de la movilidad espermática total (54.6%) mientras que los que no lo recibieron tuvieron 76.8% (Lancelloti, *et al.*, 2013). Los datos aquí obtenidos para la movilidad espermática masal no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los normopeso con respecto a los sobrepeso (2.6 ± 0.4 vs 2.4 ± 0.8 , respectivamente), cabe señalar que esta escala utilizada es equivalente a una media movilidad ($> 50\%$) con tendencia hacia una alta movilidad masal ($> 70\%$), e indica una calidad espermática adecuada en ambos grupos de conejos. La movilidad progresiva aquí obtenida tampoco fue diferente entre grupos ($53.3 \pm 20.6\%$ y $53.7 \pm 24.0\%$ respectivamente). Estos resultados son contrarios a lo encontrado en varones (Hammoud *et al.*, 2007; Martini *et al.*, 2009) y ratas (Vigueras *et al.*, 2009) 57.20% control y 42.55% obesas respectivamente ($p < 0.006$), donde demuestran que existe una relación inversa entre el aumento de peso corporal y la movilidad espermática. En la proporción de espermatozoides inmóviles, si se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos (18.6 ± 14.4 y 17.9 ± 8.4 , respectivamente) a pesar de que los valores promedio son muy cercanos.

La movilidad espermática es resultado de muchos factores, tanto los que están involucrados en la espermatogénesis, como en la maduración e, incluso, una vez maduros, en la interacción con componentes del medio circundante. Se ha mencionado

que el sobrepeso y la obesidad disminuyen la concentración de testosterona, que, como es bien conocido, es fundamental para el proceso de formación, maduración y almacenamiento espermático. Así, la reducción en movilidad sugerida por varios autores, en espermatozoides de varones y machos con sobrepeso y obesidad, estaría relacionada con la disminución de testosterona. Pero, además, se ha establecido que la condición de sobrepeso y obesidad aumenta el número y tamaño de adipocitos, modificando la ubicación de depósitos grasos. En varones, se ha establecido que se incrementan los depósitos grasos suprapúbicos, así como los epididimarios y en el escroto. En conejo, aumentan los depósitos supraescapulares, mesentéricos, perirenales y epididimarios. Estos depósitos grasos dificultan la termorregulación testicular necesaria para el buen funcionamiento de las gónadas y aumenta la producción de ROS; esto trae como consecuencia alteración a varios niveles desde membranales por la lipoperoxidación así como de la función mitocondrial, dado que es el organelo que más los produce y que, en el espermatozoide, se encuentran de manera helicoidal en torno a la región del cuello y, por lo tanto, afectarán la funcionalidad y batimiento del flagelo, evidenciado por cambios en el patrón de movilidad (Vigueras *et al.* 2009 y Fernández *et al.*, 2011).

Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos, presentan una morfología homogénea, que se correlaciona con su capacidad fecundante. Debido a que se reconocen variaciones morfológicas entre espermatozoides de una misma muestra de semen, en el caso de los humanos se considera que los espermatozoides son morfológicamente normales cuando han concluido el proceso de maduración (WHO, 2010). Por lo tanto, la asignación de una morfología normal solo puede hacerse con espermatozoides recuperados del aparato reproductor femenino. La evaluación morfológica de los espermatozoides en muestras de semen eyaculado de conejo se consideraron espermatozoides morfológicamente normales, cuando presentaban las características que se describen en la literatura, cuando estaban íntegros, sin duplicación, carencia o alteraciones notorias de cabeza y/o flagelo y que hayan concluido el proceso de maduración epididimaria por lo que ya no debían presentar

gota citoplasmática (Bedford, 1963; Wyrobek *et al.*, 1983; Kawai *et al.*, 2006; Roussel, 1984).

El conejo, es un animal interesante y debe estudiarse en él el efecto del aumento de los depósitos grasos. Tiene la particularidad de contar con dos escrotos y testículos completamente separados. Además, es una especie que mantiene sus anillos inguinales abiertos para permitir el paso del testículo y epidídimo de manera libre desde la zona escrotal hasta la región inguinal, aun en el animal adulto. Por ello, lo convierte en un modelo en el que se puede profundizar el conocimiento del control de temperatura del testículo así como el efecto de las ERO sobre la espermatogénesis, la maduración y el almacenamiento espermático. La viabilidad espermática aquí obtenida fue de $75.6 \pm 9.6\%$ para el grupo normopeso y $70.4 \pm 10.3\%$ para el sobrepeso, sin ser una diferencia significativa. En ratas obesas la viabilidad espermática disminuyó con respecto al grupo control un 28.88% mostrando además diferencias significativas (Vigueras *et al.*, 2009). En los conejos hipercolesteronémicos la viabilidad fue similar que en los controles (85.8 y 88.8% respectivamente) (Lancelotti *et al.*, 2013); indicando con ello, que la viabilidad es menos sensible que la movilidad para el efecto del sobrepeso y obesidad.

Con respecto a la concentración espermática no se encontró diferencia entre el grupo normopeso y sobrepeso ($483 \times 10^6 \pm 386$ vs $569 \times 10^6 \pm 453$ respectivamente). En contraste con lo reportado por Du Plessis *et al.* (2010), Hammoud *et al.* (2007) y Vigueras *et al.* (2009), donde encuentran disminución en la concentración espermática conforme aumenta el índice de masa corporal.

En conejos hipercolesterolémicos las anomalías en los espermatozoides fueron de 33.6 ± 3.5 vs $21.1 \pm 2.4\%$ en no hipercolesterolémicos, lo que significa que se incrementan las anomalías en los espermatozoides de conejo al modificar su dieta. En el grupo de sobrepeso las anomalías de cabeza fueron más, $27.5 \pm 3.5\%$ que en los normopeso, $8.29 \pm 4.5\%$ ($p < 0.05$, t Student).

Por otro lado, los procesos biológicos más importantes para que el espermatozoide adquiera la capacidad para fertilizar al ovocito son: la diferenciación espermática, la

maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal. Fisiológicamente, el segundo proceso, acontece durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, mientras que los dos últimos procesos se llevan a cabo después de que el espermatozoide fue eyaculado dentro del aparato reproductor femenino. Cuando los espermatozoides progresan dentro del conducto epididimario, desde su origen en la proximidad del testículo, hasta llegar a la cauda del epidídimo, se consideran espermatozoides maduros y al igual que los espermatozoides eyaculados, son potencialmente fértiles. Durante el proceso de capacitación espermática se han descrito cambios a nivel de la membrana plasmática, que incluyen la eliminación gradual de glicoproteínas y la modificación de la fluidez membranal. Ambos se atribuyen a la reducción del colesterol membranal así como a cambios en la distribución y composición de los fosfolípidos de membrana (Yanagimachi, 1994; Nolan *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1996; Gadella *et al.*, 1999).

En el presente se encontró que el sobrepeso tuvo efecto negativo y significativo en la capacitación espermática a las 6hr (16.5%) en comparación con la obtenida con espermatozoides del grupo de normopeso (24.6%), es decir se tuvo una disminución de capacitación espermática del 12%. En contraste, Lancellotti *et al.* (2013), en conejos hipercolesteronémicos encontraron una disminución en la capacitación del 50% con respecto al grupo control, la cual explican a través de que la dieta con 0.05% adicional de colesterol provoca incremento de su concentración en sangre pero, además, se incorpora a la membrana plasmática del espermatozoide provocando rigidez (o menor fluidez) y dificultad para alcanzar la capacitación y la funcionalidad adecuada. Asimismo, reportan que al cambiar la administración de colesterol por el aceite de oliva a 7% (como en una dieta Mediterránea) observan que la capacitación aumenta un 150% con respecto al valor inicial de los hipercolesteronémicos, explicando que los lípidos del aceite de oliva son mejores para la salud y para las funciones fisiológicas, en este caso, para la movilización del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide.

En el presente trabajo se encontró que el sobrepeso no afecta la reacción acrosomal espermática inducida *in vitro*, pues después de incubar 7 horas los espermatozoides de conejos con normopeso tuvieron el 34% de reacción acrosomal en tanto que los de sobrepeso tuvieron 38.5%, sin embargo Lancellotti *et al.* (2013), reportaron una disminución en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal inducida en el grupo de conejos hipercolesteronémicos, con respecto a los espermatozoides del grupo que no recibió colesterol.

Por otro lado, la reacción acrosomal espontánea después de incubar es muy elevada en ambos grupos, pero en el grupo sobrepeso esta es menor 20.6% vs 39.2 respectivamente. La reacción acrosomal inducida al tiempo 0 en el grupo de sobrepeso, es menor, 25.1% en comparación con el grupo normopeso, 40.5%.

Se sabe que los espermatozoides llevan a cabo reacción acrosomal espontánea en respuesta a estímulos como proteínas de la ZP, líquido folicular o progesterona (Kim y Gerton, 2001). Un espermatozoide que lleva a cabo reacción acrosomal prematura, no es capaz de fertilizar al ovocito. En ausencia de estímulos o agonistas el espermatozoide puede experimentar reacción acrosomal espontánea. Se ha reportado que la temperatura y el daño mecánico son factores que pueden promoverla. (Cherr *et al.*, 1986; Cummins y Yanagimachi, 1986)

Es importante reflexionar porqué si las condiciones de sobrepeso y obesidad han aumentado estratosféricamente en tiempos recientes en población humana, por qué razón no lo ha hecho la infertilidad en la misma proporción. Además, por qué es indeseable la obesidad entre los efectivos (machos y hembras reproductores) de una granja de producción animal, ya que, cuando un animal está en dicha condición es sometido a dieta rigurosa para normalizar su peso o, en su caso, es retirado de la función reproductiva, es decir, los problemas reproductivos de animales con peso excesivo son manifiestos. En población humana las investigaciones al respecto ponen de manifiesto que hay una relación entre el sobrepeso obesidad con la infertilidad, pero haciendo un análisis acucioso encontramos que, aun en estudios de población abierta, existen varones que obesos que no manifiestan problemas de infertilidad. En el

artículo de Hammoud *et al.* (2008), aclaran que el problema del sobrepeso y la obesidad está bien caracterizado para la mujer, no así para el hombre, en donde solo hay algunas evidencias como por ejemplo la concentración menor de testosterona total y libre, en tanto que aumenta la de estradiol. Estos mismos autores señalan que uno de los hallazgos principales en varones obesos es la incidencia de oligozoospermia ($<20 \times 10^6$ espermatozoides/ml), sin embargo, ésta existe en el 5% de los varones con normopeso y en el 15.6% de los obesos (relación 1:3) esto significa que, existen un 84.4% de varones obesos que no tienen oligozoospermia. Esto es muy relevante porque, si bien se ha descrito una relación entre el peso corporal con las anomalías de parámetros reproductivos de los varones, su incidencia es muy precaria para generar un problema serio de infertilidad poblacional; además, considerando los hallazgos de Lancellotti *et al.* (2014) que encuentran problemas en los parámetros seminológicos y espermatobioscópicos de conejos que consumen colesterol (0.05%), estos no son suficientes para generar infertilidad o subfertilidad, antes bien, demuestran que al suplir el colesterol por aceite de oliva (7%) los conejos revierten por completo las deficiencias, lo que supone en una población abierta con una dieta variada, aunque enriquecida de carbohidratos o lípidos, la naturaleza de éstos, la cantidad consumida, así como la composición total de la dieta pueden influenciar para que, a pesar de tener un peso adicional no se presenten problemas reproductivos mayores.

En relación con los conejos del presente estudio, categorizados como con sobrepeso, se tuvieron respuestas copulatorias adecuadas, para la obtención de semen. Cuando en una granja existen conejos sementales con peso excesivo, la libido se abate sensiblemente y, en caso de presentarla, la consumación del acto sexual para la eyaculación es difícil, cansándose rápidamente con los movimientos pélvicos copulatorios, razón por la cual se les somete a regímenes alimenticios controlados para que pierdan peso o, en su caso, son eliminados del grupo de reproductores, de manera que los pesos alcanzados por los animales del presente estudio no fueron lo suficiente para generales dichos problemas reproductivos.

9. Conclusiones

El sobrepeso en conejos Nueva Zelanda blanco adultos provocó anomalías en cabeza y flagelo del espermatozoide. Además se encontró que la capacitación espermática disminuye, la reacción acrosomal espontánea aumenta y la reacción acrosomal inducida disminuye.

10. Bibliografía

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm Ttype Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(23).
- Arnoult C.; Zeng Y.; Florman H.M. (1996) ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* 134:637-645.
- Alvarez J.G.; Storey B.S. (1982) Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27:1102-1108.
- Hansen B. C. and Bodkin N. L., "Heterogeneity of insulin responses: phases leading to type 2 (non-insulin-dependent) diabetesmellitus in the rhesus monkey," *Diabetologia*, vol. 29, no. 10, pp. 713–719, 1986.
- Hammoud O.A.; Nicole M.D.; Wilde, M.P.H.; Gibson M.; M.D., Anna Parks, Douglas T. Carrell, Ph.D., and Meikle A. W., M.D. (2008) Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertility and Sterility_ Vol. 90, No. 6.*
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. (2011). The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 34(5 Pt 1):402-10.
- Baldi E.; Casana R.; Falsetti C. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12:323-330.
- Bedford JM. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *J Reprod Fertil* 1963 **5**:169-177.
- Bernard Robaire, Barry T. Hinton, Marie-Claire Orgabin-Crist. (2006) capítulo 22: The epididymis. De: Knobil y Neil, *Physiology of Reproduction*. Editorial Elsevier. Volumen 1. Tercera edición p.p. 1076, 1084-1086.
- Bodkin N. L.; Ortmeyer H. K.; and Hansen B. C. (1993) "Diversity of insulin resistance in monkeys with normal glucose tolerance," *Obesity Research*, vol. 1, no. 5, pp. 364–370.

- Bonascorsi L, Krausz C, Pecchioli P, Forti G, Baldi E. Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C independent. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(3):259-268.
- Brown PJ and Bentley-Condit VK. Culture, Evolution, and Obesity. En: *Handbook of Obesity.* NY.2000.
- Brooks D.E. (1983) Epididymal function and their hormonal regulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 36:205-221.
- Cachofeiro Victoria, Miana María, Fernandez-Martín Beatriz, De las Heras Natalia, Lahera Vicente. (2006) Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. *Rev. Esp. Obes.* 4 (4): 195-204.
- Cervantes M.I.; Arenas-Ríos E.; León G.M.A.; Ambríz D.A.; Rosado G.A.(2008) Spermatozoa Epididymal Maturation in the Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 54:196-204.
- Cherr, G.N., Lambert, H., Meizel, S. and Katz, D.F. (1986) In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction; completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zona pellucida. *Dev. Biol.*, 114, 119-131.
- Clark E.A.; Shatill S.J.; Brugge J.S. (1994) Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *TIBS.* 19:464-469.
- Colenbrander B.; Barend M. and Gadella B.M. (2011) Bicarbonate stimulated phospholipids scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*; 114:3543-3555.
- Collins S.; Martin T. L.; Surwit R. S. and Robidoux J. (2004) Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics, *Physiology and Behavior*, vol. 81, no. 2, pp. 243–248.
- Cross N. L. (1998) Role cholesterol in sperm capacitation. *Biol. REprod*; 59:7-11.

- Cross N.L., Razy-Faulkner P. (1997) Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* 56:1169-1174.
- Cummins, J.M. and Yanagimachi, R. (1986) Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa *in vitro*, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete. Res.*, 15, 187-212.
- DasGupta S.; Mills C.L.; Fraser L.R. (1991) Ca²⁺ related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. reprod, Fertil.* 99:135-143.
- De Lamirande E.; Gagnon C. (1995) Impacto of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reprod.* 10(suppl 1):15-21.
- Eddy E. M. (2006) Capítulo 1: The spermatozoon. De: Knobil y Neil: *Physiology of Reproduction*. Editorial Elsevier. Volumen 1. Tercera edición P.p: 4-5.
- Fernandez D. B.; Bellentani F.; Fernandes Fernanda; Glaura S. A.; Perobelli E. Juliana; Favareto A. Ana Paula; Nascimento F. André; Cicogna C. Antonio; Kempinas D.G. Wilma. (2011) Diet-induced Obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:32 1-10.
- Frits M.; Flesh F. M.; Brouwers J. F.; Nievelstein P.F.E.M.; Verkleij A.J. and Golde L.M.
- Florman H.M.; Lemos J.R.; Arnoult C.; Kazam I.; Li C.; O'Toole C.M.A. (1998) A tale of two channels: a perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm. *Biol. Reprod.* 59:12-16.
- Gadella B.M.; Pei-Shiue T.; Boerke A. B. (2008) Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*; 52: 473-480.
- García Macedo R. (2000) Efecto de los inhibidores de H⁺-ATPasas durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. Tesis doctoral.

- Hunter T. (1996) Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Biochem. Soc Trans.* 24:307-327.
- Ikeda H.S.; Matsuo T. A.; Iwatsuka H. and Suzuoki Z. (1981) "A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty)," *Diabetes*, vol. 30, no. 12, pp. 1045–1050.
- Jha K.N.; Shivaji S. (2002) Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev*; 63: 119- 130.
- Kawai Y.; Hatas T.; Suzuki O.; Matsuda J. (2006) The relationship between sperm morphology and in Vitro fertilization ability in mice. *J Reprod Dev* 52(4):561-668.
- Kim K. S.; Foster J. A. and Gerton, G. L. (2001) Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol. Reprod.* 64, 148-156.
- Kopelman P. (2007) Health risks associated with overweight and obesity. *Obesity Reviews*, vol. 8, no. 1, pp. 13–17.
- Langlais J., Roberts K.D. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12:183-224.
- Leclerc P. y Kopf G.S. (1999) Evidence for the role of heterotrimeric guanine nucleotidebinding regulatory proteins in the regulation of mouse sperm adenylyl cyclase by the egg's zona pellucida. *J Androl*; 20(1):126-134.
- Leyton L. y Saling P. (1989) 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding; 57(7):1123-1130.
- Libersky E.A. y Boatman D.E. Progesterone concentration in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during the periovulatory period. *Biol Reprod* 1995; 53(3):477-482.
- Martini A. C.; Andrea T.; Daniel E.; Rosa I. M.; Arnaldo M.; Marta F. de Cuneo and Ruben D. R. (2010) Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and Sterility*.

- Meredith A. (2012) Is Obesity a problem in pet rabbits? *Veterinary Record* 171: 192-193.
- Nolan M.A., Babcock D.F., Wennemuth G., Brown W., Burton K.A. (2004) Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 13483-8.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010) *Obesidad y Sobrepeso. Nota descriptiva No. 311.* www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/ Consultada el 13 de Febrero del 2012.
- Roussel A.M C. (1984) Strain differences in the concentration, motility and morphology of epididymal sperm in relation to puberty in mice. *Int. J Andrology*, 7(4):334-47.
- Saez-Lancellotti T. E.; Boarelli V. P.; Romero A. A.; Funes A. K.; Cid-Barria, Cabrillana E.M.; Monclus M.A.; Simón L.; Vicenti E. Amanda and Fornés W. M. (2013) Semen Quality and Sperm Function Loss by Hypercholesterolemic Diet Was Recovered by Addition of Olive Oil to Diet in Rabbit. *PLoS ONE* 8(1).
- Srinivasan K. and Ramarao P. (2007) "Animal models in type 2 diabetes research: an overview," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 125, no. 3, pp. 451-472.
- Teerds, K.; Rooij de D.G. and Keijer, J. (2011) Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Human reproduction updates* 17: 667-683. Trowell H.C.; Burkitt D.P.; (1981) *Western diseases: their emergence and prevention.* Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Teijeiro M. Juan; Dapino G. Dora and Marini E. Patricia. (2011) Porcine oviduct sperm binding glycoprotein and its deleterious effect on sperm: a for negative selection of sperm? *Biol. Resp.* 44: 329-337.

- 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.
- Universidad de Costa Rica. Laboratorio de ensayos biológicos LeBi (2012). Biomodelos disponibles de investigación y docencia. Costa Rica. <http://lebi.ucr.ac.cr/> Consultada el 3 de Marzo del 2012.
- Viguera-Villaseñor R. M.; Rojas-Castañeda J.C.; Chávez-Saldaña M.; Oscar Gutiérrez-Pérez O.; García-Cruz M.E.; Cuevas-Alpuche O.; Reyes-Romero M.M.; Zambrano E. (2009) Alterations in the spermatid function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica* 10: 004.
- Visconti P.E.; Bailey J.L.; Moore G.D.; Pan D.; Olds-Clarke P.; Kopf G.S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121:1129-1137.
- Visconti P.E.; Muschietti J.P.; Flawia M.M.; Tezon J.G. (1990) Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*. 1054:231-236.
- Visconti P.E.; Johnson L.; Oyaski M.; Fornés M; Moss S.B.; Gerton G.L.; Kopf G.S. (1997) Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 192:351-363.
- Visconti P.E. and Kopf S.G. (1998) Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biol. Rep.* 59: 1-6.
- Vredenburg-Wilberg W.L.; Parrish J.J. (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 40:490-502.
- WHO World Health Organization. (2010) WHO Laboratory manual for the examination of human semen. 5th ed. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland, p 271.
- Wolf D. D; Hagopian S.S.; Isogima S. (1986) Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after activation during in vitro capacitation in the mouse. *J. cell Biol.* 102:1372-1377.

- Wyrobek A.J.; Gordon L.A.; Burkhart J.G.; Francis M.W.; Kapp R.W.; Jr, Letz G.; Mailing H.V.; Tophamop J.C. and Whorton M.D. (1983) An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 115(1):1-72.
- Yanagimachi. (1994) Mammalian Fertilization. En: E Knobil E, Neil JD *Physiology of Reproduction*, Second edition. Raven Press LTD. Nueva York. P.p: 189-317.
- Zeng Y.; Oberdorf J.A.; Florman H.M. (1996) pH regulation in mouse sperm identification of Na, Cl² and HCO₃ dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. *Dev. Biol.* 173:510-520.

Apéndice 1: Reactivos y Soluciones

- Solución Eosina-Nigrosina para viabilidad espermática.

Eosina 1% en agua destilada

Nigrosina 10% de agua destilada

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

Diluir en citrato de amonio

- Kit Espermaform

50 ml colorante A

50 ml colorante B

50 ml de fijador

Este kit permite distinguir las diferentes estructuras del espermatozoide, para la evaluación de la morfología de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS).