



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD EN LA ACTIVIDAD DE LAS
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO DE RATA WISTAR”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

B. E. JAQUELINE POSADAS RODRÍGUEZ

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

Asesora: **Dra. Edith Arenas Ríos**

Asesora: **Dra. Herlinda Bonilla Jaime**

México. DF. 2020

COMITÉ TUTORIAL

Directora:

Dra. Ma. del Rosario Tarragó Castellanos

Departamento de Biología de la Reproducción

Línea de investigación: Efecto de disruptores endocrinos en la reproducción en diferentes etapas del desarrollo.



Asesoras:

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción

Línea de investigación: Morfofisiología y Bioquímica del espermatozoide



Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Departamento de Biología de la Reproducción

Línea de investigación: Neuroendocrinología de la depresión.



JURADO EVALUADOR

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Laboratorio de Biología de la Reproducción
Facultad de Ciencias Biológicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

ABREVIATURAS

ABP, proteína transportadora de andrógenos

17 β -HSD, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

BSA, albumina sérica bovina

CAT, catalasa

DHT, 5 α -dihidrotestosterona (dihidrotestosterona)

DS, desviación estándar

EE, error estándar

E₂, estradiol

EROs, especies reactivas de oxígeno

FSH, hormona folículo estimulante

GPx, glutatión peroxidasa

GPx/ GR, glutatión reductasa

GSSG, glutatión oxidado

HHG, eje hipotálamo-hipófisis-gónada

IMC, índice de masa corporal

LH, hormona luteinizante

LPO, lipoperoxidación

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido

RA, receptor para andrógenos

SOD, superóxido dismutasa

RL, radical libre

RESUMEN

La obesidad es un problema de salud mundial, el cual ha ido en aumento en los últimos años, y se le ha asociado con diversas alteraciones, entre las cuales se mencionan las cardiopatías, cáncer, diabetes, problemas metabólicos, así como, la infertilidad masculina, debido a que se han presentado casos de hombres obesos con problemas de subinfertilidad y alteración en los parámetros espermáticos, razón por la cual ha llevado a distintos investigadores a estudiar la relación entre el índice de masa corporal (IMC) y la calidad seminal, reportando que durante la obesidad se genera un incremento de tejido adiposo el cual es capaz de inducir alteraciones endocrinas y físicas. A pesar de esto pocos estudios le han dado importancia al sobrepeso, de tal modo que se desconoce si ya en estados fisiológicos de sobrepeso se suscitan cambios que pudieran causar modificaciones en los factores hormonales y físicos.

Por otro lado, se sabe que, en estados fisiológicos normales, las especies reactivas de oxígeno (EROs) se encuentran presentes en todas las células, las cuales son moléculas que tienen la capacidad de actuar como segundos mensajeros estimulando respuestas como la supervivencia, pero cuando estas moléculas sobrepasan concentraciones fisiológicas normales se genera estrés oxidante que trae consigo daño o muerte celular. Para contrarrestar el posible efecto nocivo de EROs, está presente el sistema enzimático antioxidante, el cual se compone de: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

Debido a la importancia que cumplen estas enzimas antioxidantes como agentes protectores para las células, es de relevancia conocer si están implicadas en la protección en el tracto reproductor masculino, pues poco se ha descrito en cuanto a las alteraciones físicas implicadas en la obesidad y hasta el momento se desconoce si el incremento de tejido adiposo en la zona escrotal, pudiese alterar la actividad enzimática antioxidante y también se desconoce cuáles antioxidantes se encargan de brindar protección.

Por ello en este trabajo se plantea que al inducir sobrepeso u obesidad por una dieta hiperlipídica, se verá alterada la función de las enzimas antioxidantes en el testículo y epidídimo de la rata Wistar, como respuesta ante el posible estrés oxidante. Para lo cual, se evaluaron parámetros espermáticos de viabilidad y morfología en el semen de ratas Wistar, a las cuales se les administró una dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas y se encontró que el porcentaje de espermatozoides vivos se ve disminuido en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al grupo control, además de que se presentó un incremento en las anomalías del espermatozoide principalmente de pieza media, flagelo angulado y enrollado en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al grupo control.

En cuanto a la actividad específica de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPx, se obtuvo un aumento en las actividades enzimáticas de los antioxidantes para los grupos de ratas con sobrepeso y obesidad comparado con los controles que recibieron una dieta balanceada, estos resultados indican que probablemente se debe a un incremento en la producción de ERO en los estados fisiológicos de sobrepeso y obesidad, como un intento por proteger a las células contra el daño oxidativo.

Por tanto, el sistema de protección enzimático antioxidante es eficiente al proteger contra el daño de EROs, siendo las condiciones de sobrepeso y obesidad factores que pueden inducir subfertilidad, al comenzar a presentarse daños en la calidad espermática.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Aparato reproductor masculino.....	12
2.2 Estructura y componentes del testículo.....	12
2.3 Principales tipos celulares en testículo.....	14
2.4 Espermatogénesis.....	16
3. Estructura y regiones del epidídimo.....	17
3.1 Principales tipos celulares del epidídimo	17
3.2 Función epididimaria: maduración y almacenamiento de espermatozoides	19
4. Regulación hormonal en testículo y epidídimo	20
4.1 Regulación hormonal mediada por el eje HHT	21
5.0 Especies Reactivas de Oxígeno.....	21
5.1 Radicales Libres	22
5.2 Principales especies reactivas de oxígeno.....	23
5.3 Estrés oxidante.....	25
5.4 Señalización celular y las EROs.....	27
5.6 Defensas antioxidantes.....	28
5.7 Sistema antioxidante enzimático	29
5.8 Enzimas antioxidantes en el tracto reproductor masculino	31
6. ANTECEDENTES.....	33
6.1 Dietas e inducción de sobrepeso y obesidad	33
6.2 La obesidad como factor de infertilidad masculina	33
6.3 Incremento de temperatura escrotal.....	35

7. JUSTIFICACIÓN.....	37
8. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	38
8.1 Objetivo general	38
8.2 Objetivos específicos.....	38
9. Hipótesis	38
10. MATERIAL Y MÉTODO.....	39
10.1 Diseño Experimental	39
10.2 Dietas en los grupos experimentales	40
10.3 Sacrificio de los grupos experimentales	41
10.4 Obtención de órganos (testículo y epidídimo) en los grupos experimentales	41
10.5 Extracción de espermatozoides de rata	41
10.6 Evaluación espermática.....	42
10.7 Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	43
11. Análisis estadístico	44
12. RESULTADOS	45
13. DISCUSIÓN	57
14. CONCLUSIONES	68
15. BIBLIOGRAFÍA	69
16. APÉNDICE.....	83

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad se definen como un exceso de energía, la cual se deposita en forma de grasa, se caracterizan por el aumento de peso, siendo este, resultado del desbalance entre el consumo calórico y gasto energético (Cabler, et al., 2010; OMS, 2018).

La medida más utilizada para determinar el grado de obesidad que es dañino para la salud en el humano, es el índice de masa corporal (IMC), el cual se encarga de categorizar los niveles de masa corporal como: bajo peso, normopeso, sobrepeso y obesidad; el IMC está dado en (Kg/m^2), el cual indica la relación entre peso y talla al cuadrado y de acuerdo a la OMS; define al sobrepeso cuando el IMC de un individuo es mayor o igual a $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y obesidad cuando el IMC es mayor o igual a $30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ (Du Plessis, et al., 2010; OMS, 2018).

De acuerdo a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), se estimó que más de dos terceras partes de la población tendrán sobrepeso u obesidad para el 2020. En donde México proyecta ser uno de los países con una creciente población con obesidad y sobrepeso a nivel mundial, donde fallecen 4.3 millones de personas adultas anualmente (Juárez, et al., 2011; OMS 2018).

Epidemiológicamente la obesidad, no solo ha sido foco principal de defunciones en la población mundial, si no también, aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, síndrome metabólico, así como, infertilidad masculina (Juárez. et al., 2011). Tanto el sobrepeso como la obesidad, generan alteraciones en el organismo que afectan a la salud, además, en los últimos 50 años se ha correlacionado el incremento del IMC con respecto a la disminución en la fertilidad masculina, en donde se han reportado hombres con un IMC mayor a 30, los cuales presentan hipogonadismo, lo que altera la calidad espermática (Eisenberg ML, 2014; Fan Y, 2015). Se ha observado que la disminución de la

calidad seminal y el potencial reproductivo masculino, continúan disminuyendo anualmente, observando los mismos patrones en otros países en los que es frecuente la obesidad (Cabler, *et al.*, 2010; Jia, *et al.*, 2018); reportando que la mayoría de los pacientes infértiles presentan obesidad o bien, que en las parejas que experimentaban subfertilidad, la pareja masculina era obesa; lo que insinúa alto riesgo de subfertilidad al reducir la capacidad de reproducción (Magnusdottir, *et al.*, 2005).

Existen evidencias de que en estados fisiológicos de obesidad tanto en modelos animales como en humanos se presenta un incremento de tejido adiposo y se ha reportado que tiene efectos negativos en la fertilidad masculina, asociando el incremento de tejido adiposo con el aumento en las alteraciones hormonales y físicas, como el incremento de la temperatura escrotal (Raad, *et al.*, 2016; Viguera-Villaseñor, *et al.*, 2010); en cuanto a las alteraciones hormonales han referido una baja concentración de testosterona y un incremento en los niveles de estradiol y leptina, sin embargo, en cuanto a los factores físicos solo se ha sugerido que la presencia e incremento de tejido adiposo en la zona escrotal pudiera incrementar la temperatura en esta área y conducir al desarrollo de estrés oxidante, de modo que el conjunto de estos factores, podrían estar afectando el microambiente testicular y epididimario, induciendo alteraciones en la fertilidad (Cabler, *et al.*, 2010; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2010).

MARCO TEÓRICO

2.1 Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino se compone de estructuras internas y externas, de las estructuras internas cabe destacar el testículo y el epidídimo; ya que la importancia de estas estructuras radica en sus funciones, pues a través de ellas se formará y adquiere la capacidad fertilizante el gameto masculino (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

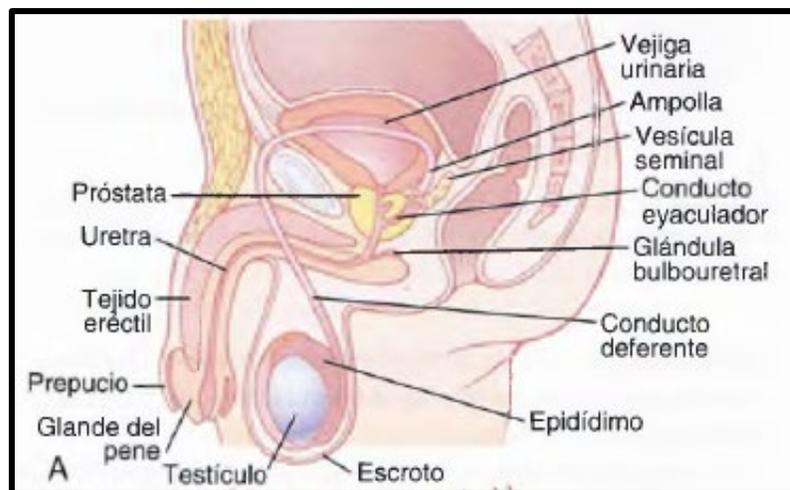


Figura 1. Imagen que muestra las distintas partes del aparato reproductor masculino. Adaptada de Arthur C. Guyton and John E. Hall, 2011.

2.2 Estructura y componentes del testículo

El testículo, es un órgano ovoide, se encuentra en pares y están alojados en el escroto, fuera de la cavidad abdominal; están recubiertos por la túnica albugínea que es una cápsula de tejido conectivo que los protege, además de intervenir en la regulación del flujo sanguíneo y del movimiento de los espermatozoides a través de contracciones rítmicas (Robaire y Hamzeh, 2011). Principalmente cumple con dos funciones básicas: la síntesis endocrina de esteroides y el proceso de formación de espermatozoides, conocido como espermatogénesis (Ganong, 2002; Hiatt y Gartner, 2003; Knobil, 2006).

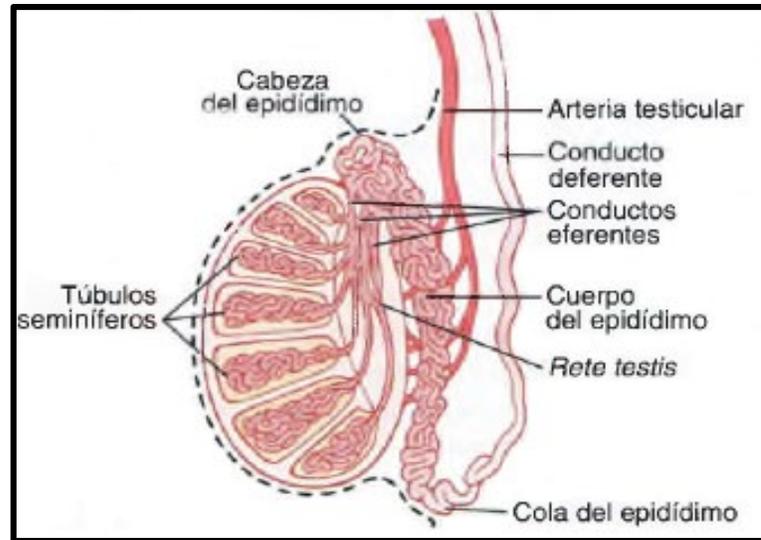


Figura 2. Estructura interna del testículo y epidídimo. Adaptada de Arthur C. Guyton and John E. Hall, 2011

En el interior de cada testículo se ubican los túbulos seminíferos en donde se lleva a cabo la espermatogénesis, estos túbulos seminíferos desembocan en la *rete testis*, que son canales anastomosados que se ubican dentro del medistino testicular y cuyo epitelio está involucrado en la endocitosis de proteínas y moléculas procedentes del lumen de los túbulos seminíferos. La *rete testis* se continúa con los conductos eferentes los cuales se comunican con el epidídimo (Robaire y Hamzeh, 2011; O'Donnell, *et al.*, 2017).

Cada túbulo seminífero está revestido por una lámina propia que contiene células mioepiteliales contráctiles cuya función es movilizar a los espermatozoides inmaduros a la *rete testis*; el interior de los túbulos está conformado por epitelio seminífero, el cual está constituido por células somáticas de Sertoli y células germinales masculinas, las cuales se encuentran en diversas etapas de desarrollo, además el epitelio seminífero está rodeado por una membrana basal y células miofibroblásticas, mientras que entre los túbulos se haya el espacio intersticial característico por contener células de Leydig, sangre, vasos linfáticos y células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

2.3 Principales tipos celulares en testículo

- Las **células de Leydig** se ubican en el espacio intersticial y estas suelen formar agrupaciones las cuales se encuentran en estrecho contacto con los vasos sanguíneos. Su tamaño es de 20 μm y su función principal es la producción de hormonas esteroideas, lo que permite mantener a la espermatogénesis, la maduración espermática epidídima y los caracteres sexuales secundarios masculinos (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016) .
- Las **células de Sertoli**, son células somáticas ubicadas internamente en los túbulos seminíferos, que brindan soporte físico y nutricional a las células germinales, interviniendo en la diferenciación y función de las células germinales y endoteliales, sin embargo, también se encargan de fagocitar aquellas células que se degeneran, permiten además la liberación de espermátidas maduras. Estas células también regulan la espermatogénesis, lo cual está en relación de su número y función (Robaire y Hamzeh, 2011; O'Donnell, *et al.*, 2017).

Las células de Sertoli forman uniones de oclusión, lo que contribuye a formar la barrera hematotesticular, cruciales para generar el microambiente especializado que permite y contribuyen al desarrollo de las células germinales, al impedir la difusión o el paso de sustancias de la circulación o intersticio hacia la parte interna de los túbulos seminíferos. Las células germinales están cercanas a la membrana basal de los túbulos seminíferos, permitiendo que las células germinales tengan una comunicación directa con el intersticio, sin embargo, las células germinales que se encuentran en etapas de meiosis y aquellas que aparecen en estados de diferenciación haploides, se encuentran alejadas de la barrera hematotesticular, y por ende, su desarrollo y microambiente dependen por completo de las células de Sertoli (Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017). Además, las células de Sertoli contienen receptores de FSH, mientras que las células de Leydig y las células espermatogénicas contienen receptores de LH (Robaire y Hamzeh, 2011). Las células de la serie espermatogénica, se componen por células basales denominadas espermatogonias siendo las células pluripotentes más indiferenciadas, las cuales se encargan de la producción de espermatozoides (Ross

y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017). Después de las espermatogonias, se encuentran los espermatocitos que surgen de la división mitótica de las espermatogonias, a partir de las cuales destacan los espermatocitos primarios y los espermatocitos secundarios. Posteriormente se encuentran las espermatídas las cuales surgen de la segunda división meiótica de los espermatocitos secundarios por lo cual presentan la mitad del contenido cromosómico y finalmente en la zona luminal se ubican los espermatozoides, que son las células más diferenciadas y cuya estructura se caracteriza principalmente por contener una cabeza y un flagelo (Knobil, 2006; O'Donnell, *et al.*, 2017).

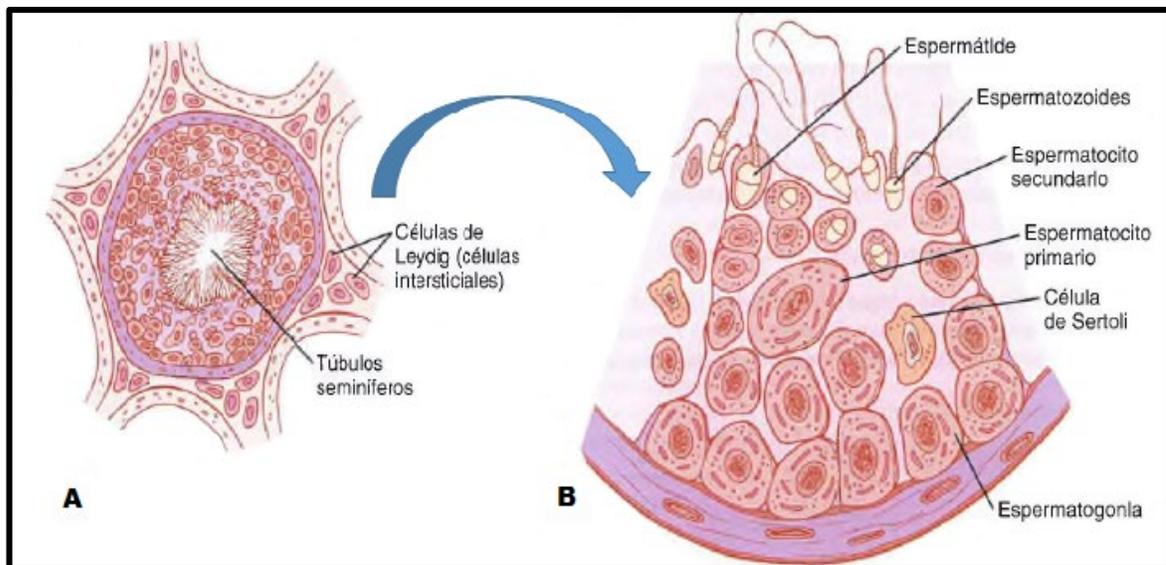


Figura 3. Epitelio testicular. A. Corte transversal en túbulo seminífero donde se muestran las células que conforman este epitelio. B. Fases del desarrollo de los espermatozoides. Adaptada de Arthur C. Guyton and John E. Hall, 2011.

En el testículo la testosterona cumple varias funciones como son: mantener las uniones celulares específicas entre células de Sertoli, la progresión mitótica, la maduración espermática, la barrera hematotesticular (BTB), así como, la asociación con las células de Sertoli, procesos que en conjunto van a generar el ambiente idóneo para que se efectúe la diferenciación de las células germinales a espermatozoides (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

2.4 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso por el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides (Knobil, 2006; O'Donnell, *et al.*, 2017), el proceso comienza con una fase proliferativa de espermatogonias a espermatocitos mediante el proceso de mitosis, que inicia con la síntesis de ADN, permitiendo la formación de un gameto tetraploide, dando origen a los cromosomas homólogos y efectuar posteriormente una recombinación meiótica, al final los espermatocitos de primer orden, llevan a cabo dos divisiones meióticas, diferenciándose primero en espermatocitos de segundo orden y luego en espermátidas (ambos haploides); una vez formadas las espermátidas sufren un proceso de espermiogénesis el cual implica una serie de transformaciones para convertirse en espermatozoides, estas transformaciones se presentan simultáneamente e implican: la reducción nuclear, la condensación del material genético dado por la sustitución de histonas por protaminas, formación de la vesícula acrosomal a partir del aparato de Golgi, crecimiento de un flagelo a partir de la región centriolar, reacomodo mitocondrial en la parte proximal del flagelo, reducción citoplasmática y formación del cuerpo residual, para finalmente inducir la liberación del espermatozoide inmaduro a la luz del túbulo, para su posterior paso al epidídimo, que es el lugar en donde se lleva a cabo el proceso de maduración espermática (Hiatt y Gartner, 2003; O'Donnell, *et al.*, 2017). Una vez que los espermatozoides abandonan el testículo, aún no han adquirido la capacidad para fertilizar a un ovocito, por lo que requieren pasar por otro proceso a través de la estructura denominada epidídimo en donde van adquirir la capacidad fertilizante y la movilidad (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

Las células de Sertoli mantienen el proceso de espermatogénesis, a través de la síntesis de una proteína fijadora de andrógenos (ABP), cuya finalidad es unir a la testosterona impidiendo que esta salga de los túbulos seminíferos, incrementando así los niveles de testosterona hasta alcanzar concentraciones idóneas que la mantengan (Hiatt y Gartner, 2003; O'Donnell, *et al.*, 2017).

3. Estructura y regiones del epidídimo

El epidídimo es un túbulo que se encuentra súper enrollado y consta de una capa fibrosa que lo recubre, se encuentra ubicado en el polo posterior del testículo. En el epidídimo se describen cuatro segmentos principales: *Segmento inicial*, cuya función es recibir al flujo que contiene a los espermatozoides inmaduros, *Caput*, donde los espermatozoides comienzan la maduración, *Corpus*, que es la región más estrecha y es aquí en donde los espermatozoides adquieren la movilidad y terminan la maduración, además este segmento se conecta con la última región denominada *Cauda*, la cual tiene una apariencia globosa y se encarga en la mayoría de las especies, del almacenamiento de los espermatozoides (pueden permanecer almacenados por más de cuatro semanas) (Knobil, 2006; Robaire y Hamzeh, 2011; O'Donnell, *et al.*, 2017).

En las regiones del epidídimo se encuentran distintos tipos celulares, que brindan soporte, estabilidad al órgano, así como el microambiente ideal para los espermatozoides, la expresión de genes y síntesis de proteínas se expresan de diferente forma en cada región del epidídimo (Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016; Ruiz V.L., *et al.*, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

3.1 Tipos celulares del epidídimo

- **Células principales:** se encuentran a lo largo del conducto epididimario, pero con diferencias estructurales en cada región y constituyen entre el 65 y el 80% del total de las células que conforman el epidídimo. Una de sus principales funciones es la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, también se encargan de absorber los fluidos que provienen del testículo y secretan proteínas, serotonina, prostaglandinas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y electrolitos (Robaire y Hamzeh, 2011).
- **Células basales:** efectúan una marcada síntesis de proteínas que liberan al lumen, además de mantener el ambiente iónico y el pH del epidídimo para generar un microambiente adecuado y se encuentran presentes a lo largo del conducto epididimario (Robaire y Hamzeh, 2011).

- **Células de Halo:** cumplen un papel inmunológico y de fagocitosis, se encuentran presentes en todo el epitelio epididimario (Robaire y Hinton, 2015).
- **Células claras:** solo están presentes en la etapa adulta de los mamíferos y se encuentran únicamente en el segmento inicial y zona intermedia, tienen una función endocítica e intervienen en la secreción de iones H^+ hacia la luz del epidídimo (Robaire y Hinton, 2015).
- **Células apicales y estrechas:** las apicales están presentes en el segmento inicial y la zona intermedia, mientras que las estrechas se ubican a lo largo del conducto epididimario y ambas participan conjuntamente en la acidificación del fluido seminal (Robaire y Hinton, 2015).

La testosterona no solo es esencial para que se efectúe la espermatogénesis en el testículo, también es la responsable de mantener la estructura y la función del epidídimo, pues se encargan de la secreción de glicoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos hacia el lumen del epidídimo, originando el denominado flujo epididimario, necesario para la supervivencia y maduración de los espermatozoides (O'Donnell, *et al.*, 2017; Robaire y Hamzeh, 2011; Ross y Pawlina, 2016).

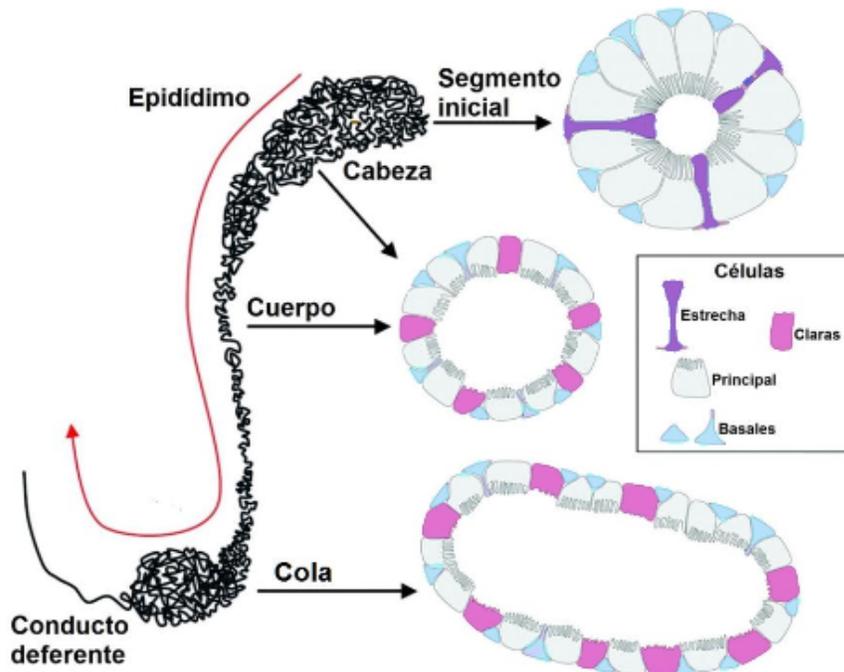


Figura 4. Esquema representativo del epidídimo, donde se señalan las tres regiones que lo componen (cabeza o *caput*, cuerpo o *corpus* y cola o *cauda*), así como los tipos celulares encontrados en el epitelio epididimario. Adaptado de Shum *et al.*, 2009.

3.2 Función epididimaria: maduración y almacenamiento de espermatozoides

El espermatozoide recién formado y liberado a la luz de los túbulos seminíferos en el testículo, aun es un espermatozoide inmaduro, es decir no tiene la capacidad de fertilizar a un ovocito, para ello le hace falta pasar por una serie de cambios denominados capacitación fertilizante (Olivera, *et al.*, 2006), estos cambios consisten en una serie de modificaciones estructurales que le permitirán al espermatozoide adquirir capacidad de movimiento para alcanzar su objetivo y cambios en sus membranas para que se produzca la fusión de su material genético con la del gameto femenino.

En el epidídimo, los espermatozoides sufren el proceso de maduración que consiste en adquirir de forma gradual la capacidad fecundante, la cual se acompaña de cambios físicos y morfológicos. Este proceso da inicio en el testículo y continua después de que éstos son liberados en la luz de los túbulos seminíferos, pasando al sistema de túbulos eferentes y enseguida al epidídimo; entre las transformaciones que experimenta el espermatozoide para adquirir la maduración, está la adquisición de la movilidad, cambios morfológicos (migración de la gota citoplasmática, condensación del acrosoma), modificaciones físicas (autoaglutinación, aumento de la densidad específica, etc.) y alteraciones nucleares (Regalado Sánchez, 1992; Gatti, *et al.*, 2004).

Una vez que el espermatozoide ha adquirido estas características en su tránsito por el epidídimo, son almacenados en la cola del epidídimo hasta su eyaculación. Una vez eyaculado el semen y depositado en el tracto femenino, los espermatozoides viajan hasta el istmo, donde son retenidos por las criptas oviductales, lo que da comienzo a la capacitación, que es el proceso mediante el cual los espermatozoides pierden los factores decapacitantes, lo que conlleva al proceso de capacitación, donde el espermatozoide adquiere la hiperactivación y la reacción acrosomal, para finalmente ser liberado de las criptas hacia el ámpula para su encuentro con el oocito, donde se da el reconocimiento y adherencia para que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida (Olivera, *et al.*, 2006; Gatti, *et al.*, 2004; Robaire, *et al.*, 2006; Visconti, *et al.*, 2011).

4. Regulación hormonal en testículo y epidídimo

Testículo y epidídimo son órganos andrógeno dependientes, los andrógenos son hormonas esteroideas implicadas en diversas funciones, entre las que se encuentra el mantenimiento de la morfofisiología de estos órganos. La testosterona se sintetiza y secreta en los testículos por las células de Leydig, la cual se une a ABP y la dirige hasta sus células blanco, sean estas las células de Sertoli en el testículo o bien puede ser transportada hasta el epitelio epididimario, una vez que llega a su célula blanco la testosterona es reconocida por el receptor de andrógenos (RA) y una vez que se internaliza en la célula, la testosterona sufre una transformación a 5α -dihidrotestosterona (DHT), reacción que es mediada por la 5α -reductasa, siendo este metabolito la forma activa de la testosterona (Robaire y Hamzeh, 2011).

Sin embargo, estos órganos no solo son regulados por andrógenos sino también por estrógenos, los cuales de igual forma son mediados por la testosterona, de tal modo que esta no solo se transforma en DHT si no también puede ser aromatizada a 17β -estradiol (E_2) por medio de la enzima aromatasa P450, siendo estos procesos indispensables para mantener y asegurar que se desarrollen los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento espermático (Kerkhofs, *et al.*, 2012; Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2016).

La importancia de los estrógenos radica en que estos participan en la diferenciación de las células germinales pues permite que éstas logren diferenciarse a espermatozoides, debido a que se ha reportado la presencia de receptores de estrógenos (RE) en células de Sertoli, Leydig, germinales, espermaticitos, espermatogonias, así como en la gota citoplasmática de espermatozoides, lo que indica que su participación junto con la testosterona es indispensable para mantener el ambiente idóneo que permita el desarrollo y supervivencia de los espermatozoides; de igual manera se han encontrado también receptores de estrógenos en la *rete testis*, conductos eferentes y en el *caput, corpus* y *cauda* del epidídimo, siendo los estrógenos también indispensables para que se realice la maduración espermática (Couse, *et al.*, 1997; Hess, *et al.*, 1997b; Sar y Welsch, 2000).

4.1 Regulación hormonal mediada por el eje HHT

La función testicular no es autónoma, pues se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT), el cual constituye un sistema que regula y mantiene el equilibrio de los niveles hormonales hipofisarios y testiculares (Cabler, *et al.*, 2010; Oliveira, *et al.*, 2017).

La estimulación hormonal necesaria para que se efectúe la espermatogénesis comienza en el hipotálamo con la producción del factor liberador de gonadotropina GnRH, el cual estimula al lóbulo anterior de la hipófisis para secretar la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales actúan sobre las células de Leydig y las de Sertoli. La secreción de GnRH es modulada por neurotransmisores, los cuales son estimulados por impulsos alfa adrenérgicos, de modo que la GnRH es liberada por el hipotálamo de forma pulsátil; la amplitud y frecuencia de los impulsos de GnRH son los que condicionan la liberación de las hormonas FSH y LH (Cabler, *et al.*, 2010; Chavarro, *et al.*, 2010; Du Plessis, *et al.*, 2010) . FSH y LH son transportadas por el torrente sanguíneo hasta alcanzar su órgano blanco: el testículo. En el testículo, FSH se une a sus receptores ubicados en las células de Sertoli, estimulando la liberación de inhibina B y activina, las cuales regulan la secreción de FSH; mientras que LH en las células de Leydig, regula y estimula la síntesis de testosterona (González, 2017; Ross y Pawlina, 2016; O'Donnell, *et al.*, 2017).

5.1 Especies Reactivas de Oxígeno

Durante los últimos 50 años las EROs han emergido como importantes reguladores de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tal es el caso del papel que ejercen sobre la fertilidad masculina. En concentraciones moderadas y controladas, los radicales libres (RL) son indispensables para que se lleve a cabo el proceso de maduración y capacitación del espermatozoide. Pero al aumentar la generación de RL y disminuir su eliminación, a través de los antioxidantes, se presenta un impacto negativo sobre los gametos masculinos causándoles daños a nivel de ADN o bien

induciéndoles procesos de peroxidación lipídica en la membrana celular, con lo cual se compromete la viabilidad de los mismos.

5.2 Radicales Libres

El estrés oxidante es un proceso que ocurre a nivel celular y se refiere a un desbalance entre el aumento de la producción de RL y el decremento del sistema antioxidante (Gutiérrez, 2002; Valdecantos, *et al.*, 2009).

Los RL son moléculas que se caracterizan por contener en su última órbita uno o más electrones desapareados, lo que les da un carácter paramagnético, volviéndolas moléculas muy inestables y altamente reactivas con capacidad para atacar cualquier tipo de biomolécula; cuando los RL interactúan con biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) que forman parte de la estructura celular pueden generar un daño, al tratar de recuperar su estabilidad electrónica. Además, los RL tienen una vida media relativamente corta y se demostró que la reactividad de estas moléculas se correlaciona inversamente con la vida media y la capacidad de difusión en el medio celular (Finkel y Holbrook, 2000; Elejalde, 2001).

La formación de RL puede darse a través de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común. Una vez formado el RL, busca la manera de conseguir una configuración estable por ello interactúa con otras biomoléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). Dicho mecanismo genera la producción de RL, que posteriormente se continúa como una reacción en cadena (Corrales y Muñoz, 2012).

Algunos investigadores clasifican a los RL de acuerdo al grupo funcional presente en la molécula: bromo, nitrógeno, tioles, fósforo, oxígeno, cloro, entre otros, aunque los denominados especies reactivas de oxígeno (ERO) son los más comunes y son de gran importancia debido a su participación en diferentes procesos aeróbicos (Macedo-Márquez, 2012).

En el caso de radicales libres cuyo grupo funcional es el oxígeno, se les denomina ERO. El oxígeno molecular (O_2) es un diradical con capacidad a ser reducido a H_2O como un producto terminal en la cadena transportadora de electrones, durante este proceso de donación de electrones se pueden generar ERO como intermediarios. Este proceso ocurre de la siguiente manera: cuando se presenta la donación de un único electrón al O_2 , se origina el radical superóxido ($O_2 \bullet^-$), mientras que la donación de un segundo electrón da lugar al peróxido, que al protonarse forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), posteriormente la donación de un tercer electrón (como ocurre en la reacción de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) genera hidroxilo ($\bullet OH$) y finalmente la donación de un cuarto electrón resulta en la producción de H_2O (Macedo-Márquez, 2012).

Los RL pueden ser formados vía exógena o endógena. La principal fuente endógena de ERO se da en la mitocondria como resultado de la respiración mitocondrial, sin embargo, existen otras fuentes endógenas como los peroxisomas, citocromo P450, así como la fagocitosis. Se sabe que, las ERO participan en la regulación de la proliferación vascular, migración, apoptosis, modificación de la matriz extracelular, y actividad pro-coagulante, además de participar en la angiogénesis (Bonello, *et al.*, 2007; Saavedra, *et al.*, 2010; Corrales y Muñoz, 2012; Macedo-Márquez, 2012). Siendo la mitocondria, responsable de la producción del 80% de las ERO producidas en el organismo, además de ser la única generadora de O_2^- (especie reactiva más dañina para la célula) (Valdecantos, *et al.*, 2009; Macedo-Márquez, 2012; Arenas- Ríos, *et al.*, 2015).

5.3 Principales especies reactivas de oxígeno

- **Anión superóxido ($O_2 \bullet^-$):** Es el radical más abundante a nivel celular. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis, actuando como defensa bactericida. Es generado en diferentes organelos celulares como la mitocondria, retículo endoplásmico y citosol. El anión superóxido es la primera molécula que se produce durante el metabolismo celular, la cual se forma mayormente en la cadena respiratoria, por el transporte de electrones que

se da entre los complejos que la conforman, los cuales son captados por el oxígeno. Es poco reactivo, sin embargo, su toxicidad radica en la capacidad que tiene a formar radicales hidroxil y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Hansberg, 2008).

- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):** molécula conocida como agua oxigenada, la cual no es un radical libre, pero es una forma reactiva ya que tiene la capacidad de generar radicales hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. Se ha descrito que esta molécula se origina cuando se aparean cada uno de los electrones libres de una molécula de oxígeno con un electrón de giro contrario. Se forma principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD), también se genera en otros organelos celulares como el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol. El peróxido de hidrogeno es menos reactivo que el peróxido de hidrogeno, aunque resulta toxico a concentraciones mayores a $1\mu\text{M}$, al tener la capacidad de formar moléculas como el oxígeno singulete, así como radicales hidroxil; es sin embargo, importante señalar que es indispensable la presencia de peróxido de hidrogeno debido a que se encuentra implicado en procesos de maduración y capacitación espermática, puede difundirse en los compartimientos celulares y no interacciona con aminoácidos, NADPH, ácidos nucleicos y lípidos (Hansberg, 2008).
- **Radical Hidroxil ($\text{HO}\cdot$):** Es de entre los radicales uno de los más altamente reactivos que existe, el cual tiene la capacidad de reaccionar con cualquier compuesto celular, como: pirimidinas, desoxirribosa, aminoácidos y ácidos grasos lo cual implica que no pueda difundirse a través de los diferentes compartimientos en la célula (Hansberg, 2008).

Cuando los lípidos que compone a las membranas celulares, son atacados por EROs, se produce una lipoperoxidación; esta reacción ocurre en cadena y se presenta en tres pasos: **Iniciación:** Los lípidos de la membrana, contienen ácidos grasos, los cuales son atacados por radicales libres, dando origen a la formación de radicales libres lipídicos y estos a su vez pueden dar origen a radicales lipoperoxidos al interaccionar con oxígeno molecular (Mekker, 2008),

Propagación: los radicales peróxilo continúan reaccionando con ácidos grasos, propagándose la formación de radicales libres lipídicos; **Terminación:** la reacción se finaliza solo si dos moléculas de peróxidos interactúan entre sí o bien si estas moléculas reaccionan con un antioxidante (Zenteno y Saldaña, 2008).

- **Oxígeno Singlete (O_2^1):** Este radical es altamente reactivo y se produce en distintos procesos, como la fagocitosis, inducción luminosa, reacciones catalizadas por peroxidasas, entre otras. Es capaz de modificar diferentes biomoléculas como el DNA y causar daños en las proteínas a través de la oxidación de ciertos grupos esenciales de aminoácidos entre los cuales se encuentran; triptófano, metionina, histidina y residuos de cisteína. Esta molécula da inicio a la lipoperoxidación generando RL como el alcoxilo ($RO\bullet$) y peróxilo ($ROO\bullet$) (Corrales y Muñoz, 2012; Macedo-Márquez, 2012; Saavedra, *et al.*, 2010).

Vida media de los radicales y especies reactivas de oxígeno

RADICAL	NOMBRE	VIDA MEDIA
O_2^-	Superóxido	10^{-5} s
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	Estable
HO^-	Radical hidroxil	10^{-9} s
$ROOH^-$	Hidroperóxido	7 s
NO	Radical de óxido nítrico	-1 s

Tabla 1. Vida media de los radicales y especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Galván, *et al.*, 2008.

5.4 Estrés oxidante

Se denomina estrés oxidante cuando se altera el desbalance entre la producción de RL y antioxidantes; el incremento del estrés oxidante puede resultar en un

incremento de EROs, reducción de sistemas antioxidantes, de un incremento de catálisis prooxidante, o una combinación de estos. Al ser las EROs moléculas con alta reactividad, son capaces de reaccionar con diversas estructuras celulares, sus principales blancos son los ácidos grasos insaturados que constituyen la membrana fosfolipídica, así como los ácidos nucleicos y las proteínas (Hicks, *et al.*, 2006).

El metabolismo celular aeróbico utiliza dioxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria lo que induce la producción de ERO, quienes son capaces de oxidar cualquier biomolécula (DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas), lo cual puede generar daño en las estructuras celulares o bien conducir a la célula a procesos apoptóticos, cuando ERO se encuentra por encima de los antioxidantes (Hicks, *et al.*, 2006; Viada Pupo, *et al.*, 2017).

La lipoperoxidación es el proceso de oxidación de los lípidos que afecta a las membranas biológicas debido a que estas están conformadas por una enorme cantidad de fosfolípidos y de ácidos grasos poliinsaturados lo que las vuelve vulnerables a la peroxidación, pues los enlaces dobles carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrogeno del átomo del carbono vecino (Arenas-Ríos, *et al.*, 2015), es decir los RL reaccionan con los lípidos insaturados lo que da lugar a la formación de dos fragmentos acil de ácido graso, cada uno de los cuales, a su vez es un RL con capacidad de atacar y formar nuevos RL y así sucesivamente, formando una reacción en cadena, lo que conlleva a deteriorar estructural y funcionalmente la membrana celular (Piña-Garza, 2007).

La oxidación proteica, se describe como la modificación covalente de las proteínas o bien por la afectación de la cadena lateral de los aminoácidos. En general todos los aminoácidos pueden ser blanco de las ERO, aunque algunos aminoácidos suelen ser más susceptibles como la metionina, el triptófano, la fenilalanina, la tirosina, la cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina y la histidina. Alteraciones en la cadena lateral de aminoácidos pueden inducir cambios sobre la estructura y función de la proteína, así como fragmentación o susceptibilidad a proteólisis. La alteración en la cadena lateral conduce a la exposición de grupos carbonilos dada por la ruptura de enlaces covalentes y no covalentes entre los diferentes aminoácidos que forman la proteína. Dado que no existen sistemas de reparación,

estas proteínas oxidadas deben ser degradadas. Cuando los sistemas de degradación, como el proteosoma, no son capaces de eliminarlas de forma adecuada, se acumulan en el interior celular, provocando toxicidad o muerte celular (Olivares-Corichi, *et al.*, 2006; Radak, *et al.*, 2011).

En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO, de modo que los procesos de oxidación en el ADN pueden provocar ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, alteraciones en sus bases nitrogenadas (saturación o fragmentación del anillo de timina), la rotura de la doble hélice y la formación de uniones cruzadas (cross-links) ADN-ADN o ADN- proteína esta serie de daños causados a nivel DNA pueden inducir la apoptosis celular (Zorrylla Gracia, *et al.*, 2004; Radak, *et al.*, 2011).

5.5 Señalización celular y las EROs

La señalización celular es un proceso que requiere de una cascada de eventos tanto extracelulares como intracelulares mediante los cuales permiten el adecuado funcionamiento y comunicación celular, siendo las EROs, moléculas que pueden intervenir en este tipo de procesos, denominándolo señalización redox (Thannickal *et al.*, 2000). Dado que estas moléculas tienen un alta capacidad oxidante, pueden alterar el estado redox de proteínas de modo tal que actúan como segundos mensajeros desencadenando respuestas celulares de supervivencia o muerte celular, estas respuestas están mediadas por la concentración de EROs, donde niveles bajos desencadenan respuestas de supervivencia mediante la síntesis y secreción de enzimas antioxidantes, mientras que concentraciones elevadas de EROs estimula a la producción de moléculas pro-oxidantes que conlleva a procesos apoptóticos (Sablina *et al.*, 2005; Veal, *et al.*, 2007).

5.6 Defensas antioxidantes

Todo organismo y en específico cada célula que lo conforma, cuentan con un sistema de defensa, encargado de reparar y prevenir el daño causado por las ERO, además regula las vías de señalización sensibles a redox. Este sistema de defensa puede ser un sistema antioxidante no enzimático o bien un sistema enzimático.

Los antioxidantes no enzimáticos, se encargan de proteger al organismo contra los radicales libres, estos no son sintetizados por las propias células, sino que son adquiridos a través de la dieta, entre los cuales se encuentran la vitamina C y E, carotenoides, antioxidantes tiólicos (glutatiión, tiorredoxina y ácido lupoico), entre otros (10); mientras que los antioxidantes enzimáticos son sintetizados por las propias células y son denominadas: superóxido dismutasa, catalasa y glutatiión peroxidasa (Fig. 5).

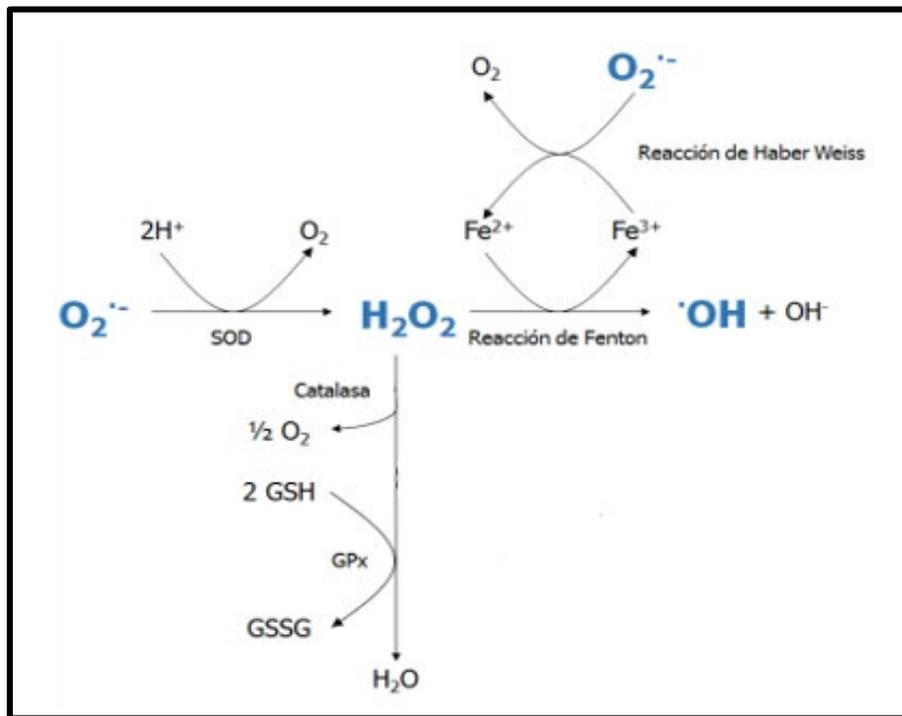
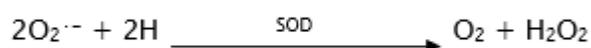


Figura 5. Sistema de defensa antioxidante. La superóxido dismutasa (SOD), convierte el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT) y / o glutatión peroxidasa (GPx), lo cual lo convierte en agua y oxígeno molecular. Y el glutatión peroxidasa (GPx) provee un mecanismo de protección, utilizando glutatión reducido (GSH) y convirtiéndolo en glutatión oxidado (GSSG), este luego es reducido nuevamente por el glutatión reductasa (GR). Adaptado de Macedo-Márquez, 2012.

Ambos sistemas de defensa tienen como función colisionar con los RL, a fin de transformar estos en moléculas menos perjudiciales. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, interactuando con las ERO, antes de que estas reaccionen con las moléculas que conforman a la célula, impidiendo así, que se genere un daño a la misma. De modo que el propósito del antioxidante es de sacrificar su propia integridad molecular para lograr evitar alteraciones en las moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) que le dan soporte, estructura y función a la célula (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2004; Soto-Bernardini y Reventós-Vorst, 2008; Valdecantos, *et al.*, 2009; Coronado, *et al.*, 2015).

5.7 Sistema antioxidante enzimático

- **Superóxido dismutasa (SOD):** Son una familia de 4 enzimas que catalizan la dismutación de $O_2^{\bullet-}$. Tres de estas enzimas presentan cofactores mononucleares de Ni (NiSODs), Mn (MnSODs) o Fe (FeSODs) y solo una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos (uno Cu^{++} y una de Zn^{++}). En células eucariontes se ubican en el espacio extracelular, citosólico e intramitocondrial. Se encargan de realizar la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Coronado, *et al.*, 2015; Macedo-Márquez, 2012; Valdecantos, *et al.*, 2009; Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2004).



Debido a la composición de aminoácidos aromáticos de SOD y al efecto hipercrómico producido por los átomos de Cu^{++} y Zn^{++} , el espectro de absorción ultravioleta de esta enzima presenta su mayor absorbancia a 258nm (García, *et al.*, 1997).

El catabolismo del H₂O₂ puede ser llevada a cabo por la CAT o por la GPx.

- **Catalasa (CAT)**: Enzima oxidoreductasa, constituida por 4 subunidades, usa de cofactor a hemo y manganeso, cataliza la descomposición de H₂O₂, en O₂ y H₂O. Se encuentra en mitocondria y peroxisoma de los hepatocitos, riñón, tejido conectivo y otros epitelios. La CAT contiene nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH) (Coronado, *et al.*, 2015; Macedo-Márquez, 2012; Peraza-Reyes, 2008; Valdecantos, *et al.*, 2009).



La CAT ejerce reacciones catalíticas y peroxidativas. En la reacción catalítica usa como donadores a las moléculas de H₂O₂, mientras que en la reacción peroxidativa la CAT usa como donadores de hidrógeno al fenol, etanol, ácido fórmico, metanol y formaldehido. Una molécula de CAT, cataliza la transformación de 1x10⁷ moléculas de sustrato por segundo (Peraza-Reyes, 2008.)

- **Glutación peroxidasa (GPx)**: es una enzima que utiliza como cofactor el selenio y cataliza la reducción de dos moléculas: la de H₂O₂ y la del lipoperóxido (L-OOH) utilizando al glutatión reducido (GSH). Se conocen 3 GPx: una plasmática (GPx-p), intracelular (GPx-c) y una con actividad para fosfolipoperóxido (GPX-PH). En las células se localiza en el citosol de los eritrocitos, así como en mitocondria y citosol de células hepáticas y lisosoma de macrófagos (Coronado, *et al.*, 2015; Macedo-Márquez, 2012; Valdecantos, *et al.*, 2009).

GPX-c y GPx-p catalizan la siguiente reacción:



GPX- PH cataliza la siguiente reacción:



5.8 Enzimas antioxidantes en el tracto reproductor masculino

Estudios han reportado la presencia de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) en el tracto reproductor de ratas, donde se ha mostrado que en el testículo se presentan elevadas concentraciones de GPx, mientras que en epidídimo las concentraciones son más bajas, además de que estas enzimas se expresan de forma diferente a lo largo del epidídimo, en donde una isoenzima de GPx solo se expresa en el *caput*, por lo que sugieren que esta enzima antioxidante participar en la protección de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo (Vernet, *et al.*, 2001). Además, se ha reportado en ratas, la presencia de GPx al llegar estas a la madurez sexual, lo que indica que participa en la espermatogénesis (Roveri, *et al.*, 1992).

Así mismo se ha revelado la actividad enzimática de SOD y GPX en espermatozoides obtenidos en el *caput* y *cauda* del epidídimo, mostrándose una mayor actividad de estos antioxidantes en el *caput* del epidídimo (Godeas, *et al.*, 1997; Tramer, *et al.*, 1998). Otros estudios reportan en el testículo la presencia de SOD, las cuales son sintetizadas y secretadas por las células de Sertoli, así como por la serie de células germinales, sugiriendo que median el metabolismo del ion superóxido (Mruk, *et al.*, 1998) y se ha visto en porcinos que la actividad de SOD cambia conforme aumenta la edad, siendo significativamente mayor en cerdos menores de 2 años de edad comparados con cerdos de más de 2 años de edad (Kowalowka, *et al.*, 2008).

Las células germinales presentan alta actividad de SOD y baja actividad de GPx, lo que indica que las células germinales son capaces de convertir el H_2O_2 , por lo que podrían tener dificultad en convertir los peróxidos a moléculas menos reactivas (Aitken, 1989), y se ha descrito que las espermatogonias tienen gran tolerancia al ataque de las ERO, mientras que células germinales más diferenciadas suelen ser muy susceptibles al daño por ERO, pues se ha reportado que la presencia de SOD1 se ve disminuida en espermatoцитos y espermátidas, debido a que los espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides suelen sufrir procesos apoptóticos asociados a las ERO, sin embargo, las espermatogonias no presentan

daño (Castillo-Castañeda, *et al.*, 2016).

En el testículo y el epidídimo se encuentra presente la GPx-1, la GPx-3 se expresa mayormente en el epidídimo, aunque hay baja expresión en la región cefálica del epidídimo y es secretada hacia el lumen, mientras que en la *cauda* hay mayor expresión (Schwaab, *et al.*, 1995; Schwaab, *et al.*, 1998). La GPx-4 tiene mayor actividad en los testículos con respecto al hígado y al corazón, además se expresa en las células germinales y en las células de Leydig (Cardenas-Rodriguez, 2008; Baek, *et al.*, 2007). La GPx-4 es influenciada por la testosterona, pues en el testículo de rata se expresa después de la pubertad y es necesaria para la diferenciación de células germinales por lo que podría estar implicada en la espermatogénesis. La GPx 1, 3, 4 y 5 se encuentran en células epiteliales del epidídimo, el fluido luminal y en los espermatozoides (Alvarez y Storey, 1984).

En cuanto a CAT, investigadores señalan la presencia de actividad en el *caput* y *cauda* del epidídimo (Tramer, *et al.*, 1998). Se ha encontrado la expresión de la CAT en las células de Leydig, en las células mioideas peritubulares, en las células de Sertoli y en las espermatogonias, sin embargo, hay poca expresión en espermatoцитos y espermatogonias durante la espermatogénesis (Nenicu, *et al.*, 2007; Dastig, *et al.*, 2011; Luers, *et al.*, 2006). La CAT también se expresa en el epitelio del epidídimo y en los espermatozoides, aunque la expresión es muy baja (Tramer, *et al.*, 1998; Zini y Schlegel, 1997). Esta baja actividad podría sugerir que son vulnerables a factores prooxidantes, sin embargo, el H₂O₂ es eliminado por la GPx.

Por otro lado, reportes en humanos indican la presencia de enzimas antioxidantes en semen y se ha encontrado que cuando hay una alteración en las concentraciones normales de estas enzimas se ven afectados parámetros espermáticos (movilidad, viabilidad y capacidad de reacción acrosomal) (Álvarez, *et al.*, 1987; Chen, *et al.*, 1997; Baumber J, *et al.*, 2000; Quintero, *et al.*, 2000).

6.1 Dietas e inducción de sobrepeso y obesidad

Diversos factores conllevan al desarrollo de sobrepeso u obesidad, de entre los cuales destacan, el estilo de vida sedentario y los malos hábitos alimenticios debidos al elevado consumo de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos (Díaz-Urbina, *et al.*, 2018), siendo eventos que encaminan el desarrollo del aumento de masa adipocitaria a través de mecanismos de hipertrofia e hiperplasia del adipocito (Bays HE, *et al.*, 2008; De Ferrati S y Mozaffarian D, 2008).

Esta gran problemática ha conducido a los científicos a desarrollar modelos de obesidad en ratas Wistar, este tipo de animales suelen ser ampliamente manejados en la investigación científica por la gran similitud y homología que existe entre el genoma de roedores y humanos, de tal modo que el desarrollo de modelos de sobrepeso y obesidad, permite evaluar mecanismos específicos implicados en el curso temporal de patologías que son inducidas por el incremento de tejido adiposo. Las grasas son macronutrientes y forman parte del 35% de la ingesta calórica total (Henink y Maljaars, 2013). Investigaciones con animales de laboratorio han mostrado que dietas con alto consumo de grasa presentan un incremento en la acumulación de tejido adiposo y después de tres semanas un aumento de peso corporal, así como la hipertrofia de los adipocitos (Woods, *et al.*, 2003; La Fleur, *et al.*, 2010).

6.2 La obesidad como factor de infertilidad masculina

La OMS, define a la infertilidad como la falta de embarazo, aun manteniendo relaciones sexuales regulares, sin protección anticonceptiva, durante un lapso de 12 meses, de acuerdo a esto, es importante mencionar la relación que guarda el incremento que está sucediendo a nivel mundial con la obesidad, con respecto al decremento de la infertilidad masculina y la fecundidad, debido a que se ha reportado que hombres con mayor IMC tienen significativamente más

probabilidades de ser infértiles en comparación con hombres cuyo peso es normal, según investigaciones realizadas por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental (Oliver y Mach., 2016; WHO, 2017; OMS 2018).

Se considera a la obesidad, como un factor que altera la calidad seminal y el potencial reproductivo masculino y se ha descrito que las concentraciones espermáticas continúan disminuyendo anualmente, observando los mismos patrones en otros países en los que es frecuente la obesidad (Cabler, *et al.*, 2010; Jia, *et al.*, 2018); reportando que la mayoría de los pacientes infértiles presentan obesidad o bien, que en las parejas que experimentaban subfertilidad, la pareja masculina era obesa; lo cual sugiere alto riesgo de subfertilidad al reducir la capacidad de reproducción (Magnusdottir, *et al.*, 2005).

Por otro lado, estudios han revelado la desregulación endocrina en estados fisiológicos de obesidad, se deben a la acumulación de tejido adiposo la cual está asociada con la disminución en los niveles de testosterona total y libre, así como a un aumento en los niveles de estradiol (Giagulli, *et al.*, 1994; Aggerholm AS, *et al.*, 2008; Pauli EM, *et al.*, 2008) y se atribuye a consecuencia del aumento en los niveles de aromatasa que son expresados por el tejido adiposo, debido a que esta hormona es la responsable de la conversión de testosterona a estradiol, lo que explica los niveles bajos de testosterona y niveles altos de estradiol en ratones (Schneider G, *et al.*, 1979; Cabler S, *et al.*, 2010; Costabille, 2013; Kelly y Jones, 2015). Además, el aumento de estradiol, ejerce una retroalimentación negativa en el eje HHT, al disminuir los niveles de GnRH, lo que suprime la secreción de LH y FSH, disminuyendo las concentraciones de testosterona y afectando la calidad espermática (Hammoud AO, *et al.*, 2006; Hammoud AO, *et al.*, 2008; Souza, *et al.*, 2017; Ferramosca, *et al.*, 2018).

Estudios recientes señalan que la obesidad influye de forma negativa en los parámetros espermáticos, debidos al estrés oxidante, ya que evidencias indican un incremento de lipoperoxidación de hasta un 99.16% en el epidídimo de ratas obesas comparado con ratas con normopeso (Vigueras-Villaseñor, *et al.*, 2010), mencionando que incluso puede verse afectado el epitelio de los túbulos

seminíferos (Jia, *et al.*, 2018, Yang, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2005), así como también se reporta la presencia de cuerpos apoptóticos en el lumen de la cabeza del epidídimo (Vigueras-Villaseñor, *et al.*, 2010), además otras investigaciones refieren que en estados de obesidad se presenta una disminución en los parámetros espermáticos: disminución en la viabilidad, movilidad y concentración, cuyos valores disminuyen entre un 20-30 % con respecto a grupos con normopeso (Vigueras-Villaseñor, *et al.*, 2010; Cabler, *et al.*, 2010; Raad, *et al.*, 2017).

6.3 Incremento de temperatura escrotal

“La elevación de la temperatura a nivel escrotal se asocia con una disminución de espermatogonias y un aumento de células apoptóticas en el epitelio germinal” (Vásquez, *et al.*, 2009). Por lo que la temperatura testicular necesaria para mantener la espermatogénesis es de 33°C aproximadamente, pues se postula que a esta temperatura el ADN sufre menos daño oxidativo, lo que reduce las mutaciones en los espermatozoides (Naughton, *et al.*, 2001). Así mismo, evidencias señalan que el enfriado de la sangre antes de llegar a los testículos es efectuada por el plexo pampiniforme, por lo que una alteración de esta estructura, afectaría el enfriamiento de la sangre de la arteria testicular e induciría una estasis venosa que favorece el incremento de temperatura testicular, que puede inducir apoptosis en las células (Naughton, *et al.*, 2001; Goldstein, *et al.*, 1989; Zorgniotti, *et al.*, 1989; Agger, *et al.*, 1971).

Los hombres obesos y con obesidad mórbida, la presencia e incremento de grasa escrotal, así como el estilo de vida sedentario y la poca actividad física, conducen a un aumento de la temperatura escrotal, lo que contribuye al incremento de estrés oxidante, el cual se caracteriza por la formación de ERO, que son moléculas altamente inestables capaces de causar daño celular a través de procesos como la lipoperoxidación y fragmentación del ADN, disminuyendo la fluidez e integridad de la membrana, disminuyendo la calidad espermática (Kasturi, *et al.*, 2008; Cabler, *et al.*, 2010; Du Plessis, *et al.*, 2010; Fàbrega, *et al.*, 2011; Vigueras-Villaseñor, *et al.*, 2010; Arenas-Ríos, *et al.*, 2015).

Además, señalan que la obesidad conduce a la presencia de alteraciones metabólicas lipídicas, así como hiperlipidemias que incrementan la respuesta al estrés en el retículo endoplásmico incrementando la apoptosis de las espermatogonias (Jia, *et al.*, 2018).

Por otro lado, investigaciones en ratones y ratas reportan que, la concentración de testosterona incrementa con la etapa de desarrollo y se ha correlacionado con el incremento de lipoperoxidación testicular e indican que, en el macho, durante la diferenciación de células germinales se presenta un incremento de su metabolismo, lo que induce a la generación de RL, de modo que estarían participando en la regulación redox gonadal (Matheus, *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidante está correlacionado con una amplia variedad de estados inflamatorios y metabólicos, en donde recientemente se ha incluido a la obesidad y el efecto de esta sobre la fertilidad masculina. Debido a que a través de diversos estudios se ha observado una mayor incidencia de hombres obesos los cuales presentan infertilidad, problemática que se ha asociado con alteraciones endocrinas y físicas debidas al incremento de tejido adiposo.

Lo que ha llevado a investigadores en las últimas décadas a estudiar la relación de obesidad con alteraciones en los parámetros espermáticos, con lo que se ha sugerido que el incremento de tejido adiposo conduce a la alteración de factores hormonales y físicos; sin embargo la mayoría de estas investigaciones hacen referencia a alteraciones hormonales y poco se sabe en cuanto a factores físicos y de qué manera éstos, junto con los hormonales pudieran estar implicados en la alteración del sistema enzimático antioxidante, y qué importancia tienen las enzimas antioxidantes en el tracto reproductor masculino. Así mismo la mayoría de los estudios se centran en los estados fisiológicos de obesidad y hasta el momento se desconoce si en estados fisiológicos de sobrepeso hay indicios en alteraciones hormonales y físicas que pudieran ser el comienzo de problemas de infertilidad.

Por ello es de relevancia realizar investigaciones en cuanto a los mecanismos por los cuales estos estados fisiológicos provocan alteraciones en los parámetros espermáticos, para obtener conocimiento que en un futuro permita resolver problemas de fertilidad masculina en individuos con problemas de peso corporal.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

8.1 Objetivo general

Identificar el efecto del sobrepeso u obesidad sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en testículo y epidídimo de ratas Wistar en edad reproductiva.

8.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar si el sobrepeso u obesidad provocan un aumento de la grasa escrotal en rata Wistar.
- 2) Evaluar si el sobrepeso u obesidad disminuyen la viabilidad y alteran la morfología espermática en rata Wistar
- 3) Determinar si el sobrepeso u obesidad afectan la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx en testículo y epidídimo en rata Wistar.

9. Hipótesis

Si el sobrepeso u obesidad son capaces de inducir estrés oxidante en testículo y epidídimo, entonces se verá alterada la actividad enzimática antioxidante en testículo y epidídimo en la rata Wistar.

MATERIAL Y MÉTODO

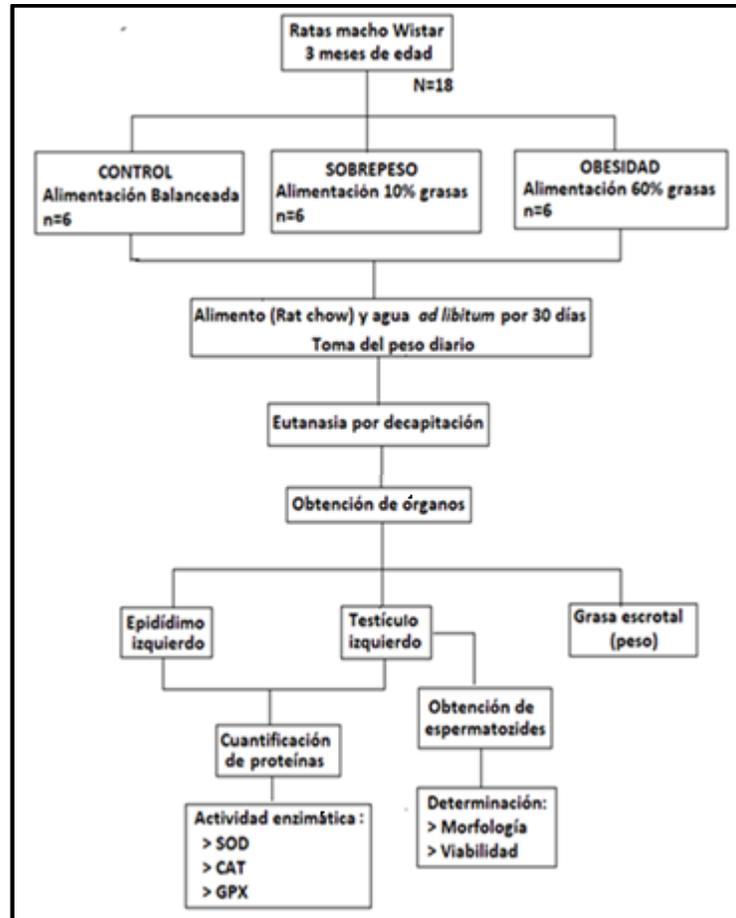


Figura 6. Diseño experimental.

10.1 Diseño Experimental

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar, de 3 meses de edad, con peso de 300 gr. aproximadamente, las cuales se dividieron en tres grupos (n=6). Las ratas se obtuvieron en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Los grupos experimentales de ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar a una temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un ciclo de luz- oscuridad 12/12, agua y alimento *ad libitum*, ubicadas en una cama de aserrín de acuerdo a NOM-062-ZOO-

1999, artículo 5. Se registró diariamente el consumo de alimento, se le tomaron las medidas de peso y la medida naso-anal a las ratas, durante 30 días consecutivos.

10.2 Dietas en los grupos experimentales

- **Grupo 1 (control):** recibieron una dieta balanceada para uso de roedores de laboratorio, cuyo contenido: 23.0% de proteína, 4.5 % de grasa y 6.0 % de fibra (Purina rat Chow 5001). Se esperó conseguir un peso aproximado de 350-420 g.
- **Grupo 2 (sobrepeso):** recibieron una dieta con un 10% de grasas extra para uso de roedores de laboratorio, el alimento tiene un contenido de: 18.0% de proteína, 10.2% de grasas y 71.8% de carbohidratos, (DIO Rodent Purified Diet w/10% Energy from fat - Yellow). Se esperó conseguir un peso aproximado de 430-500 g.
- **Grupo 3 (obesidad):** recibieron una dieta con un 60% de grasas extra para uso de roedores de laboratorio, el alimento tiene un contenido de: 18.1% de proteína, 61.6% de grasas y 20.3% de carbohidratos, (DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy from fat - Blue). Se esperó conseguir un peso aproximado de 510-600 g.

Las variables biométricas que se tomaron en cuenta para la caracterización de sobrepeso y obesidad, al cumplirse el régimen de dieta, fue mediante el índice de Lee, el cual considera la medida naso-anal (cm) y el peso corporal (gr), por la siguiente fórmula: Índice de Lee = raíz cúbica del peso corporal (g) / longitud naso-anal (cm) (Bernardis y Patterson, 1968). Los tres grupos de ratas fueron pesadas diariamente. Así mismo se categorizaron rangos de peso de acuerdo a Woods en el 2008 en donde indica que ratas a las que se les administra una dieta hiperlipídica al 10% deben incrementar de un 20-30% su peso con respecto al control, mientras que si se administra una dieta hiperlipídica al 60% puede incrementar hasta un 60% su peso con respecto al control.

10.3 Sacrificio de los grupos experimentales

Una vez cumplidos los 30 días de dieta, los animales fueron pesados y posteriormente sacrificados por decapitación (NOM--062-ZOO-1999, rubro 5.3.12) para su posterior recolección de sangre y obtención de órganos. Los restos fueron desechados en bolsas de polietileno, colocados en el congelador del bioterio de la UAM Iztapalapa para posteriormente eliminarlos de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

10.4 Obtención de órganos (testículo y epidídimo) en los grupos experimentales

Posteriormente a los animales se les realizó una incisión para observar y exponer las gónadas para su extracción, separando la grasa que rodea a las gónadas y se registró el peso para determinar el peso relativo con respecto del peso corporal (Malafaia, *et al.*, 2013), de igual manera una vez obtenidos los testículos y epidídimos, fueron pesados y medidos. Los epidídimos izquierdos fueron seccionados en sus tres regiones anatómicas gruesas (*caput, corpus y cauda*) de acuerdo con el procedimiento descrito por (Cervantes, *et al.*, 2008); se tomaron aprox. 100 µg de los tejidos de testículo y de las regiones del epidídimo, se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

10.5 Extracción de espermatozoides de rata

El epidídimo derecho se seccionó en sus tres regiones anatómicas gruesas (*caput, corpus y cauda*) (Cervantes, *et al.*, 2008), posteriormente a cada una de las secciones se les realizó un picado, para desprender a los espermatozoides del tejido epididimario (León-Galvan, *et al.*, 1999), a partir de los cuales se realizó una evaluación espermática, para determinar si el sobrepeso y la obesidad alteran los parámetros espermáticos.

10.6 Evaluación espermática

Los parámetros espermáticos que se evaluaron son: viabilidad y morfología de los espermatozoides (Manual de Laboratorio para la examinación y procesamiento del semen humano y el Manual para el análisis de la cópula y el eyaculado en la Rata Albina (*Rattus norvegicus*) (Lucio, *et al.*, 2009).

a) Morfología y viabilidad espermática: Una vez desprendidos los espermatozoides del tejido epididimario, se tomaron 3 μL de la muestra (espermatozoides con solución láctica de Ringer) y se agregaron 2 μL de colorante eosina-nigrosina y enseguida se realizó una mezcla homogénea y un frotis (para cada región del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*) sobre un portaobjetos y dejando secar a 37°C. La lectura de las laminillas se realizó en un microscopio de campo claro a 40X, para analizar la viabilidad y la morfología.

- **Los criterios para evaluar las anomalías en la morfología del espermatozoide fueron:** La tinción de las distintas estructuras permitió una mejor observación al microscopio e incrementar la definición, para valorar la forma de un espermatozoide, del cual se observaron sus tres estructuras principales: cabeza, pieza intermedia y cola: a) defectos en cabeza: cabeza amorfa, b) pieza media: angulada, asimétricos y (c) defectos del flagelo: corto, angulado y enrollado.
- **Los criterios de viabilidad espermática:** los espermatozoides que se encontraron teñidos se contaron como muertos, mientras que los que no se tiñeron se tomaron como vivos, se contaron un total de 200 espermatozoides por laminilla.

10.7 Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes

A partir del tejido que se almaceno a -70°C (testículo o región del epidídimo (*caput, corpus, cauda*) y se homogenizo total a partir del cual se realizó la determinación enzimática.

a) Determinaciones bioquímicas: El contenido de proteínas totales en los órganos reproductores (testículo y epidídimo) se determinó por el método de Bradford. Se tomaron $100\mu\text{g}$ de tejido (testículo / región de epidídimo (*caput, corpus, cauda*)). La determinación de proteínas por el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión del colorante el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino o BSA). La cuantificación se realiza midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm , y graficando la absorbancia contra la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar, con esta curva, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

b) Cuantificación de las enzimas antioxidantes: La determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx fue calculada para cada enzima mediante técnicas particulares:

- **Superóxido dismutasa:** la actividad de SOD en tejido testicular y epididimario se determinó mediante un método colorimétrico que emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para la formación de radicales superóxido, y su posterior reacción con I.N.T., con lo que se forma el colorante rojo formazán, el cromógeno formado será cuantificado espectrofotométricamente a 505 nm , midiendo la actividad de SOD por el grado de inhibición, la actividad de la enzima fue expresada en unidades por mililitro (U/ml) (Arthur y Boyne, 1985).
- **Catalasa:** la determinación de CAT se realizó en un sistema de reacción conteniendo permanganato de potasio (KMnO_4) cuya coloración intensa fue registrada a 480nm . La base de la técnica consiste en la disminución del color

debido a la reacción de peroxidación provocada por H_2O_2 hacia el permanganato de potasio, y el mantenimiento del color por degradación del H_2O_2 en presencia de CAT (Cohen, *et al.*, 1970).

- **Glutación peroxidasa:** la GPx se determinó por el método de Mills (Paglia and Valentine, 1967), mediante un método cinético dependiente de NADPH, por medio del cual la GPx en conjunto con el glutación reductasa (GPx/GR) modulan la amenaza del H_2O_2 convirtiéndolo en agua; por su parte, el GSH es oxidado a disulfuro GSSG (glutación oxidado). La cantidad de enzima se midió por colorimetría a 340 nm, expresada en unidades por mililitro (U/ml), cada unidad representa la oxidación de $1\mu\text{mol}$ de NADPH por minuto por mililitro de tejido.

11. Análisis estadístico

La base de datos y gráficos se elaboraron en Excel, mientras que el análisis estadístico se corrió en NCSS 12. Para los datos: peso corporal, índice de Lee, anomalías morfológicas de los espermatozoides, viabilidad espermática, concentración de proteínas y actividad enzimática se les realizó un análisis estadístico de ANOVA y prueba de Tukey Kramer.

RESULTADOS

➤ Ganancia de peso

En la figura 7 se indica la ganancia de peso corporal en los tres grupos experimentales de ratas Wistar de 3 meses de edad, alimentadas durante 4 semanas con dieta balanceada (grupo control), dieta hiperlipídica con 10% de grasa extra (grupo sobrepeso) y dieta hiperlipídica con 60% de grasa extra (grupo obesidad). El análisis estadístico muestra que el grupo de ratas con sobrepeso, tuvo un aumento de peso de 24.17% y el grupo de ratas con obesidad incremento un 51.12% con respecto al control ($F(2,15) = 108.8954$; $p < 0.05$). El aumento en la ganancia de peso para el grupo de obesidad fue significativamente mayor comparado con el grupo de sobrepeso con una diferencia de 29.84% Tukey Kramer ($p < 0.005$).

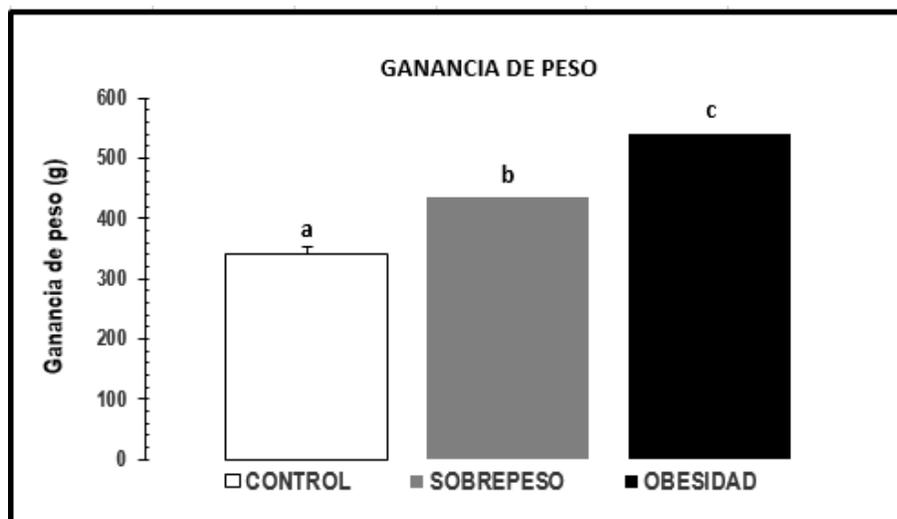


Figura 7. Representación gráfica que indica la ganancia de peso en ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con una dieta balanceada (grupo control), dieta hiperlipídica al 10% (grupo sobrepeso) y 60% de grasas (grupo obesidad). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. $\bar{X} \pm EE$, $F(2,15) = 108.8954$, ($p > 0.05$); Tukey Kramer.

➤ Índice de Lee

Con relación a los valores del índice de Lee en la tabla 2 se señala que el grupo de sobrepeso presentó un índice de Lee de 0.329, mientras que en el grupo de obesidad fue de 0.339 y para el grupo control fue de 0.2915. Los resultados sugieren que el control es un grupo con normopeso, mientras que sobrepeso y obesidad alcanzaron obesidad.

Índice de Lee en los grupos experimentales de ratas Wistar

Grupos experimentales	DIETA CONTROL	DIETA HIPERLIPIDICA 10%	DIETA HIPERLIPIDICA 60%
Índice de Lee obtenido	0.291524874	0.329854321	0.33965092

Tabla 2. Índice de Lee de los grupos experimentales sometidos a dieta control (balanceada) y dieta hiperlipídica al 10% (grupo sobrepeso) y 60% de grasas (grupo de obesidad). Índice de Lee, calculado por la raíz cúbica del peso corporal (g) dividido entre la longitud hocico-ano (LHA) (cm). Un valor igual o menor a 0.300 fue considerado como normal y un valor mayor que 0.300, las ratas fueron clasificadas como obesas (Bernardis, 1979). Los valores mostrados para los grupos de sobrepeso y obesidad indican un aumento de peso.

➤ **Ganancia de grasa escrotal**

De acuerdo a los resultados, la figura 8 muestra que los grupos de sobrepeso y obesidad exhiben un incremento de grasa, donde el aumento de grasa escrotal es significativo con respecto al control.

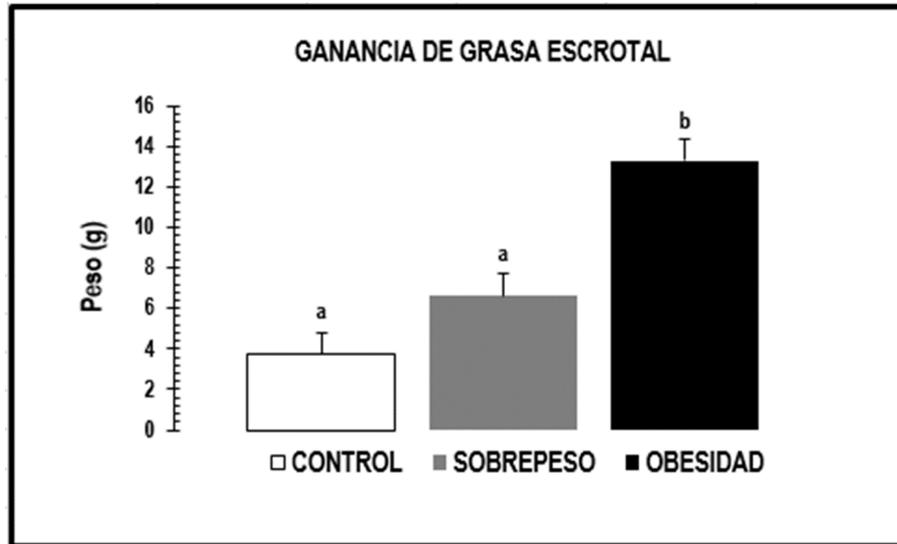


Figura 8. Representación gráfica de la ganancia de grasa escrotal en ratas Wistar con dieta balanceada (grupo control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (grupos de sobrepeso y obesidad). Donde letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, $\bar{X} \pm EE$, $F(2,15) = 20.5375$ ($p < 0.05$); Tukey Kramer.

➤ **Parámetros espermáticos**

En la tabla 3 se presentan los parámetros espermáticos determinados en ratas Wistar para los grupos: control, sobrepeso y obesidad, los cuales fueron: viabilidad y anomalías morfológicas de los espermatozoides (cabeza amorfa, pieza media angulada, pieza media asimétrica, flagelo angulado y flagelo enrollado). Los grupos de sobrepeso y obesidad presentan una disminución en la viabilidad y un incremento en las anomalías con respecto al grupo control. En cuanto a las anomalías morfológicas de los espermatozoides se encontró que en los grupos de sobrepeso y obesidad se suscitó un incremento en las anomalías de pieza media angulada, así como de flagelo angulado y enrollado con respecto al control.

Viabilidad y morfología espermática en los grupos experimentales de ratas Wistar

Grupo Experimental	Parámetros espermáticos					
	Viabilidad	Anormalidad morfológica del espermatozoide				
		Cabeza amorfa	Pieza media angulada	Pieza media asimétrica	Flagelo angulado	Flagelo enrollado
Control	96 ±3 ^a	1 ± 1 ^a	7±6 ^a	0 ^a	13 ±2 ^a	2 ±2 ^a
Sobrepeso	70 ±10 ^b	2 ±1 ^b	19±9 ^b	1±1 ^{ab}	45±17 ^b	14±15 ^{ab}
Obesidad	32±20 ^c	3±1 ^c	34±9 ^c	1± 1 ^b	54±14 ^b	22±20 ^b

Tabla 3. Parámetros espermáticos en ratas Wistar con dieta balanceada (grupo control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (grupos de sobrepeso y obesidad). Los grupos experimentales están dados por la $\bar{X} \pm DE$, donde, viabilidad: $F(2,15) = 107.5754$, cabeza amorfa: $F(2,15) = 25.63$, pieza angulada $F(2,15) = 50.0211$, pieza asimétrica $F(2,15) = 13.5395$, flagelo angulado $F(2,15) = 49.7483$ y flagelo enrollado $F(2,15) = 9.4159$, ($p < 0.05$); donde letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, Tukey-Kramer.

Actividad enzimática de SOD, CAT y GPx en testículo y epidídimo

➤ Curva estándar de proteínas

La curva estándar de proteínas para tejido testicular y epididimario de ratas Wistar se expone en la figura 9, la cual fue construida empleando concentraciones crecientes de albumina sérica bovina con el fin de determinar la cantidad de proteínas contenida en las muestras de tejido testicular y epididimario, obteniendo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9948$.

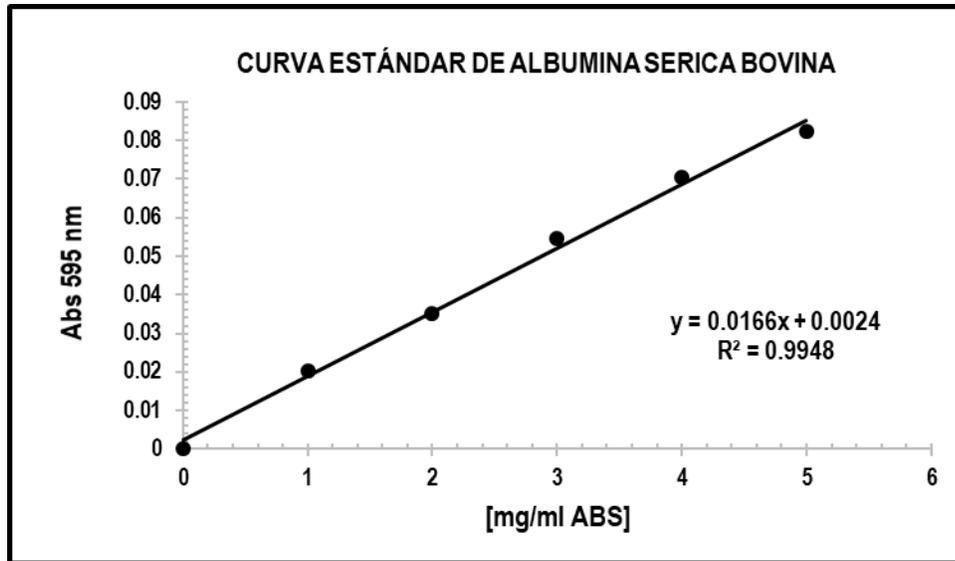


Figura 9. Curva estándar de albúmina para cuantificación de proteínas. El eje x representa la concentración en mg/mL y el eje y la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de luz UV. La $R^2 = 0.9948$, $\bar{X} \pm DE$.

➤ Cuantificación de proteínas

En cuanto a la concentración de proteínas de tejido testicular y epididimario, puede observarse en la figura 10, que se efectúa la comparación cuantitativa de proteínas entre los grupos experimentales de ratas Wistar, a lo cual el análisis estadístico indica que los grupos de sobrepeso y obesidad presentan una concentración de proteínas significativamente más baja con respecto al grupo control.

Por otro lado, en la figura 11 se observa la comparación cuantitativa de proteínas en las tres regiones de tejido epididimario (*caput*, *corpus* y *cauda*) entre los grupos experimentales de ratas Wistar, donde análisis estadístico indica que los grupos de sobrepeso y obesidad en el *caput* presentan una concentración de proteínas significativamente más baja con respecto al grupo control, mientras que para *corpus* y *cauda* solo los grupos de obesidad muestran una disminución significativa con respecto al grupo control.

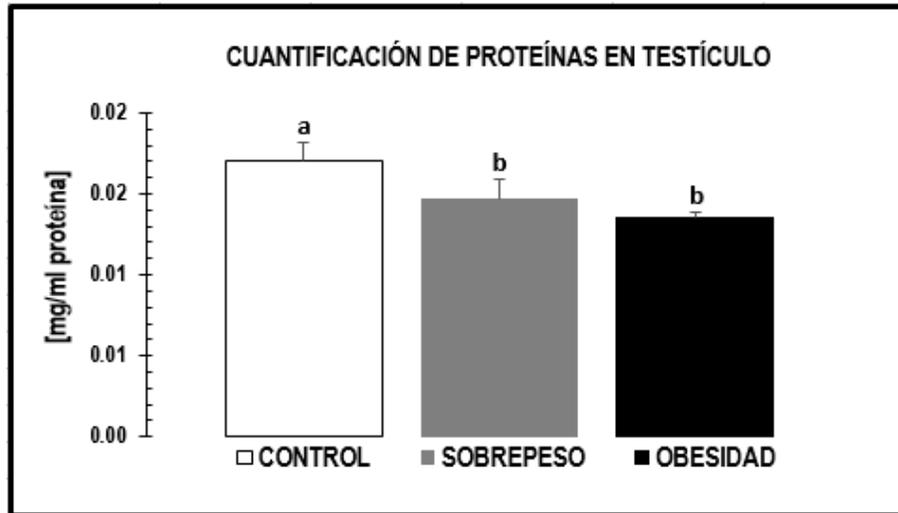


Figura 10. Imagen gráfica que representa de la cuantificación de proteínas en testículo de ratas Wistar con dieta balanceada (grupo control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (grupos de sobrepeso y obesidad). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. $\bar{X} \pm DE$, $F(2,15) = 20.1725$, ($p < 0.05$); Tukey-Kramer.

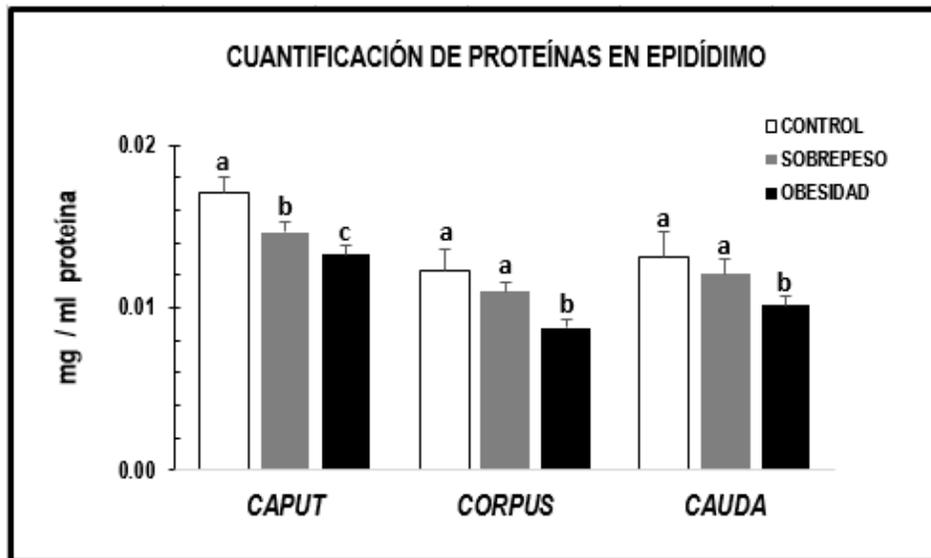


Figura 11. Imagen gráfica que representa la cuantificación de proteínas en las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) en rata Wistar en los grupos con dieta balanceada (grupo control), dieta hiperlipídica al 10% y al 60% de grasas (grupos de sobrepeso y obesidad). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. $\bar{X} \pm DE$, donde, *caput*: $F(2,15) = 47.6729$, *corpus*: $F(2,15) = 21.8466$ y *cauda* $F(2,15) = 11.8875$, ($p < 0.05$); Tukey-Kramer.

➤ **Curva estándar para la determinación de la actividad específica de SOD**

Para la determinación de la actividad específica de SOD se elaboró una curva estándar de SOD tanto para tejido testicular como epididimario de ratas Wistar (figura 12), las cuales se prepararon empleando el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a Log_{10} , para determinar la concentración de unidades SOD/ml en las muestras de tejido testicular y epididimario, obteniendo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9728$

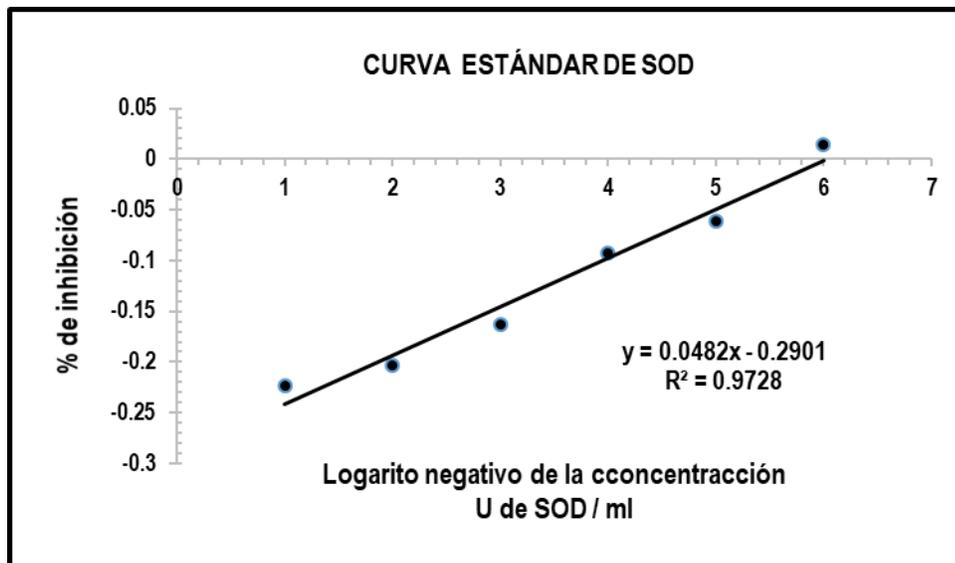


Figura 12. Curva estándar de SOD en testículo de rata Wistar para determinar actividad específica de SOD. El eje x representa el logaritmo negativo de la concentración dado en U de SOD/ml, el eje y indica el % de inhibición. La $R^2 = 0.9728$.

➤ **Actividad específica de SOD**

Las figuras 13 y 14 revelan la actividad específica de la enzima antioxidante SOD en tejido de testículo y epidídimo para grupos experimentales de ratas. Observándose en tejido testicular, un aumento significativo de la actividad específica de SOD para los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al grupo

control, mientras que en el tejido epididimario se observa un comportamiento similar al que ocurre en el testículo, aunque en este se presenta un aumento mayor en *caput* y *cauda*, siendo menor en *corpus*. En las tres regiones del epidídimo la actividad específica de SOD muestra un comportamiento similar en donde los grupos de sobrepeso y obesidad tienen un aumento significativo de la actividad específica de SOD con respecto al control, sin embargo, en *caput* y *corpus* no existe diferencia significativa entre ellos, mientras que en la *cauda* sí existe una diferencia significativa entre grupos.

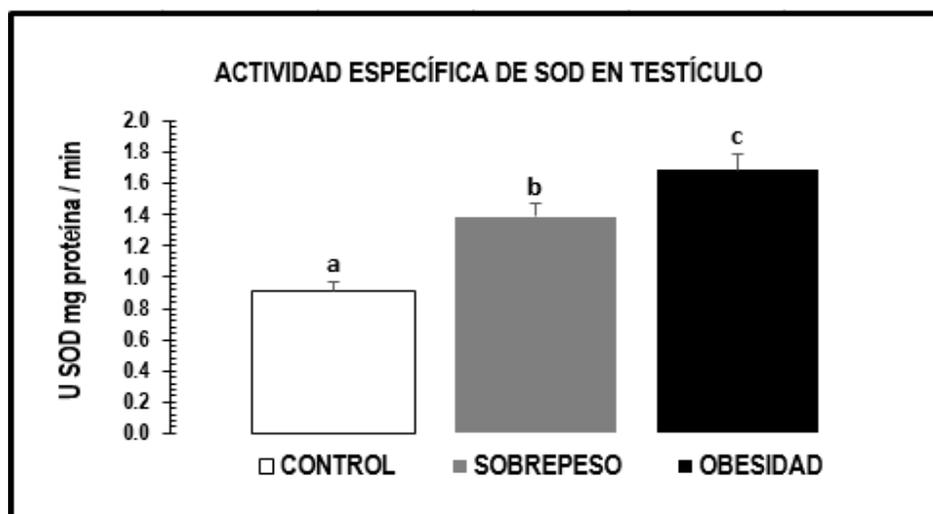


Figura 13. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante SOD en testículo de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de SOD expresada en U mg de proteína / min. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales. $\bar{X} \pm DE$, $F(2,15) = 141.2463$, ($p < 0.05$); Tukey-Kramer.

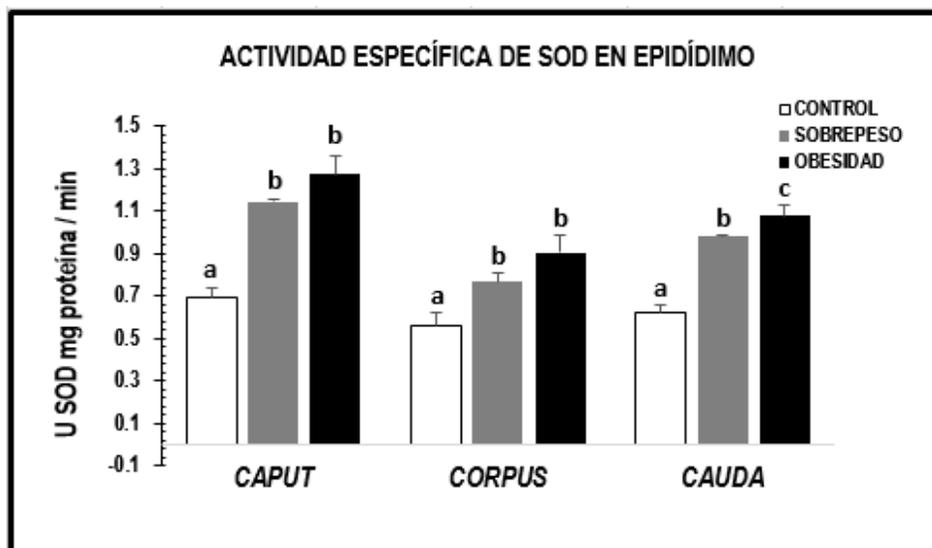


Figura 14. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante SOD en las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de SOD expresada en U mg de proteína / min. Letras diferentes indican diferencias significativas. $\bar{X} \pm DE$, teniendo para *caput* una $F(2, 15) = 161.1039$, para *corpus*; $F(2, 15) = 42.0521$ y para *cauda*: $F(2, 15) = 237.3842$, ($p < 0.05$).

➤ Actividad específica de CAT

En las figuras 15 y 16 se indican los resultados obtenidos de la actividad específica de la enzima antioxidante CAT en tejido de testículo y epidídimo de rata Wistar para grupos experimentales, donde puede apreciarse que la actividad específica de CAT en el tejido testicular incrementa significativamente en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al control, por otra parte la actividad específica de CAT en el tejido epididimario se ve significativamente aumentada en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al control, además se observa en *caput*, *corpus* y *cauda* un aumento significativo de la actividad específica de CAT en sobrepeso y obesidad con respecto al control, sin embargo *caput* y *cauda* tienen mayor actividad específica de CAT en los tres grupos experimentales con respecto a *corpus*.

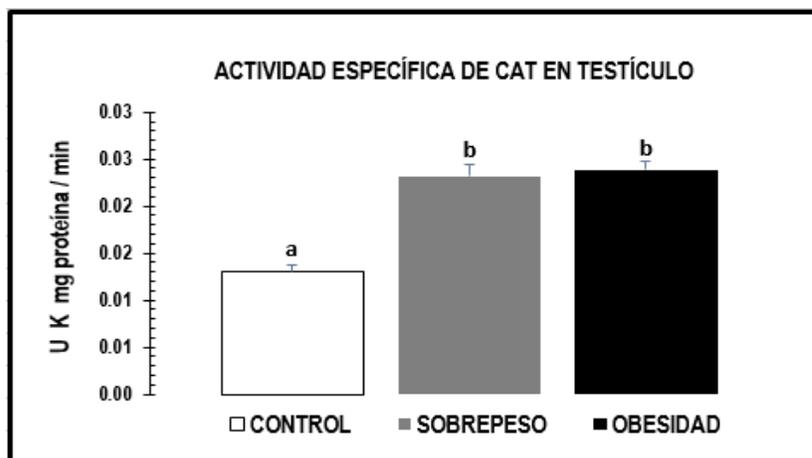


Figura 15. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante de CAT en testículo de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de CAT expresada en U K mg de proteína / min. Donde a y b indican diferencias significativas entre los grupos experimentales. $\bar{X} \pm DE$, $F(2, 15) = 222.9292$ ($p < 0.05$); Tukey-Kramer.

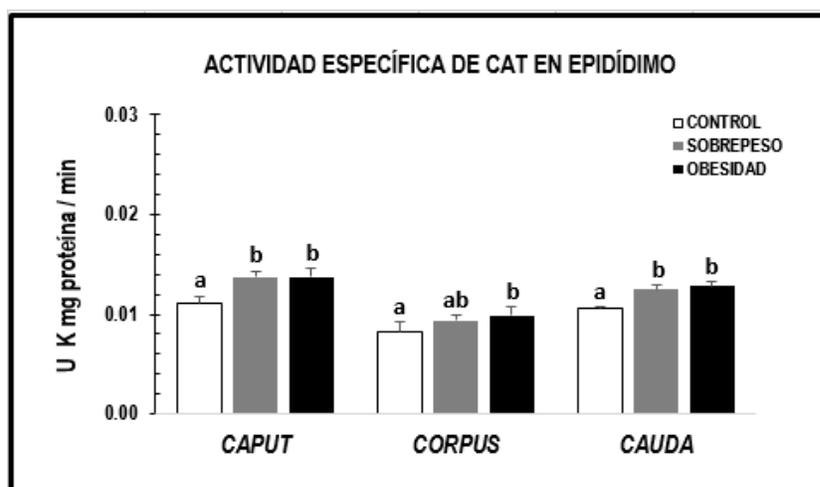


Figura 16. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante CAT en las tres regiones del epidídimo (caput, corpus y cauda) de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de CAT expresada en U K mg de proteína / min. Donde a y b indican diferencias significativas entre los grupos experimentales. $\bar{X} \pm DE$, teniendo, caput: $F(2, 15) = 24.8304$, corpus: $F(2, 15) = 7.6214$ y para cauda: $F(2, 15) = 56.6689$, ($p < 0.05$); Tukey – Kramer.

➤ Actividad específica de GPx

Así mismo se observa en las figuras 17 y 18 la actividad específica de la enzima antioxidante GPx en tejido de testículo y epidídimo de rata Wistar para los grupos experimentales, donde se indica para el tejido testicular una elevación significativa en la actividad específica de GPx en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al control, por otro lado en el tejido epididimario, se observa en *caput*, *corpus* y *cauda* un aumento significativo de la actividad específica de GPx en sobrepeso y obesidad con respecto al control, sin embargo *caput* y *cauda* tienen mayor actividad específica de GPx en los tres grupos experimentales con respecto a *corpus*.

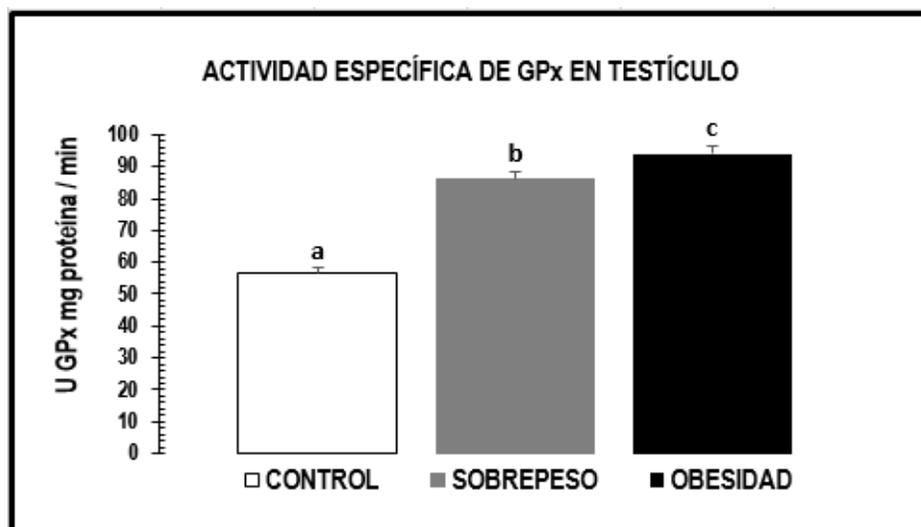


Figura 17. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante de GPx en testículo de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de GPx expresada en U mg de proteína / min. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales. $\bar{X} \pm DE$, $F(2,15) = 490.3473$ ($p < 0.05$); Tukey-Kramer.

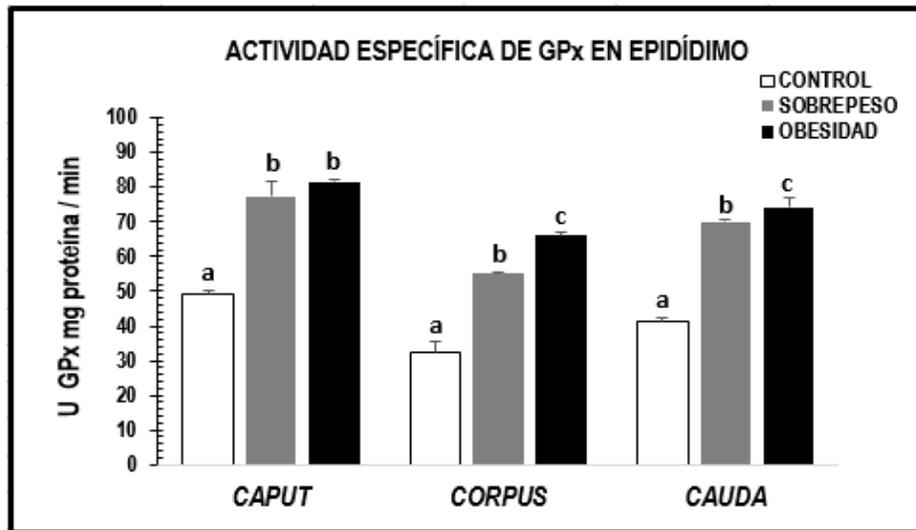


Figura 18. Representación gráfica de la actividad específica de la enzima antioxidante GPx en las tres regiones del epidídimo (caput, corpus y cauda) de ratas Wistar con dieta balanceada (control) y dieta hiperlipídica al 10% y 60% de grasas (sobrepeso y obesidad). La actividad específica de GPx expresada en U mg de proteína / min. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales. $\bar{X} \pm DE$, teniendo para *caput*: $F(2,15) = 296.5441$, mientras que para *corpus*: $F(2,15) = 445.0143$ y para *cauda*: $F(2,15) = 616.8832$, ($p < 0.05$); Tukey–Kramer.

DISCUSIÓN

Debido al gran impacto que el sobrepeso y la obesidad pueden tener en la salud reproductiva masculina, en el presente estudio se evaluó la asociación entre el incremento de tejido adiposo y la infertilidad masculina, mediante el uso de un modelo por inducción de obesidad, a través de una dieta hiperlipídica comercial en ratas Wistar para la inducción de sobrepeso y obesidad (Diemen, *et al.*, 2006; Luque, *et al.*, 2015; Liu y Ding., 2017).

El sobrepeso y obesidad son padecimientos cuya característica, es el exceso de grasa corporal y es con base en diferentes estimaciones antropométricas (medición del peso corporal, pliegues grasos y combinaciones de dimensiones corporales como el IMC, circunferencia de cintura y el índice cintura/cadera (ICC)) que se puede determinar el grado de obesidad en humanos (4-6); cabe mencionar el IMC es la medida más utilizada para indicar el exceso de grasa corporal en humanos, el cual está dado por la relación entre el peso y la talla al cuadrado (Kg/m^2), y se define a sobrepeso si el $\text{IMC} \geq 25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ u obesidad si el $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ (Du Plessis, *et al.*, 2010; Cabler, *et al.*, 2010; OMS, 2018); sin embargo es necesario señalar que no todos los individuos con obesidad muestran subinfertilidad y que aquellos con alteraciones en su fertilidad, frecuentemente presentan obesidad mórbida ($\text{IMC} > 40$) (Giagulli, *et al.*, 1994; Roth, *et al.*, 2008), fenómeno que realza la importancia de estudiar los mecanismos bajo los cuales los estados de sobrepeso y obesidad pudiesen inducir infertilidad masculina.

De igual manera en las ratas existen parámetros para determinar el grado de obesidad mediante la analogía de parámetros antropométricos (peso y longitud corporal de las ratas) que se puede determinar con el índice de Lee (1928), el cual es el análogo de IMC en humanos, de modo que permite estimar la composición corporal en ratas (Bernardis, *et al.*, 1970; Sclafani y Gorman, 1977; Malafia, *et al.*, 2013) y al igual que el IMC, Lee categoriza sus propios parámetros, estableciendo que valores menores a 0.300 se consideran como normopeso, mientras valores

mayores a 0.300 se definen como obesidad (Bernardis, 1968; Novelli, *et al.*, 2007; Jeyakumar, *et al.*, 2009).

A través de diversos estudios se han empleado dietas hiperlipídicas como modelos para el estudio de intolerancia a la glucosa, dislipidemia y obesidad en roedores, oscilando entre el 20 y el 70% de grasas de aporte a la dieta (Fan Y, *et al.*, 2015; Ferramosca, *et al.*, 2017), y se ha reportado que esta dieta induce el incremento de peso corporal, aumento de grasa abdominal, inflamación, hiperleptinemia e incremento de ácidos grasos libres circulantes (Lamba, *et al.*, 2010; Parekh, *et al.*, 1998); cabe señalar que la importancia de este tipo de dietas radica en su alto contenido de ácidos grasos saturados, característica que propicia el desarrollo de tejido adiposo y por ende del aumento de peso, debido a que estas moléculas al tener una elevada densidad energética ocasionan que se vea mermada no solo su oxidación sino también la termogénesis (Hariri y Thibault, 2010). Además en la cepa de rata Wistar la dieta hiperlipídica es la más empleada pues se adquiere en corto tiempo el estado de obesidad, ya que estudios sugieren que al administrar la dieta durante un mes las ratas logran adquirir con facilidad sobrepeso u obesidad (Buettner, 2006, Viguera-Villaseñor, *et al.*, 2010), motivo por el cual en el presente estudio se utilizó la dieta hiperlipídica como modelo de inducción de sobrepeso y obesidad adicionando el 10 y 60% de grasas saturadas a la dieta.

Para definir si los animales en este ensayo alcanzaron el estado de sobrepeso u obesidad se determinó el índice de Lee, apreciando que las ratas sometidas a la dieta hiperlipídica al 10 % indican un índice de Lee de 0.329, mientras las ratas con dieta hiperlipídica al 60% exhiben un índice de Lee de 0.339 (véase tabla 2), lo que sugiere que ambos grupos de ratas están en el rango de obesidad, de acuerdo a lo que reportan distintos estudios (Bernardis, 1968; Novelli, *et al.*, 2007; Jeyakumar, *et al.*, 2009; Viguera, *et al.*, 2010); pese a que ambos grupos muestran grado de obesidad de acuerdo a lo establecido por el índice de Lee, se realizó la comparación de patrones de peso, para establecer las diferencias entre ambos grupos y determinar si correspondían a condiciones de sobrepeso u obesidad, debido a que estudios realizados por Malafia *et al.*, 2013, señalan que determinar el índice de Lee

no es suficiente para asegurar el grado de obesidad, debido a que este parámetro incluye solamente la masa del animal, pero no considera la masa grasa contenida en el mismo, como ocurre en el grupo con dieta hiperlipídica al 10% de grasas, debido a que este grupo de ratas presentaron un índice de Lee de 0.329 (véase tabla 2) que cae en el rango de obesidad, sin embargo mostraron menor ganancia de peso (véase figura 7) respecto al grupo con dieta hiperlipídica al 60%.

Por ello para establecer adecuadamente los grupos de inclusión se consideraron patrones de peso en relación a la dieta, lo cual se estipuló en referencia a un estudio llevado a cabo por Wood (2013), quien expresa que ratas con una dieta hiperlipídica al 10% incrementan su peso entre el 10 - 25% con respecto al grupo con dieta balanceada, lo que indica obesidad moderada o bien considerada como sobrepeso y explica que al administrar dietas hiperlipídicas al 60 - 75 % de grasa, las ratas exhiben un incremento de peso de hasta más de un 40% lo que hace referencia a un estado de obesidad severa. Con base a los resultados obtenidos en este ensayo y en relación a lo ya reportado se concluye que las ratas con dieta de 10 y 60% de grasa incrementaron su peso con respecto al control, lo cual puede notarse en la figura 9 observando que los animales que recibieron una dieta al 10% de grasa, presentaron una ganancia de peso de 27.7%, mientras que los animales que llevaron una dieta al 60% de grasa expresaron una ganancia de peso de 53.54%.

A medida que se establecen estados de sobrepeso u obesidad se produce un incremento de tejido adiposo que conlleva a problemas de infertilidad masculina (Cabler, *et al.*, 2010) ya que se han reportado casos de individuos obesos con problemas de fertilidad los cuales se caracterizan por tener alteraciones físicas y hormonales que afectan la calidad espermática, sin embargo hasta el momento no está claro si los problemas reproductivos son debidos en su totalidad a la obesidad o bien si ya desde estadios de sobrepeso hay indicios o daños que puedan estar ligados a la infertilidad.

Por consiguiente, distintos investigadores se han dado a la tarea de estudiar la relación entre el IMC y la calidad seminal y se ha informado que hombres con

obesidad muestran una reducción en la concentración espermática y también se ha reportado que presentan una mayor incidencia de astenozoospermia (25), en cuanto a la morfología espermática, se sugiere una correlación positiva entre el IMC y la morfología espermática (Magnusdottir, et al., 2005; Hanafy, et al., 2007), señalando una relación entre el IMC y la fragmentación del ADN espermático (Hammoud et al., 2008; Stewart et al., 2009).

Numerosas investigaciones indican que el incremento de tejido adiposo induce alteraciones endocrinas (Cabler, et al., 2010; Oliveira, et al., 2017; Jia, et al., 2018), y demuestran que el perfil hormonal de hombres cuyo IMC es mayor a 30 se caracteriza por una marcada disminución en la concentración de gonadotropinas y en los niveles de testosterona total, así como un aumento en los niveles plasmáticos de estrógenos (Pascuali et al., 2007; Bélanger et al., 2002) que desencadenan alteraciones en la calidad espermática (Jensen et al., 2002; Garlic, et al., 2010) por tanto esta hipotestosteronemia – hiperestrogenemia son el resultado principalmente del aumento de los estrógenos circulantes, los cuales a su vez pueden incrementar la retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas inhibiendo el estímulo para la producción adecuada de Testosterona (Hammoud, et al., 2006) y por consiguiente ha sido asociada con la infertilidad (Martini, et al., 2012).

Además, investigaciones en modelos de obesidad en ratas demuestran que estos animales al igual que en humanos presentan una disminución de testosterona y un incremento de estradiol que afecta la calidad espermática (Vigueras-Villaseñor, et al., 2010), así mismo, investigadores reportan que en animales obesos el incremento de estrógenos tiene efectos negativos directos no solo sobre la producción y concentración espermática sino también sobre el peso de los testículos, los epidídimos y vesículas seminales (González-Morán, 2017), lo que indica que su participación junto con la testosterona es indispensable para mantener el ambiente idóneo que permita el desarrollo y supervivencia de los espermatozoides; siendo entonces, la acción de los estrógenos imprescindibles en el desarrollo y función del epitelio testicular y epididimario (Fisher, et al., 1997; Hess, et al., 1997b; Couse, et al., 1997; Sar y Welsch, 2000), lo que sugiere que

alteraciones endocrinas debidas al incremento de tejido adiposo afectan la espermatogénesis y maduración espermática e induce alteraciones en los parámetros espermáticos (Cabler, *et al.*, 2010; Palmer, *et al.*, 2012; Lancellotti, *et al.*, 2013; Oliveira, *et al.*, 2017; Jia, *et al.*, 2018).

En esta investigación pudo observarse que los parámetros espermáticos se comportaron de manera similar con lo ya reportado, dado que al comparar con lo antes mencionado puede distinguirse en la tabla 3 que el incremento de adiposidad trae consigo alteraciones de los parámetros espermáticos ya que al administrar una dieta hiperlipídica al 10% se presentó una disminución en la viabilidad espermática teniendo una media de 70 ± 10 la cual es significativa con respecto al control, donde se observó que ratas con dieta hiperlipídica al 60% tuvieron una mayor disminución en la viabilidad con una media de 32 ± 20 con respecto al control, además de que en los grupos de sobrepeso y obesidad tuvieron un incremento significativo en las anomalías principalmente en pieza media angulada y flagelo angulado y enrollado con respecto al control. Por tanto, el incremento de tejido adiposo por inducción de dietas hiperlipídicas alteraron los parámetros espermáticos, lo cual es consistente con lo ya reportado.

Los parámetros espermáticos pudieran verse afectados por la presencia de tejido adiposo en la zona escrotal, lo que puede explicarse por un lado por el excesivo consumo de energía que ocurre en la obesidad (Boticario y Cascales, 2012; Cascales, 2013; Dodson, *et al.*, 2011) el cual conduce a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, debido a que los lípidos presentes alteran la fisiología del adipocito por lo que tienden a acumularse principalmente en la zona abdominal, así como en el área suprapúbica, escrotal y epididimaria en humanos, sin embargo en ratas Wistar con obesidad se ven aumentados los depósitos de grasa a nivel mesentérico, epididimario y escrotal (Weisberg SP, *et al.*, 2003; Marcela Reyes J, 2010; García-Torres D, *et al.*, 2019); y por otro lado esta alteración que ocurre en los adipocitos inducen estrés celular que como resultado desencadena un proceso inflamatorio (Fernando Manzur, *et al.*, 2010; Fain N, 2006; Xu H, *et al.*, 2003; García-Torres D, *et al.*, 2019).

Aunado a lo anterior, los bajos niveles de testosterona y la alteración de los adipocitos que se producen en la obesidad, inducen la secreción de factores proinflamatorios por parte de los adipocitos, entre los que se encuentran, el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), inhibidor del activador del plasminógeno-1, resistina, proteína quimioatrayente de monocitos-1, etc. (Rao, *et al.*, 2013; Javier Gómez- Ambrosi, *et al.*, 2008; Fernando Manzur, *et al.*, 2010; Rico-Rosillo, *et al.*, 2012; García-Torres D, *et al.*, 2019), que como resultado inducen el aumento en la secreción de moléculas de adhesión causando efectos locales en el endotelio, debido a que estas moléculas alteran la permeabilidad vascular al inducir la infiltración de monocitos y la posterior acumulación de macrófagos, con lo que se desarrolla un estado inflamatorio, el cual se perpetua debido a que estos macrófagos continúan secretando factores quimiotácticos atrayentes, reclutando y acumulando más macrófagos (Curat CA, *et al.*, 2004; Nishimura S, *et al.*, 2008; García-Torres D, *et al.*, 2019). Así mismo, estudios sugieren que al ser frecuente la muerte de los adipocitos en la obesidad, se le relacione con la hipoxia. Pues ha sido a través de modelos de obesidad en animales que se ha podido demostrar que durante las primeras fases en las que incrementa el volumen de tejido adiposo (Surmi BK, *et al.*, 2008), comienza a disminuir el riego sanguíneo generando zonas de hipoxia y se ha visto que la secreción de citosinas proinflamatorias en estas zonas que presentan hipoxia es regulada por la disminución de oxígeno, de modo que esta baja de oxígeno estimula a los adipocitos para la producción de TNF- α , lo que promueve el incremento de apoptosis y necrosis de los adipocitos (Trayhum P, *et al.*, 2008).

Además, estudios indican que el incremento de depósitos de grasa en el área escrotal afecta gravemente la espermatogénesis, debido a la elevación de la temperatura en la zona testicular (Kramer y Campbell, 1994; Lifshitz, 1994) lo cual se origina por la presencia de tejido adiposo el cual rodea al testículo alterando el funcionamiento del plexo pampiniforme al quedar este también cubierto, viéndose afectado el enfriamiento de la sangre de la arteria testicular, lo que conduce a una estasis venosa la cual infiere con la presión parcial del oxígeno alterando el metabolismo aerobio de los testículos al aumentar la concentración de CO₂,

mientras que el reflujo de sangre que va de la vena renal que contiene metabolitos tóxicos desemboquen en el testículo causando vasoconstricción generando hipoxia (Vásquez, et al., 2009), e investigadores han sugerido que este aumento en la temperatura testicular está asociado con una elevación del estrés oxidante (Shiou-Sheng et al., 2008); a través de estudios en varicocele, se ha podido demostrar que la hipertermia testicular leve transitoria genera un desequilibrio entre la capacidad oxidante y antioxidante (Lee JD, et al 2007; Vásquez, et al., 2009), sumado a esto se ha reportado que los espermatozoides son sensibles al estrés oxidante, es decir son altamente susceptibles a ERO (superóxido y péroxido de hidrógeno)(18,19) pudiendo generar daño en la membrana plasmática, así como fragmentación de DNA de los espermatozoides (Ruiz-V, 2015), de tal modo que el incremento en la temperatura escrotal se asocia con la disminución en el número de espermatozonias así como en un incremento de apoptosis en las células del epitelio germinal (Naughton, et al., 2001;Vigueras-Villaseñor, et al., 2010).

Por lo que algunos estudios señalan que varones con obesidad presentan gran cantidad de grasa en las zonas suprapúbica, escrotal y epididimaria, mientras que estudios indican que en ratas Wistar obesas se ven aumentados los depósitos de grasa mesentéricos, epididimarios y escrotales; ahora bien, refiriendo que durante la utilización de dietas se induce el incremento de peso y de grasa, en el presente estudio se estimó la diferencia de grasa escrotal y de acuerdo a los resultados se evidencio que al estimar la diferencia de grasa escrotal, los resultados mostraron ser congruentes con lo ya reportado, debido a que el incremento de tejido adiposo muestra tener una relación con respecto a los parámetros espermáticos como se muestra en la figura 8 y en la tabla 3, donde se indica que el grupo con una dieta hiperlipídica al 60% de grasas presentó un incremento de grasa gonadal del 25% en comparación con las ratas control, por consiguiente los resultados confirman que el incremento de grasa gonadal es dependiente del aumento de peso.

La mayor parte de los efectos de la testosterona en el hombre (grosor de la piel, aumento de metabolismo, distribución del vello, desarrollo muscular, aumento de matriz ósea etc.) se deben a la estimulación que induce ésta para la producción de

proteínas en el organismo (Gayton y Hall, 2011). Estudios reportan en obesidad un declive de testosterona, por lo que pudiera alterarse la síntesis proteica, ocasionando un efecto negativo sobre la concentración de proteínas, como se observa en las figuras 10 y 11, en cuyos resultados se indica una disminución en la concentración de proteínas para los grupos de sobrepeso y obesidad tanto para testículo como para epidídimo con respecto a los grupos control, sin embargo en el epidídimo se observaron diferencias en las tres regiones, donde la disminución es mayor en *corpus* que en *caput* y *cauda* del epidídimo.

El sistema enzimático es una protección para los espermatozoides ante el daño causado por EROs, el cual es un evento considerado como uno de los principales problemas que conducen a la infertilidad (Koziorowska-Gilun, *et al.*, 2011), debido a que el ataque de EROs ocurre a nivel de membrana celular por procesos de lipoperoxidación (Batellier, *et al.*, 2001), así como también dañan la integridad del ADN del esperma, lo que limita el potencial fertilizante, alterando los parámetros espermáticos (Aitken, *et al.*, 2014). Sin embargo, cabe señalar que también se ha demostrado la importancia de la presencia de EROs, pues se ha visto que estas contribuyen en la diferenciación celular en el epitelio testicular, aunque un incremento excesivo de estas moléculas puede alterar la diferenciación y afectar la calidad espermática.

Así mismo, diversos estudios en animales, han demostrado que las enzimas antioxidantes SOD y GPx son las más importantes en la protección antioxidante que ejerce el plasma seminal (PS) en los espermatozoides (Chihuilaf, *et al.*, 2001; kowalowka, *et al.*, 2008). SOD es una enzima que actúa extracelularmente en el tracto reproductor masculino, la cual se encuentra en mayor grado en tejidos y fluidos extracelulares (linfa y plasma celular) procedentes del epidídimo, próstata y glándulas seminales (Mruk, *et al.*, 2002; Venéreo, 2002; Kowalowka, *et al.*, 2008), la cual se ha descrito en distintos modelos animales (ratón, cerdo y verraco) en su isoforma SOD2, cuya mayor expresión se presenta en las células de Leydig y en menor grado en las células espermátogénicas (Cui Y, *et al.*, 2008) y se ha sugerido una correlación entre la disminución de la actividad de SOD en semen con respecto

a la edad del animal (Matheus-Cortez y López-Ortega, 2008). Sin embargo, también se ha revelado en otros estudios que en el epidídimo hay una mayor actividad de SOD y GPX en el *caput* y *cauda* del epidídimo de rata (Godeas, *et al.*, 1997; Tramer, *et al.*, 1998).

En el presente estudio los resultados revelaron una mayor actividad específica de SOD y GPx en testículo con respecto al epidídimo (véase figuras 13,14, 17 y 18), mientras que en las distintas regiones del epidídimo también se encontraron variaciones en cuanto a la actividad específica de estas enzimas, viéndose una mayor actividad en *caput* y *cauda*, las cuales son significativas con respecto al control.

La enzima antioxidante GPx de las más relevantes en el sistema antioxidante en el tracto reproductor masculino, pues se ha encontrado en mayor concentración en el epitelio testicular con respecto a otras enzimas antioxidantes (koziorowska, *et al.*, 2011) y de ésta se han reportado hasta 4 isoformas de GPx asociadas a los fluidos epididimarios (Jiménez, 1992; Chavory, *et al.*, 2010), su función es resguardar a la células contra los peróxidos generados del metabolismo celular, al proporcionar una protección ante el daño oxidativo así como al choque frío que afecta a las membranas de las células espermáticas (Li, *et al.*, 2010) e informes indican una mayor actividad de GPx en testículo que en epidídimo (Vernet, *et al.*, 2001), de modo que los resultados que arrojo este ensayo resultaron congruentes debido a que se observó una disminución en la actividad de glutatión en el epidídimo con respecto al testículo (8,9,12 y13), además puede apreciarse que hay un incremento de actividad específica de GPx en estados de sobrepeso y obesidad en ambos órganos con respecto al grupo control, lo que podría indicar que posiblemente se están formando EROs, siendo metabolizadas por CAT y GPx.

En cuanto al comportamiento de la actividad específica en relación a las dietas hiperlipídicas al 10 y 60% de grasas se pudo apreciar un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx con respecto a los controles, viéndose elevada en sobrepeso y obesidad (véase figuras 13,14, 17 y 18). Este comportamiento en el aumento de la actividad específica de SOD y GPx para los

grupos de sobrepeso y obesidad podría estar relacionado con la actividad de SOD para proporcionar protección al espermatozoide, ya que al aumentar la producción de ion superóxido aumenta la actividad de SOD para transformarlo a peróxido de hidrógeno, el cual aumenta y es metabolizado por GPx, es decir que estas enzimas funcionan como un sistema para regular el estado redox del ambiente testicular y epididimario.

El medio catalítico de CAT utiliza como sustrato H_2O_2 , cuya presencia se ha descrito en el citoplasma de las células, además de que actúa a mayores concentraciones de sustrato, sin embargo, en procesos de peroxidación la enzima predomina en concentraciones inferiores de sustrato (Vernet, *et al.*, 2004) y se ha encontrado que un aumento en la actividad de SOD en fluidos epididimarios y prostáticos se asocian a la alta actividad de CAT o GPx en estos fluidos (Koziorowska, *et al.*, 2011).

De acuerdo a los resultados en este estudio se encontró la presencia de CAT en testículo y epidídimo (figuras 15 y 16) sin embargo se encontró una baja actividad específica de la misma si se compara con respecto a SOD y GPx, lo cual concuerda con lo reportado, al ser las enzimas antioxidantes que predominan en la protección de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino. (Chihuilaf, *et al.*, 2001; kowalowka, *et al.*, 2008).

La actividad específica de CAT en testículo y epidídimo se vio incrementada en los estados de sobrepeso y obesidad con respecto a los grupos control, además puede verse que CAT tiene una menor actividad específica con respecto a GPX y SOD, sin embargo, puede verse que si hubo un ligero aumento para los grupos de sobrepeso y obesidad (figuras 15 y 16), de acuerdo a los resultados estos nos sugieren que la actividad específica de CAT en el trato reproductor masculino, participa junto con GPx, para metabolizar el peróxido de hidrógeno, aunque es ligeramente más alta en testículo que en epidídimo.

Por tanto, es probable que se presente un exceso de estrés oxidante en las ratas con sobrepeso y obesidad debido a que las dietas altas en grasas, incrementan la cantidad de tejido adiposo en la zona escrotal, lo que podría inducir el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos, alteración en el tejido vascular, incremento de

temperatura, apoptosis e hipoxia, desencadenando una mayor producción de ERO, que sirve de estímulo para aumentar la actividad enzimática antioxidante de estas enzimas, aunado con la disminución de testosterona, viéndose disminuida la síntesis de proteínas, lo cual pudiera afectar la actividad del sistema protector, así como una disminución en la viabilidad e incremento de anomalías espermáticas en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al control (tabla 3), lo que indica por un lado que el sistema de protección enzimático antioxidante es eficiente al proteger contra el daño de EROs, así como también se infiere dado los resultados el posible desarrollo de subfertilidad, dado que el conjunto de alteraciones físicas y hormonales pudieran conducir a alteraciones en la calidad espermática, sin ser tan grave.



CONCLUSIONES

La inducción de sobrepeso y obesidad en ratas Wistar mediadas por dietas hiperlipídicas al 10 y 60% de grasas, inducen el incremento de peso y altera la cantidad de grasa en la zona escrotal, afectando dos de los parámetros espermáticos: disminución de la viabilidad y alteraciones en la morfología espermática, encontrando mayor número de anomalías en pieza media, flagelo angulado y enrollado para los grupos de sobrepeso y obesidad.

La actividad específica de SOD, CAT y GPx aumentó en los grupos de sobrepeso y obesidad. La elevación en la actividad específica de SOD, CAT y GPx que se presenta en sobrepeso y obesidad es debida a que contribuyen a resguardar al epitelio testicular y epididimario contra el daño por EROs.

BIBLIOGRAFÍA

Agger P.(1971) Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril*, 22: 286-297.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology Reproduction*, 41:183-197.

Aitken RJ, Buckingham D and Harkiss D. (1993) Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:441–450.

Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW and Irvine DS (1995) Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Human Reproduction*, 10:2061–2071.

Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A. & De Iuliis G.N. 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Journal of Andrology*, 16:31–38.

Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. (2008) ¿Es el sobrepeso un factor de riesgo para reducir la calidad del semen y el perfil alterado de la hormona sérica? *Fertil Steril*, 90:619–626.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1984) Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology Reproduction*, 30:833-841.

Araya Q. Verónica A (2013) Síndrome metabólico y su relación con hipogonadismo tardío. *Revista Medica Clinica CONDES*, 25:55–59.

Arenas-Ríos, Ahiezer Rodríguez-Tobón, Blanca P. López Trinidad, Fabiola M. Retana Sandoval, Ernesto Rodríguez Tobón, Javier E. Jimenez-Salazar, Miguel A. León-Galván (2014) Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática, *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 7: 73-81

Arthur JR and Boyne R. (1985) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sciences*, 36:1569–1575.

Baek, I.J., Seo, D.S., Yon, J.M., Lee, S.R., Jin, Y., Nahm, S.S., et al. (2007) Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *Journal Molecular Histology*, 38:237-244.

Barqueira Cervera Simón, Campos-Nonato Ismael, Rojas Rosalba and Rivera Juan. (2010) Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gaceta Médica de México*, 146:397–407.

Barrera-Cruz Antonio, Rodríguez-González Arturo and Molina-Ayala Mario Antonio. (2013) Escenario actual de la obesidad en México. *Temas de la actualidad*, 51:292–299.

Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. (2008) Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 3:343-68. doi: 10.1586/14779072.6.3.343.

Belanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A (2002) Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res*;34:737–45.

Bernardis LL and Patterson BD. (1968) Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *The Journal of Endocrinology*, 40:527–528.

Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T and Görlach A. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27:755–761.

Boticario C y Cascales M. (2012) *Metalismo energético de Nutrientes*. UNED ISBN 978-84-615-8137-5

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Cabler S, Agarwal A, Flint M and Du Plessis SS. (2010) Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian Journal of Andrology*, 12:480–489.

Cachofeiro Ramos V, Martín-Fernández B, de las Heras Jiménez N, Miana Ortega M and Lahera Juliá V (2006) Obesidad, inflamación y disfunción endotelial 4(4):195–204.

Cascales M. (2013) Obesidad y Mitocondria. *Beresit. Actas Jornada Científica Toledo* pp 28-37

Castillo-Castañeda PC, Gaxiola-Robles R, Méndez-Rodríguez LC, Labrada-Martagón V and Zenteno-Savín T. (2016) Antioxidantes, especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo asociado a la presencia de plaguicidas organoclorados en la leche materna. *Nutrición Hospitalaria*, 33:422–430.

Cervantes MI, Arenas-Ríos E, León-Galván MA, López-Wilchis R, Ambriz D and Rosado A. (2008) Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54:196–204.

Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD and Hauser R. (2010) Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and Sterility*, 93:2222–2231.

Chen C.S., Chao H.T., Pan R.L., y Wei Y.H. (1997) Maintenance of human sperm motility and prevention of oxidative damage through co-culture incubation. *Andrology*, 29:227-233.

Chen C.Y. y Mruk D.D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: sertoli germ cell interactions and male contraceptive development. *Review Physiology*, 82:825-874.

Cohen G, Dembiec D and Marcus J. (1970) Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34:30–38.

Coronado HM, Vega y León S, Gutiérrez TR, Vázquez FM and Radilla VC. (2015) Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42:206–212.

Corrales MSc LC and Muñoz Ariza MM. (2012) Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10:213.

Costabile R. (2013) Anatomy and physiology of the male reproductive system. En: Goldstein M, Schlegel NS. *Surgical and Medical Management of Male infertility*. Cambridge University Press,

Couse JF., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson JA., Korach KS. (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*, 138:4613-4621.

Cui Y, Zhu H, Zhu Y, Guo X, Huo R, Wang X, et al. (2008) Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive. *Journal of proteome research*, 7(9):3984-93

Daniel Díaz-Urbina, Rodrigo Erick Escartín-Pérez, Verónica Elsa López-Alonso y Juan Manuel Mancilla-Díaz. (2018) Efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre patrones conductuales alimentarios. *Colombiana de Psicología*, 21(1):95-105 doi :10.14718/ACP.2018.21.1.5

Daniel Vásquez E, Carolina Díaz, Zenen Carmona y Fernando Vásquez R (2009). Variocel testicular en adolescentes. *Salud Uninorte*, 25(2):245-257

Dastig, S., Nenicu, A., Otte, D.M., Zimmer, A., Seitz, J., Baumgart-Vogt, E., et al. (2011) Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem Cell Bio*, 136:413-425.

De Ferranti S and Mozaffarian D.(2008) The perfect storm: Obesity, adipocyte dys-function, and Metabolic consequences. *Clinical Chemistry*, 54(6):945-955. doi: 10.1373/clinchem.2007.100156.

Díaz-Fontdevila M, Bustos-Obregón E and Fornés M (1992) Distribution of filipin-sterol complexes in sperm membranes from hypercholesterolaemic rabbits. *Andrologia*, 24:279–283.

Dodson MV, Mir PS, Hausman GJ, Guan LL, Du M, Jiang Z, et al. (2011) Obesity, metabolic syndrome, and adipocytes. *J Lipids*, 2011:721686. doi: 10.1155/2011/721686.

Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E and Agarwal A (2010) The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 7:153–161.

Edith A-R, Adolfo RG, Edith C-B, Mina K, Marcela A-S, Ahiezer R-T, Gisela F-M and Angel L-GM (2016) Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bats. *Reproductive Biology*, 16:78–86.

Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, et al. (2014) The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Human Reproduction*, 29(2):193-200.

Elejalde Guerra JI (2001) Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna* 18(6):326-335.

Esper RC, Rivera OIF, Maldonado RN, Zepeda AD, Calatayud AAP and Trujillo AO.(2015) Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(19):6-18

Fàbrega A, Puigmulé M, Yeste M, Casas I, Bonet S and Pinart E. (2011) Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 76:1356–1366.

Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y and Ding Z. (2015) Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS One* 10 e0120775.

Ferramosca A, Moscatelli N, Di Giacomo M and Zara V (2017) Dietary fatty acids influence sperm quality and function. *Andrology*, 5:423–430.

Ferramosca A, Di Giacomo M, Moscatelli N and Zara V (2018) Obesity and Male Infertility: Role of Fatty Acids in the Modulation of Sperm Energetic Metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120:1–6.

Finkel T and Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239–247.

Fisher JS., Millar MR., Majdic G., Saunders PT., Fraser HM., Sharpe RM. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- α within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *The Journal of Endocrinology*, 153:485-495.

Fraczek M and Kurpisz M (2007) Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28:325–333.

Galic, J.S. Oakhill, G.R. Steinberg. (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 316:129–139.

Ganong, W.F. (2002). *Fisiología médica*. ed. 18, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V, México, pp 6:174

García T.B., García M.O., Clapes H. S., Rodes F.L. y García P.J.C. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Rev Cub Invest Biomed* 14:10-14.

Gatti, J.L.; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Métayer, S.; Thimon, V. & Dacheux, J.L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 82-83:321-339, ISSN 0378-4320

Georges Raad, Mira Hazzouri, Silvia Bottini, Michele Trabucchi, Joseph Azoury and Valérie Grandjean. (2017) Paternal obesity: how bad is it for sperm quality and progeny health? *Basic Clin Androl*, 27:20, doi: 10.1186/s12610-017-0064-9

Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G and Hoffler U (2010) Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. *Biology of Reproduction*, 82:96–104.

Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A (1994) Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*;79: 97–1000.

Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G and Panfili E (1997) Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 57:1502–1508.

Goldstein M, Eid JF.(1989) Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol*,142: 743-745.

González-Moran MG (2017) Importance of estrogens in the mammalian male reproductive system. *Journal of veterinary andrology* (2):38-51.

Guyton Arthur C. and Hall John E. (2011) *Tratado de fisiología médica*, Ed ELSEVIER, 12 ed. pp. 835, 982.

Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of cytology*, 233:181-241.

Hammoud IO, Gibson M, Peterson M, Hamilton BD, Carrel DT. (2006) Obesity and male reproductive potencial. *J Androl*, 27:619-626.

Hammoud A. O., M.G. Gibson, C.M. Peterson, B.D. Hammlton and D.T. Correl (2008) Obesity and male reproductive potential. *Journal of Andrology*, 27:2365–2372.

Hanafy, S, Halawa, FA, Mostafa, T, Mikhael, NW, Khalil, KT (2007) Serum leptin correlates in infertile oligozoospermic males. *Andrologia*,39:177-180.

Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48:422–427.

Hernández-Rodríguez, J., Togno-Peirce, C., López de Jesús, P., Pérez-Aguirre, S.G., Arenas-Ríos, E., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Bonilla-Jaime, H., Damián-Matzumura, P. Arteaga-Silva, M. (2016) Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3): 11-21.

Hess RA., Gist DH., Bunick D., Lubahn DB., Farrell A., Bahr J., Cooke PS., Greene GL. (1997b). Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*, 18(6):602–611.

Hess RA. (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:52-65.

Hiatt and Gartner (2015) *Atlas de histología* (6ª. ed) Ed. Médica Panamericana, 6:125

Hicks, Torres-Ramos, Sierres-Ramos, Sierra-Vargas (2006) Estrés oxidante. Concepto y clasificación, *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4, pp 223-226.

Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK and Olsen J (2000) Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *International Journal of Andrology*, 23:309–318.

Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH (2004) Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*;82: 863–70.

Jia Y-F, Feng Q, Ge Z-Y, Guo Y, Zhou F, Zhang K-S, Wang X-W, Lu W-H, Liang X-W and Gu Y-Q (2018) Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urology* 18.

Johnson L, Thomson DL, Jr., Varner DD.(2008) Role of sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal reproduction science*, 105:23-51

Juárez A, Rodríguez D and Pizarro M. (2011) Hipogonadismo asociado a síndrome metabólico en varones infértiles. *Rev Mex Urol*, 87–92.

Kasturi SS, Tannir J and Brannigan RE (2008) The Metabolic Syndrome and Male Infertility. *Journal of Andrology*, 29:251–259

Kelly DM, Jones TH. (2015) Testosterone and obesity. *Obes Rev*, 16:581–606. 1047p.

Kerkhofs, S., Dubois, V., De Gendt, K., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Schuit F., Boonen, S., Vanderschueren, D., Saunders, P.T.K., Verhoeven, G. y Claessens, F 2012. A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 reductase II gene. *The FASEB Journal*, 26(10): 4360-4372.

Knobil E (2006) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol. 1: ... Amsterdam: Elsevier/Academic Press Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Gulf Professional Publishing, 3:27-50

Konigsberg Fainstein, Mina. (2008) Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Ed MANUAL MODERNO, pp 201-217.

Kowalowka M., Wysocki P., Fraser L. & Strzerek J. 2008. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 43:490-496.

Koziorowska GM., Kozioroski M., Fraser L. & Strzerek J. 2011. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod Dom Anim*, 46:527-533.

Kumar R.M., Kumar S., Arora Bhale D.V., Mehta R. & Batra J. 2015. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. *International Journal of Health Sciences and Research* 5, 324 – 333. systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reproductive Biology*, 11:37 – 47.

La Fleur, S., Van Rozen, A., Luijendijk, M., Groeneweg, F., & Adan, R. (2010). A free-choice high fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. *International Journal of Obesity*, 34(3):537-546. DOI:10.1038/ijo.2009.257.

Lee JD, Jeng SY, Lee TH. Bcl-2 (2007) Overexpression in the internal spermatic vein of patients with varicocele. *Med Assoc*; 106(4); 308-312.

Li, Y, Putman-Lawson, CA, Knapp-Hoch, H, Friel, PJ, Mitchell, D, Hively, R, Griswold, MD (2005) Immunolocalization and regulation of cystatin 12 in mouse testis and epididymis. *Biol Reprod*,73:872-80.

Liu Yue and Ding Zhide (2017) Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction*, 154:123–131.

Luers, G.H., Thiele, S., Schad, A., Volkl, A., Yokota, S. and Seitz, J. (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol*, 125:693-703.

Luque E. M., Tissera A., Gaggino M. P., Molina R. I., Mangeaud, Vincenti L. M., Beltramone F., Larcher J. Sad, Estofán M. D, Fiol de Cuneo M. et al. (2015) Body mass index and human sperm quality: neither one extreme nor the other. *Reproduction, Fertility and Development* 29 A-I.

León-Galvan MA, Fonseca T, López-Wilchis R and Rosado A. (1999) Prolonged storage of spermatozoa in the genital tract of female Mexican big-eared bats (*Corynorhinus mexicanus*): the role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology* 77:7–12.

Lomba, A. F. I. Milagro, D. F. Garcia-Diaz, A. Marti, J. Campion, and J. A. Martinez, (2010). *Lipids in Health and Disease*, vol. 9, article 60.

Lucio RA, Tlachi JL, López AA, Zempoalteca R and Velázquez-Moctezuma J. (2009) Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 40:405–415.

Macedo-Márquez A. (2012) La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *saccharomyces cerevisiae*. 15:8.

Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M and Olafsdottir K. (2005) Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human Reproduction*, 20:208–215.

Malafaia AB, Nassif PAN, Ribas CAPM, Ariede BL, Sue KN and Cruz MA (2013) Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva: ABCD*, 1:17–21.

Matheus-Cortéz (2008) Asociación entre la concentración sérica de testosterona y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en testículos de ratones de diferentes edades. 8:12.

Mruk D, Cheng CH, Cheng YH, Mo MY, Grima J, Silvestrini B, Lee WM and Cheng CY (1998) Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biology of Reproduction*, 59:298–308.

Naughton CK, Nangia AJ, Agarwal A. Varicocele and male infertility. Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*, 7(5): 473-81.

Neil K.N., Lamirande E., y Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil.Steril.* 58:809-816.

Nenicu, A., Luers, G.H., Kovacs, W., David, M., Zimmer, A., Bergmann, M., et al. (2007) Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod*, 77:1060-1072.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO (1999) NOM-062-ZOO-1999.

OCDE (2016) OECD Reviews of Health Systems: Mexico 2016. OECD Publishing

O'Donnell L, Stanton P and de Kretser DM (2017) Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. In *Endotext*. Eds LJ De Groot, G Chrousos, K Dungan, KR Feingold, A Grossman, JM Hershman, C Koch, M Korbonits, R McLachlan, M New, et al. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Oliver Bonet María and Mach Núria (2016) Factores nutricionales y no nutricionales pueden afectar la fertilidad masculina mediante mecanismos epigenéticos. *Nutrición Hospitalaria*, 33:1236–1244.

Oliveira PF, Sousa M, Silva BM, Monteiro MP and Alves MG (2017) Obesity, energy balance and spermatogenesis. *Reproduction*, 153:173–185.

Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Mattila M, Dieamant F, Baruffi RLR and Franco JG (2018) Association between body mass index and sperm quality and sperm DNA integrity. A large population study. *Andrologia* 50.

Olivera (2006) El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. 19 11.

Olivares-Corichi, Rafael Medina-Navarro, Yessica D Torres-Ramos, Daniel H Montes-res-Ramos, Daniel H Montes-Cortés (2006) Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina, *Revista de Endocrinología y Nutrición*, (4):237.240.

Paglia DE and Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70:158–169.

Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP and Lane M (2012) Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302:768-780.

P. I. Parekh, A. E. Petro, J. M. Tiller, M. N. Feinglos, and R. S. Surwit, (1998). *Metabolism*, 47(9):1089–1096.

Pascuali R. (2006) Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*,54:363–71.

Pasquali R, Patton L, Gambineri A (2007) Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*,14:482–7.

Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. (2008) Disminución de la paternidad y la función gonadal con aumento de la obesidad en los hombres. *Fertil Steril*, 90: 346–351. 10.1016 / j.fertnstert.2007.06.046

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

Quintero P. W., Mallea S. L., Machado C.A., Llópiz J. N., Céspedes M. E., Monzón B. G., y Yépes O. S. (2000) Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia. *Rev Cub Invest Biomed*, 19:183-185.

Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. (2011) Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med*, 32:305-315

Rao PT, Kelly DM, Jones TH. (2013) Testosterone and insulin resistance in metabolic syndrome and T2DM in men. *Nature Reviews Endocrinology*,9:479-93.

Regalado Sánchez Francisco Ignacio. (1992) PROTEINAS DE SECRECION DEL EPIDÍDIMO DE CONEJO: CARACTERIZACION Y REGULACION POR ANDROGENOS Y TEMPERATURA. Departamento de Biología Molecular: Universidad Complutense de Madrid.

Robaire B. y Viger R. (1995) Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology Reproduction*, 52:226-236.

Robaire, B.; Hinton, B.T. & Orgebin-Crist, MC. (2006). The Epididymis. In: *The physiology of reproduction*, Knobil and J. Neil, (Ed.), pp. 1071-1148, Elsevier, ISBN 978-0-12-515400, New York, EUA.

Robaire B and Hamzeh M (2011a) Androgen Action in the Epididymis. *Journal of Andrology*, 32:592–599.

Robaire, B. y Hinton, B.T. 2015. The Epididymis. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 4th ed, T.M. Plant y A.J. Zeleznik, Eds. USA: Elsevier, pp.619-677

Ross MH, Pawlina W. *Histology* 5a ed. Panamericana 2007, pp992

Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A and Ursini F (1992) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *The Journal of Biological Chemistry*, 267:6142–6146.

Ruiz V.L. (2014) Efecto del sobrepeso sobre la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de conejo Nueva Zelanda Blanco. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana.

Saavedra OM, Vázquez ENJ, Vargas MRBG, Reyes GMC and Bolaina EM. (2010) Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10:32–39.

Sablina AA, Budanov AV, Ilynskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine*. 11(12):1306-13.

Saez Lancellotti TE, Boarelli PV, Romero AA, Funes AK, Cid-Barria M, Cabrillana ME, Monclus MA, Simón L, Vicenti AE and Fornés MW. (2013) Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit. *PLoS One* 8 e52386.

Sar M., Welsch F. 2000. Estrogen receptor α and β in rat prostate and epididymis. *Andrologia*, 32:295-301.

Sclafani A and Gorman AN. (1977) Effects of age, sex, and prior body weight on the development of dietary obesity in adult rats. *Physiology & Behavior*, 18:1021–1026.

Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH. (1979) Aumento de la producción de estrógenos en hombres obesos. *J Clin Endocrinol Metab*, 48: 633-638.

Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N., Mattei, M.G., Dufaure, J.P. and Drevet, J.R. (1995) Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene*, 167:25-31.

Schwaab, V., Lareyre, J.J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J.P., et al. (1998) Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 53:157-162.

Shiou-Sheng Chen, William J. Huang, Luke S, Chang and Yau-Huei Wei (2008) Attenuation of Oxidative Stress After Varicocelectomy in Subfertile Patients With Varicocele *The Journal of urology*; 179:639-642.

Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D. y Breton, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell–cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*, 212 (pt11): 1753-1761.

Soto-Bernardini, MC and Reventós-Vorst H.(2008) The role of oxidative stress in schizophrenia. *Acta Médica Costarricense*, 50:197–202.

Stewart, TM, Liu, DY, Garrett, C, Jorgensen, N, Brown, EH, Baker, HW (2009) Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile australian men: Inverse relationship between obesity and sperm output. *Hum Reprod*,24:1561-1568.

Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-69

Sullivan R, Frenette G and Girouard J.(2007) Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* 9:483–491.

Surai P.F. & Fisinin V.I. 2015. Selenium in pig nutrition and reproduction: Boars and semen quality. *Asian Australas. J. Anim. Sci*, 28:730-746.

Swan H. S, Elkin Eric. P. and Fenster Laura (2000) The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives*, 108:961–966.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species un cell signaling. *American journal of physiology Lung celular and molecular physiology*; 279(6): L1005-28

Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G and Panfili E (1998) Antioxidant Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59:753–758.

Valdecantos MP, Pérez-Matute P and Martínez JA (2008) Obesidad y estrés oxidante: papel de la suplementación con antioxidantes de la dieta. 13.

Vaquero-Raya and Moreno (2018) Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? Gastroenterología y Hepatología, 473–484.

Veal EA, Day AM, Morgan BA (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. Molecular cell, 13;26(1):1-14

Vernet P, Fulton N, Wallace C and Aitken RJ (2001) Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. Biology of Reproduction, 65:1102–1113.

Vigueras-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, Reyes-Romero MM and Zambrano E (2011) Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. Acta Histochemica, 113:214–220.

Visconti, P.E.; Krapf, D.; de la Vega-Beltrán, J.L.; Acevedo, J.J. & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. Asian Journal of Andrology, 13(3):395-405, ISSN 1745-7262.

Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MR. (2006) Experimental model to induce obesity in rats. Acta Cir Bras, 21(6):425-29

Wang S, Wang G, Barton BE, Murphy TF, Huang HF. (2005) Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat as associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling. J Androl, 26:592–600.

Ward W. y Coffey D. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod, 44: 569-574

WHO 2017' (2017). In WHO, Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. Journal Nutrition, 133: 1081–1087.

William F. Ganong (2002) *Fisiología Médica*. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V., 3:322

Yang AJ, Cui H, Cui Y, Ye HC, Li Y. (2005) Effects on development of the testicle in diet- induced obesity rats. Wei Sheng Yan Jiu, 34:477–9.

Zhang J and Scarpace PJ (2009) The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo: Soluble receptor neutralizes leptin action in vivo. British Journal of Pharmacology, 158:475–482

Zini, A. and Schlegel, P.N. (1997) Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *Int J Androl*, 20:86-91.

Zorgniotti AW, MacLeod J.(1973) Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril*, 24: 854-863.

APÉNDICE

Sistema de reacción para cuantificación de proteínas

3.

<i>TUBO</i>	<i>Albumina 555mg /ml</i> <i>(ul)</i>	<i>NaCl 0.09 %</i> <i>(ul)</i>	<i>Bradford (ul)</i>	<i>Abs 595 nm</i>
1	0	800	200	
2	2	798	200	
3	4	796	200	
4	6	794	200	
5	8	792	200	
6	10	790	200	

Tabla 1. Sistema de reacción para determinación de proteínas por el método de Bradford, para la realización de la curva estándar de proteínas.

<i>TUBO</i>	<i>SOBRENADANTE</i> <i>(ul)</i>	<i>NaCl 0.09%</i> <i>(ul)</i>	<i>BRADFORD</i> <i>(ul)</i>	<i>Abs 595 nm</i>
1	2	798	200	
2	2	798	200	
3	2	798	200	
4	2	798	200	

Tabla 2. Sistema de reacción para la determinación de proteínas por el método de Bradford, para las muestras de tejido de testículo y epidídimo de rata Wistar.

