



UNIDAD IZTAPALAPA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

TESIS

“EFECTO DE LA OBESIDAD EN LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMARIA DE RATA WISTAR”

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A

M.B.R.A. Lorena Ruiz Valderrama

2153804438

ORCID 0000-0002-3316-4533

ratachobbis28@gmail.com

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Edith Arenas Ríos

ASESORES

Dr. Humberto González Márquez

Dra. Isabel Arrieta Cruz

JURADO

Presidente Dra. Edith Arenas Ríos

Secretario Dr. Humberto González Márquez

Vocal Dra. Isabel Arrieta Cruz

Vocal Dra. Angelica Trujillo Hernández

Vocal Dra. Maria del Consuelo Lomas Soria

Iztapalapa, Ciudad de México a 12 de abril del 2024

Índice General

1. Resumen.....	12
2. Abstract.....	14
3. Lista de tablas y figuras.....	16
4. Lista de abreviaturas.....	19
5. Introducción.....	21
6. Marco Teórico	24
6.1. Obesidad e Infertilidad Masculina	24
6.2. Maduración Espermática Epididimaria.....	26
6.3. Cambios en la superficie celular del espermatozoide y la movilidad.....	30
6.4. Glicoconjugados en el espermatozoide	31
6.5. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.....	33
6.6. Especies reactivas de oxígeno en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal.....	34
7. Justificación.....	35
8. Pregunta de Investigación.....	36
9. Hipótesis	36
10. Objetivo General	36
11. Objetivos Específicos.....	37
12. Metodología	37
12.1. Caracterización del modelo de obesidad.....	37
12.2. Prueba de fertilidad	39
12.3. Obtención de órganos y extracción de espermatozoides de rata.....	40
12.4. Determinación de carbohidratos mediante lectinas en espermatozoides	42

12.5.	Determinación de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides	42
12.6.	Evaluación de especies reactivas de oxígeno presentes en espermatozoides	43
12.7.	Actividad enzimática antioxidante.....	44
12.8.	Análisis de resultados.....	45
13.	Resultados	46
13.1.	Inducción de obesidad y prueba de fertilidad	46
13.2.	Depósitos de grasa gonadal.....	48
13.3.	Parámetro macrométrico de testículo.....	50
13.4.	Análisis de los parámetros metabólicos	50
13.5.	Niveles séricos de testosterona.....	51
13.6.	Análisis de la calidad de los espermatozoides	52
13.7.	Determinación de la distribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide	54
13.8.	Análisis de la composición de carbohidratos en espermatozoides.....	58
13.9.	Actividad específica de las enzimas SOD, CAT y GPX en testículo y epidídimo	59
13.10.	Proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides.....	60
14.	Discusión.....	61
15.	Conclusión	71
16.	Referencias bibliográficas	73
17.	Productos derivados del trabajo de tesis doctoral.....	81
17.1.	Artículo de investigación.....	81

17.2. Capítulo de libro	94
18. Anexo.....	98

RECONOCIMIENTOS

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

JURADO

El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Lerma, Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

Lorena Ruiz Valderrama.

Fecha de aprobación de la tesis: **12 de abril del 2024**

JURADO:



Presidenta: **Dra. Edith Arenas**

Secretario: **Dr. Humberto González Márquez**



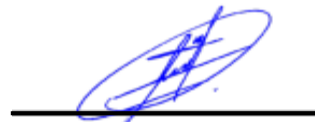
Vocal 1: **Dra. Isabel Arrieta Cruz**



Vocal 2: **Dra. María del Consuelo Lomas Soria**



Vocal 3: **Dra. Angélica Trujillo Hernández**



DEDICATORIAS

A mi padre **HECTOR RUIZ MARTINEZ**

AGRADECIMIENTOS

A mi madre **Ma. de la Luz** por ser mi motor eterno, por todo su apoyo durante los momentos más complicados, por su ejemplo de fortaleza y ser mi motivo para permanecer en el camino con convicción ¡Gracias, gracias, gracias!

A mi padre **Héctor** por ser una inspiración y porque gracias a ti descubrí que soy capaz de lograr grandes cosas, a pesar de los obstáculos más grandes que puedan existir. Te llevo en el corazón.

A mi novio **Jesús** por ser un motor especial para este cierre de ciclo profesional, gracias por los aprendizajes, por tu paciencia y por tanto amor hasta ahora.

A mi amigo **Ernesto** por el tiempo compartido, por su comprensión e incondicional apoyo hasta el final.

A mi directora **Edith Arenas Ríos** por ser la persona más humana y honesta, por sus enseñanzas académicas y de vida, por su apoyo en el momento que más lo necesitaba, por motivarme a seguir cuando sentía que ya no podría hacerlo más, por ser mi amiga incondicional.

A mi asesora **Isabel Arrieta Cruz** por su disposición a escucharme, a resolver mis dudas, y a apoyarme no solo en el ámbito académico, también en el personal, gracias por sus consejos y compartirme sus conocimientos.

A mi asesor **Humberto González Márquez** por su honestidad, por mostrarme como solucionar problemas desde la practicidad y objetividad, por todas sus enseñanzas durante todo este tiempo dedicado a la academia.

A todos los que integramos el laboratorio y grupo de investigación **Morfofisiología y Bioquímica del espermatozoide**, gracias por existir.

Agradezco especialmente a mi familia académica:

Dr. Ahiezer (Ahierzi) Rodríguez Tobón fuiste mi maestro y has permanecido como un verdadero amigo, te admiro mucho, gracias por levantarme siempre que he caído y por tus palabras de ánimo en los momentos más complicados.

Dr. Ernest (Cochis) Rodríguez Tobón que puedo decir, eres una de las personas con las que más me divierto en la vida, siempre hay un aliento y demasiadas risas, te aprecio y admiro amigo, gracias por existir.

Mtra. Maggy Retana (Pavita), una personita especial que me inspira y con la que siempre hablo de todo, una super cómplice y amiga.

Dra. Blanca López (Blanquetita), cómplice y amiga, acompañándome en las charlas más amenas, gracias por la conexión y el aprendizaje. Gracias siempre por tu tiempo y apoyo, nunca lo olvidaré.

Mtra. Landita López, agradezco tu incondicional amistad, eres una persona muy leal por eso nos entendemos, me acompañas en mis locuras, nos hemos tomado de la mano en el camino del crecimiento en todos los ámbitos.

Mtro. Daniel Uriostegui, el compañero que siempre está dispuesto a apoyarme en lo académico, las risas siempre presentes en los momentos de trabajo en el laboratorio.

Biol. Exp. Jess Hernández, mi primera alumna y compañera de aventura, te admiro por tanta fuerza y porque sales adelante cuando te lo propones, aprendí más de ti que tú de mí. En mi corazoncito siempre ratachobbi team.

Mtro. Edwin Mendoza, mi otro compañero de viaje en el ratachobbi team, orgullosa de verte crecer en todos los ámbitos. Es muy valioso para mí tu apoyo y aportación en el laboratorio.

Mtra. Ileri Fragoso, por ser una compañera de aventura académica y ser una gran compañera de trabajo, admiro tu inteligencia y compromiso.

Mtra. Jaqueline Posadas y al Dr. Joel Hernández por mantener un ambiente de respeto, agradable y ameno, por su disposición a hacer un equipo, fueron muchos días de trabajo duro, de aprendizaje, gracias por su apoyo.

A la **Mtra. Isabella Berber Aranda** y su esposo **Rodrigo Mikkel**, por compartirme su valioso tiempo, por ser unos grandes y valiosos amigos, agradezco contar con ustedes.

A la LPA **Lucy** y al futuro **Mtro. Manuel** por ser unos excelentes compañeros, por contar con ustedes en el laboratorio y en la vida, aprecio mucho su amistad.

A la **Dra. Edith Cortés Barberena**, por siempre recibirme temprano y despedirme hasta tarde del Citómetro de Flujo, por su disposición, sus interesantes charlas y su apoyo. Gracias por compartirme sus conocimientos.

A la **Dra. Marcela Arteaga Silva** por sus enseñanzas durante la Maestría, su apoyo durante el doctorado, por la disposición y valiosa aportación en el examen predoctoral, para mejorar este trabajo.

A las **Dras. Angélica Trujillo Hernández y Dra. María del Consuelo Lomas Soria** por aceptar la invitación, por su valioso tiempo y sus observaciones para mejorar este trabajo y mi formación.

1. Resumen

Introducción y Antecedentes. La obesidad está altamente asociada con la infertilidad en humanos. La producción apropiada de espermatozoides fértiles requiere de una adecuada espermatogénesis en el testículo y una maduración epididimaria apropiadas. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la obesidad en la fertilidad masculina, incluyendo la evaluación de los parámetros espermáticos, la distribución de carbohidratos y la presencia de ERO en el espermatozoide.

Metodología. Para llevar a cabo este estudio, utilizamos el modelo de rata Wistar macho adulto dividido en 3 grupos a los que se les alimentó durante 4 semanas, de la siguiente manera: grupo control (CN=dieta balanceada con 4% de grasa), el grupo sobrepeso (SOB= dieta hipercalórica 10% de grasa) y el grupo obesidad (OB= dieta hipercalórica 60% de grasa). Al término de la dieta y tratamientos, se realizó una prueba de fertilidad. Se realizó un ensayo de ELISA con suero sanguíneo para determinar la concentración de testosterona sérica, los depósitos de grasa alrededor de las gónadas y el mesenterio, así como, los parámetros macrométricos fueron pesados y calculados. El epidídimo fue extraído o removido y se seccionó en sus 3 regiones principales: cabeza (*caput*), cuerpo (*corpus*) y cola (*cauda*) para evaluar los parámetros espermáticos (viabilidad y morfología), la distribución de carbohidratos, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y la presencia de ERO en el espermatozoide. **Resultados.** Los animales con sobrepeso y obesidad inducida por una dieta media y alta en grasa despliegan alteraciones en la fertilidad y en la condición corporal. Además, presentaron niveles bajos de testosterona, disminución de la

viabilidad espermática y aumento de las anomalías morfológicas en la cabeza y pieza media del espermatozoide, por otro lado, la cantidad de ERO en el espermatozoide aumentaron. Al analizar la composición de glucoproteínas se encontró en el grupo de obesidad, que N-acetil-glucosamina y ácido siálico disminuyó en el espermatozoide en la región de *caput*, y en el grupo de sobrepeso disminuyó en la región de *corpus*; manosa disminuyó en la región de *caput* y *cauda* únicamente en el grupo de obesidad. En cuanto a la distribución de carbohidratos en la cabeza del espermatozoide se encuentra que en *caput* y *corpus* disminuye, sin embargo, en toda la membrana del espermatozoide aumentó. Finalmente, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina aumentó de *caput* a *cauda* en el espermatozoide en los grupos de sobrepeso y obesidad. **Conclusión.** Tomando en cuenta todos estos resultados se sugiere que las dietas hiperlipídicas pueden inducir sobrepeso y obesidad, alterando la maduración del espermatozoide en el epidídimo de rata Wistar, causando subfertilidad.

2. Abstract

Introduction and Background. Obesity is highly associated with infertility in humans. Appropriate production of fertile sperm requires adequate spermatogenesis in the testis and appropriate epididymal maturation. The objective of this study was to evaluate the effects of obesity on male fertility, including the evaluation of sperm parameters, carbohydrate distribution and the presence of ROS in sperm. **Methodology.** To carry out this study, we used the adult male Wistar rat model divided into 3 groups that were fed for 4 weeks, as follows: control group (CN=balanced diet with 4% fat), the overweight (SOB= hypercaloric diet 10% fat) and the obesity group (OB= hypercaloric diet 60% fat). At the end of the diet and treatments, a fertility test was performed. An ELISA test was performed with blood serum to determine serum testosterone concentration, fat deposits around the gonads and mesentery, as well as macrometric parameters were weighed and calculated. The epididymis was extracted or removed and sectioned into its 3 main regions: head (*caput*), body (*corpus*) and tail (*cauda*) to evaluate sperm parameters (viability and morphology), carbohydrate distribution, protein phosphorylation in tyrosine residues and the presence of ROS in the sperm. **Results.** The results showed that animals with overweight and obesity induced by a moderately high-fat diet display alterations in fertility and body condition. In addition, they presented low levels of testosterone, decreased sperm viability and increased morphological abnormalities in the head and middle piece of the sperm, and the amount of ROS in the sperm increased. When analyzing the composition of glycoproteins, it was found in the obesity group that N-acetyl-glucosamine and sialic acid decreased in

the sperm in the *caput* region, and in the overweight group it decreased in the *corpus* region; Mannose decreased in the *caput* and *cauda* region only in the obesity group. Regarding the distribution of carbohydrates in the head of the sperm, it is found that in the *caput* and *corpus* it decreases, however, in the entire sperm membrane it increased. Finally, protein phosphorylation on tyrosine residues increased from *caput* to *cauda* in sperm in the overweight and obese groups. **Conclusion.** Taking all these results into account, it is suggested that hyperlipidic diets can induce overweight and obesity, altering sperm maturation in the Wistar rat epididymis, causing subfertility.

3. Lista de tablas y figuras

Figura 1. Fotografías que muestran los depósitos de grasa mesentérica y periférica al testículo y epidídimo (indicados con flecha blanca), en ratas Wistar: grupo control (A1 y A2) y grupo de obesidad (B1 y B2)pág. 48

Figura 2. Microfotografía que muestra la viabilidad espermática. A) Espermatozoide muerto, en tono rosa-morado B) Espermatozoide vivo, transparente, señalados por flechas negras.....pág. 53

Figura 3. Microfotografías de campo claro, epifluorescencia y merge del patrón denominado tinción total, encontrado a través de marcaje con lectinas, en toda la membrana del espermatozoide (se observó a 100X)pág. 54

Figura 4. Microfotografías de campo claro, epifluorescencia y merge del patrón denominado cabeza, encontrados a través de marcaje con lectinas, en toda cabeza del espermatozoide (observado a 100X)pág. 55

Gráfica 1. Promedio \pm error estándar de los pesos de rata Wistar alimentadas durante 4 semanas con una dieta hipercalórica (n=6). Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$)pág. 46

Gráfica 2. Peso de la grasa escrotal en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (control) y alimento 10% (sobrepeso) y 60% (obesidad) elevado en grasa. Datos expresados como media \pm DE, $P<0.05$ (n=6) (letras diferentes indican diferencias significativas, control vs obesidad)pág. 49

Gráfica 3. Niveles séricos de testosterona en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (control), 10% (sobrepeso) y 60% (obesidad) de alimento alto en

grasa. Datos expresados como media \pm DE (letras indican diferencias significativas, $P < 0.05$, $n=6$)pág. 52

Gráfica 4. La producción de ERO en la membrana plasmática del espermatozoide en las regiones de: *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo de ratas alimentadas con una dieta balanceada (control), 10 (sobrepeso) y 60% (obesidad) de grasa. Valores expresados como media \pm DE ($n=6$). Letras muestran diferencias significativas, $P < 0.05$, control vs. sobrepeso vs. obesidad. Índice de fluorescencia= (promedio) (número de eventos)pág. 60

Gráfica 5. Actividad específica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en el testículo y epidídimo de rata Wistar alimentadas con una dieta regular (control (CN)) y dietas hiperlipídicas con 10 y 60% grasa (sobrepeso (OW) y obesidad (OB)) respectivamente. La actividad específica esta expresada en mg de proteína/min. a,b,c indican diferencias entre los grupos de estudio ($P \leq 0.05$) (CN vs OW vs OB).....pág. 61

Tabla 1. Resumen de datos clínicos y de laboratorio (parámetros seminales y concentración de hormona leptina) obtenidos de estudios en donde los varones son obesos y presentan infertilidad. Los valores indican la media \pm DE, *media (intercuartiles).....pág. 26

Tabla 2. Peso corporal e índice de Lee en animales alimentados con una dieta balanceada (control) o hiperlipídica (grupo de sobrepeso y obesidad)pág. 47

Tabla 3. Ganancia de peso de ratas Wistar (porcentaje), tomando como referencia el promedio del peso de los controles como el 100%.....pág. 47

Tabla 4. Prueba de fertilidad en ratas Wistar con sobrepeso y obesidad.....	pág. 49
Tabla 5. Parámetros metabólicos: glucosa, colesterol y triglicéridos, obtenidos a través de una determinación de química sanguínea, en animales alimentados con una dieta balanceada (control), y dietas adicionadas con 10% grasa (sobrepeso) y 60% grasa (obesidad).....	pág. 51
Tabla 6. Evaluación de la calidad espermática en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (control), 10% alta en grasa (sobrepeso) y 60% alta en grasa (obesidad).....	pág. 53
Tabla 7. Distribución de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en espermatozoides epididimarios de la región de <i>caput</i> , <i>corpus</i> y <i>cauda</i> de ratas Wistar alimentadas con dietas balanceada (control) e hipercalóricas (sobrepeso y obesidad)	pág. 57
Tabla 8. Distribución de Manosa en espermatozoides epididimarios de la región de <i>caput</i> , <i>corpus</i> y <i>cauda</i> de ratas Wistar alimentadas con dietas balanceada (control) e hipercalóricas (sobrepeso y obesidad)	pág. 57
Tabla 9. Índice de fluorescencia (media \pm DE, n=6)	pág. 59
Tabla 10. Porcentaje de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en espermatozoides de rata Wistar alimentadas con unas dietas balanceada (control) e hipercalóricas (sobrepeso y obesidad) de grasa (media \pm DE, n=3)	pág. 62

4. Lista de abreviaturas

ADN Ácido desoxiribonucleico

ANOVA Análisis de Varianza

BSA Albumina sérica bovina

CAT catalasa

CTC Clortetraciclina

ConA Aglutinina de *canavalia ensiformis*

DCF Diacetato de Diclorofluoresceína

DE Desviación Estándar

E₂ Estradiol

ELISA Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ERO Especies Reactivas de Oxígeno

ES Error Estándar

FITC Isotiocianato de Fluoresceína

FSH Hormona Folículo Estimulante

GPX glutatión peroxidasa

HHT Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

IF Intensidad de Fluorescencia

IgG Anticuerpo Inmunoglobulina G

IGS Índice Gonadosomático

IMC Índice de Masa Corporal

INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía

LH Hormona Luteinizante

NIHES Instituto nacional de Ciencias Ambientales y de la Salud de los Estados Unidos

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS Buffer de fosfatos

Py20 Anticuerpo anti fosfotirosina

RIPA Buffer de lisis y extracción de
proteínas

SDS Dodecilsulfato Sódico

SHBG Globulina de unión a
hormonas sexuales

SOD superóxido dismutasa

T testosterona

UEA Aglutinina de *Ulex europeaus*

WGA Aglutinina de *Triticum vulgare*

5. Introducción

El sobrepeso y la obesidad es una condición que resulta de un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y calorías gastadas, lo que produce una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS 2015).

Los espermatozoides al pasar por el epidídimo maduran, involucrando cambios estructurales, como la pérdida del remanente citoplasmático (gota citoplasmática), remodelación del acrosoma y disminución del diámetro de las mitocondrias (Awano *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1999; Legare *et al.*, 2001; Vernet *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2007) y en sus componentes bioquímicos, como modificación postraduccional de las proteínas como: a) la fosforilación de residuos de tirosina específicos (Lewis y Aitken 2001, Ecroyd *et al.*, 2004, Naz y Rajesh, 2004; Fabrega *et al.*, 2011) y b) la glicosilación. Estos cambios se relacionan con la adquisición de la habilidad de capacitarse y de llevar a cabo la reacción acrosomal y, finalmente, la capacidad fertilizante.

En el mundo se han producido cambios en la composición de los alimentos, un incremento en el consumo de alimentos altamente palatables, pobres en macro y micronutrientes, con altos niveles de glucosa y grasas saturadas que, en combinación con el sedentarismo, provocan una acumulación de energía en el organismo. El exceso de energía se almacena en los adipocitos, los cuales, aumentan en número y tamaño (Erdemir *et al.*, 2012). Este desequilibrio energético, que define a la obesidad, es el resultado de la combinación de factores fisiológicos,

psicológicos, metabólicos, genéticos, socioeconómicos, culturales y emocionales. El incremento en el peso corporal es diferente para cada persona y grupo social. Según la ENSANUT (2012), México es uno de los países con mayor número de personas con sobrepeso y obesidad a nivel mundial. La OMS indicó que aproximadamente 1.6 billones de adultos presentaron sobrepeso y 400 millones obesidad en 2005, como resultado de una vida sedentaria y una dieta desfavorable. En México, cada año fallecen alrededor de 4.3 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso y la obesidad (Jia *et al.*, 2012). La secretaria de Salud de la Ciudad de México reconoce que el sobrepeso y la obesidad son el problema de salud pública principal, porque es el país con el primer lugar mundial en niños con obesidad y sobrepeso, y el segundo lugar en adultos. De hecho, México gasta el 7% del presupuesto destinado a la salud para atender este problema, tan solo debajo de Estados Unidos que destina el 9% (Jia *et al.*, 2012).

La obesidad como causa de infertilidad masculina se ha demostrado en muchos estudios provocando no solo disfunción eréctil y pérdida de la libido, sino que, además, reduce la calidad seminal. Algunos de los mecanismos propuestos para explicar el efecto de la obesidad sobre la fertilidad masculina incluyen: 1) la alteración de los niveles hormonales, incrementando la secreción de hormonas derivadas del tejido adiposo y disminuyendo la concentración de andrógenos y 2) el aumento de la temperatura escrotal; ambos mecanismos pueden repercutir en la maduración espermática epididimaria (Bedford, 1973).

Estadísticas del INEGI indican que, en el año 2005 en México, 20.52 millones de mujeres mayores de 20 años (70%) presentan sobrepeso u obesidad, 16.96 millones de hombres mayores de 20 años (66%) y 5.54 millones de niños en edad escolar (26%) también la presentan.

Las personas con sobrepeso y obesidad presentan un estado inflamatorio crónico de bajo grado, con un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios, como consecuencia del incremento en el tejido adiposo, que es estimulado por señales exógenas y/o endógenas. Algunas adipocinas, como leptina y adiponectina, que incrementan durante el estado de inflamación, tienen un efecto negativo en la fertilidad al reducir la concentración de testosterona, alterando la producción y maduración espermática, lo que causa los problemas de infertilidad (Jeyakumar et al., 2011).

Por otro lado, los espermatozoides al pasar por el epidídimo maduran, involucrando cambios estructurales, como la pérdida del remanente citoplasmático (gota citoplasmática), remodelación del acrosoma y disminución del diámetro de las mitocondrias (Awano *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1999; Legare *et al.*, 2001; Vernet et al., 2001; Sullivan et al., 2007) y en sus componentes bioquímicos, como modificación postraduccional de las proteínas como: a) fosforilación de residuos de tirosina específicos (Lewis y Aitken 2001, Ecroyd *et al.*, 2004, Naz y Rajesh, 2004; Fabrega *et al.*, 2011) y b) la glicosilación. Estos cambios se relacionan con la adquisición de la habilidad de capacitarse y de llevar a cabo la reacción acrosomal y finalmente, la capacidad fertilizante.

6. Marco Teórico

En los últimos 10 años, la obesidad ha tomado forma de una epidemia a nivel mundial, lo que ha provocado gran atención para establecer sus causas, efectos y tratamientos (Cabler *et al.* 2010). De manera paralela, se ha correlacionado el incremento global de obesidad con la disminución de la fertilidad masculina (Swan *et al.* 2000).

Sallmén *et al.* (2006), observaron que los hombres que presentan un IMC elevado, la capacidad fertilizante disminuye, esto, según lo reportado por el NIEHS (2006), y mencionan que la calidad del semen disminuyó sustancialmente. Además, se ha reportado un incremento significativo de parejas infértiles en las que el varón es obeso (Magnusdottir *et al.* 2005).

6.1. Obesidad e Infertilidad Masculina

La obesidad, particularmente el fenotipo visceral abdominal, está asociada con una producción anormal de estrógenos y el sistema de enzima aromatasa se incrementa. Cabler *et al.* (2010) realizaron una revisión amplia en la que se confirma la relación de la obesidad con la infertilidad masculina, encontrando una correlación entre el IMC y los parámetros espermáticos y seminales, particularmente en: concentración y movilidad espermática baja, morfología anormal. Otras implicaciones negativas en el espermatozoide son: una baja integridad de la cromatina, fragmentación del ADN, aumento de la apoptosis y cambios epigenéticos que pueda transferirse a la progenie (Leisegang *et al.*, 2020).

Por otro lado, Martini *et al.* (2010) encuentran una asociación negativa entre el IMC y la movilidad total espermática y la movilidad rápida, hombres obesos una

movilidad total de 47% y 36% de movilidad rápida, con respecto a hombres con peso normal 51% y 40% y, siendo esta una característica adquirida durante la maduración espermática epididimaria, pudiera haber un efecto deletéreo en la función del epidídimo. También, Hammoud *et al.* (2006) concluyen que existe una incidencia de movilidad progresiva baja que va de la mano con un aumento del IMC.

En la rata Wistar (Reame *et al.*, 2014) se reportó que, al estar en un estado obesogénico, se produce una disminución en la producción diaria de espermatozoides, pero que el tiempo de tránsito de los espermatozoides por el epidídimo no se alteró; sin embargo, las reservas tan bajas que se encontraron fueron resultado de una baja producción diaria de espermatozoides.

Incluso Ameratunga *et al.*, 2023 mencionan algunas de las controversias que se deben a la compleja patofisiología y la interacción entre las gonadotropinas y los órganos blanco, los cambios genéticos, epigenéticos y el estrés oxidante en la fertilidad masculina.

Mucha de la información referida en los antecedentes se relaciona con un posible efecto de la obesidad y el sobrepeso en el proceso de maduración espermática epididimaria, pero hasta el momento, no se han hecho estudios de la bioquímica de proteínas, ni de la presencia de un ambiente oxidante que determinen cuál es el mecanismo por el que el proceso de maduración espermática epididimaria se afecta negativamente por causa del sobrepeso y obesidad.

Muchos estudios han investigado el impacto de la obesidad masculina en los parámetros espermáticos tradicionales propuestos por la OMS como variables a

evaluar para determinar la fertilidad masculina, estos son la concentración, la movilidad y las anomalías en la morfología espermática. Los datos obtenidos por varios autores se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de datos clínicos y de laboratorio (parámetros seminales y concentración de hormona leptina) obtenidos de estudios en donde los varones son obesos y presentan infertilidad. Los valores indican la media \pm DE, *media (intercuantiles).

Variable seminal	Peso Normal	Obesidad	Autores
Volumen seminal (ml)	3.2 \pm 1.3	2.8 \pm 1.2	Fariello et al., 2012
	3.5 \pm 1.8	3.2 \pm 1.7	Shayeb et al., 2011
Movilidad (%)	55 (25-68)*	49 (30-70)*	Chavarro <i>et al.</i> , 2010
	57.50 \pm 1.41	13.25 \pm 0.79	Hofny et al., 2009
	40.2 \pm 13	48.8 \pm 14.7	Fariello et al., 2012
Concentración (x10⁶ espermatozoides/ml)	77 (23-148)*	76 (35-155)*	Chavarro <i>et al.</i> , 2010
	211.1 \pm 30.2	191.7 \pm 26.4	La Vignera <i>et al.</i> , 2012
	-	12.97 \pm 1.55	Roth et al., 2008
	80.5 \pm 70.05	48.3 \pm 55.	Fariello et al., 2012
Anormalidades (%)	7 (5-10)*	6 (3-9)*	Chavarro <i>et al.</i> , 2010
	21.43 \pm 1.46	35.50 \pm 2.06	Hofny et al., 2009
Espermatozoides normales (%)	26.2 \pm 4.4	11.0 \pm 2.8	La Vignera <i>et al.</i> , 2012
	8.6 \pm 4.2	8.3 \pm 3.7	Fariello et al., 2012
	7.4 \pm 5.0	7.1 \pm 4.6	Jensen et al., 2004
	9.0 (3.0-20.0)*	6.0(3.0-14.0)*	Shayeb et al., 2011
Movilidad Progresiva (%), a+b	48.8 \pm 4.4	23.2 \pm 6.0	La Vignera <i>et al.</i> , 2012
Leptina sérica (ng/ml)	7.93 \pm 0.05	12.36 \pm 0.17	Hofny et al., 2009

El motivo de este estudio, como es de esperarse, se elaboró debido a que los reportes de los posibles mecanismos moleculares y bioquímicos involucrados en la infertilidad masculina causada por la obesidad son escasos.

6.2. Maduración Espermática Epididimaria

En la actualidad cada vez son más los trabajos que centran su atención en la función de un órgano reproductivo, el epidídimo. Es bien sabido, que el espermatozoide testicular es inmaduro, y que solo va a adquirir el potencial fertilizante: la movilidad

y habilidad para fertilizar al ovocito durante el tránsito por el epidídimo. Este importante órgano reproductivo, es altamente estructurado, consta de un tubo alargado que varía su longitud dependiendo de la especie (1 a 80 metros) y comienza de los conductos eferentes, como puente de comunicación entre estos órganos; y termina en el conducto deferente.

El epidídimo se divide experimentalmente en tres regiones anatómicas principales: cabeza (*caput*), cuerpo (*corpus*) y cola (*cauda*), pero puede dividirse de otras maneras: segmento inicial, una zona intermedia entre el segmento inicial y la cabeza, cuerpo y cola; o una serie de lóbulos separados por tejido conectivo mismos que variarían en número dependiendo de la especie (Turner *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006).

Tipos celulares del epidídimo

El epidídimo también se compone por epitelio, que a su vez está constituido por varios tipos celulares:

- a) células principales. - encargadas de la secreción y endocitosis, y se caracterizan por sus núcleos alineados además de que contienen uniones estrechas, formando la barrera hemato-epididimaria lo cual permite conservar el microambiente luminal para el mantenimiento de los espermatozoides (Robaire *et al.*, 2006).
- b) células apicales. - se caracterizan por tener núcleos esféricos y nunca tocar la membrana basal, además se localizan en el segmento inicial y región intermedia.
- c) células estrechas. - se localizan en el segmento inicial y región intermedia,

son células que contienen vesículas en su ápice involucradas en la endocitosis.

- d) células claras. - son grandes y se encuentran presentes en la región cefálica, cuerpo y cola, se caracterizan por numerosos canales y contener su núcleo en la región basal, están involucradas en la regulación de la acidificación del fluido epididimario.
- e) células basales. - se adhieren a la base del túbulo y no tienen contacto con la luz se sabe que no actúan como células madre para reponer las células principales (Robaire *et al.*, 2006).

El espermatozoide al transitar por este órgano tan estructurado y organizado experimenta una gran variedad de cambios dentro de su ambiente luminal. Estos cambios incluyen la liberación y absorción de fluidos, iones, antioxidantes y exosomas. Los espermatozoides entran impulsados por el fluido testicular y se ha reportado que posiblemente también a causa del batido flagelar de las células ciliadas en los conductos eferentes, sin embargo, al llegar al segmento inicial el epidídimo es quien se encarga de ese transporte. En el epidídimo se llevarán a cabo las siguientes funciones: transporte de los espermatozoides, maduración, protección, almacenamiento, desarrollo de la movilidad espermática y de la capacidad fertilizante (Robaire y Hamzeh, 2011; Dacheux y Dacheux, 2013). El rango de tiempo que le toma al espermatozoide transitar por el epidídimo varía entre 1-21 días dependiendo de la especie (Rowley *et al.*, 1970). A partir del uso de técnicas de biología molecular fue posible saber que el espermatozoide debía ponerse en contacto con algunas proteínas dentro del epidídimo para poder tener el poder de modificar las interacciones del espermatozoide con el ovocito

(Rochwerger and Cuasnicú 1992). La maduración de los espermatozoides involucra una serie de cambios en el espermatozoide que incluyen la modificación del contenido de proteínas, la reestructuración de glicoproteínas o glicolípidos y la fosforilación de proteínas espermáticas en residuos de tirosina; todo esto, para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fertilizar al óvulo. Otros cambios importantes que se han descrito son:

Morfología celular. - la transformación en una célula mucho más resistente depende del aumento de las uniones disulfuro intramoleculares (Bedford *et al.*, 1973). Un aumento en la compactación del contenido nuclear explica la disminución del tamaño de la cabeza del espermatozoide.

Gota citoplasmática. - Una diferencia importante se debe distinguir en este tema, la gota citoplasmática en células normales y el citoplasma residual en células anormales (Cooper *et al.*, 2004). La migración de la gota citoplasmática de la región del cuello hacia la pieza media refleja la baja concentración espermática dentro del lumen del epidídimo y estrés térmico por ropa ajustada o criptorquidia (humanos).

Proteínas epididimarias involucradas en la maduración espermática. - a través de técnicas de biología molecular se revelaron varias proteínas con diferentes funciones, entre ellas, CD52 la cual puede estar involucrada en el almacenamiento espermático; SOB3 involucrada con la zona de unión del espermatozoide; Eppin, proteína inhibidora y microbiciada, SOB1, ARP y fibronectina que están involucradas en la fusión con el ovocito, todas estas anteriores localizadas en el cuerpo del epidídimo (Cooper, 1998). La expresión de serpina (involucrada en la zona de unión

y fusión con el ovocito) y de tripsinógeno (precursor de una enzima proteolítica involucrada con la zona de unión) (Yeung *et al.*, 2006).

6.3. Cambios en la superficie celular del espermatozoide y la movilidad

Durante el proceso de maduración ha sido documentada, de tal forma, que esto se relaciona con la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide y es imprescindible para los procesos posteriores al ser depositado el espermatozoide en el tracto reproductor femenino (Tulsiani., 2006; Chandra *et al.*, 2008; Toyonaga, Kaihara y Tsuttsui, 2011). Los espermatozoides requieren de movimiento para emprender su tránsito por el aparato reproductor femenino hasta el sitio de fertilización. En los mamíferos como el humano y la rata, la habilidad de movimiento progresivo la adquieren durante el paso por el epidídimo, sin embargo, la movilidad se inicia solo cuando el espermatozoide esta en contacto con el plasma seminal. Los factores que le permiten llegar al sitio de unión y penetrar la zona pelúcida del ovocito, a través de una movilidad hiperactivada, son otorgados en el tracto reproductor femenino (Gagnong and Lamirande, 2006).

No obstante, la movilidad, no es el único factor para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida del ovocito, dentro de estos cambios, también se encuentran la distribución de glicoconjugados en la membrana del espermatozoide, para esto se han desarrollado varias técnicas, dentro de ellas, el uso de lectinas, que es un grupo de proteínas de origen no inmune, si no vegetal o animal, que comparten en común la propiedad de enlazarse de manera específica y reversible a carbohidratos ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas.

6.4. Glicoconjugados en el espermatozoide

Las lectinas vegetales han sido utilizadas como herramientas en varias disciplinas con propósitos analíticos (Hernández-Cruz *et al.*, 2005) Estas pueden clasificarse gracias a su actividad biológica y usadas por sus propiedades mitogénicas. Actualmente se han estudiado a detalle 9 lectinas, entre las que destacan: PHA, ConA, PSA y PWM; lectinas que reconocen N-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetilglucosamina y lectinas que reconocen a los O-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetilgalactosamina (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Como se ha mencionado dentro de los propósitos analíticos se encuentra, la capacidad de unirse específicamente a los residuos de carbohidratos de los glicoconjugados por su afinidad a los azúcares (Micucci y Camps., 1987).

Algunos estudios han reportado los cambios que el espermatozoide experimenta en la superficie de la membrana, reportando en:

Canavalia ensiformis aglutinina (Concanavalina A, Con A), que se une a residuos de manosa, un carbohidrato que confiere amplia flexibilidad en la membrana, que es de vital importancia para la movilidad (Aliabadi *et al.*, 2013).

Triticum vulgare aglutinina (WGA), esta detecta residuos de n-acetilglucosamina y/o ácido siálico, ambos carbohidratos en los espermatozoides. N-acetilglucosamina requiere estar presente por permitir la interacción entre gametos e incluso inducir la reacción acrosomal de manera similar a como lo hace la zona pelúcida y estar correlacionada con la fertilización in vitro (Cardona-Maya y Cadavid., 2005; Tulsiani

y Abou-Haila., 2011). El ácido siálico se ha relacionado con un incremento en la carga negativa total de la superficie de la membrana durante el tránsito epididimal. Incluso en la rata se ha descrito que es en la cabeza del espermatozoide donde se encuentran los valores más altos de unión entre el ácido siálico y la membrana plasmática, en comparación al caso del flagelo, donde los valores de la unión de mismo carbohidrato a esta región del espermatozoide, son más bajos, y conforme los espermatozoides son transportados hacia la región distal del epidídimo, los valores en el flagelo continúan disminuyendo, por lo que es posible la unión del ácido siálico a la membrana puede ser un indicador relevante y estar relacionada a la maduración espermática en la rata (Hall y Kilian, 1987) y con la unión del espermatozoide al ovocito.

Ulex Europeus aglutinina (UEA) esta reconoce los residuos a fucosa, se relaciona con la unión especie-específica del espermatozoide con el ovocito. Particularmente, mediante la unión de este carbohidrato a proteínas de la zona pelúcida (Tulsiani y Abou-Haila, 2011). Otra función interesante, en la que se involucra fucosa es la formación de reservas de espermatozoides en el oviducto, cuando esta se une a proteínas del epitelio (Ignotz *et al.*, 2001). Cabe destacar que Hal y Kilian en 1987, reportan que la presencia de fucosa en la membrana del espermatozoide de rata, que transitan por el epidídimo, disminuye 3 veces en la región de la *cauda* al hacer una comparación con la región de *caput*.

El contenido de glicoconjugados en los espermatozoides se considera un buen indicador de maduración pues el cambio en la distribución es un proceso que es requerido durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo (Tajiri *et al.*, 2012).

6.5. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina

Otra de las modificaciones postraduccionales que ocurren en la maduración espermática es la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas. Una o varias proteínas podrían o no podrían ejercer su función si no experimentaran estos cambios. En el espermatozoide es un cambio intracelular importante para la adquisición de la capacidad fertilizante (Filtz *et al.*, 2014) debido a que es considerada como la base molecular esencial para el desarrollo coordinado del movimiento progresivo por parte del flagelo y con la posterior hiperactivación en la capacitación espermática y reacción acrosomal (Moseley *et al.*, 2005; Mor *et al.*, 2007) en el tracto reproductor de la hembra.

Se ha encontrado que el estado de fosforilación de proteínas está regulado por una vía dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y por la actividad enzimática de dos tipos de proteínas a) cinasas y b) fosfatasas, siendo las primeras las que agregan un grupo fosfato y las segundas las que los remueven (Hernández-Rodríguez, 2019).

El espermatozoide es incapaz de sintetizar nuevas proteínas, se puede argumentar que dependen de estas modificaciones y que se asocia con el proceso de maduración espermática epididimaria. De manera que como switch en on/off la fosforilación y defosforilación ocurren en las proteínas en el flagelo para la movilidad del espermatozoide y en la capacidad para fertilizar al ovocito. Se han localizado proteínas fosforiladas en el dominio acrosomal del espermatozoide y de igual forma a nivel de la pieza media (Rodríguez-Tobón, 2016). También, en rata Wistar se analizaron los patrones de fosforilación que tienen en la región de cabeza y cola del

epidídimo por inmunolocalización arrojando que predomina está en la parte del flagelo (Lewis y Aitken, 2001).

6.6. Especies reactivas de oxígeno en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal

El proceso de maduración epididimaria es una etapa que igualmente se lleva a cabo por diversos cambios en el metabolismo y consumo de energía que generan una gran cantidad de ERO, las cuales, se producen durante los procesos fisiológicos que involucran el consumo de oxígeno. Sin embargo, la generación excesiva de ellas se correlaciona con problemas en la funcionalidad del espermatozoide (Arenas *et al.*, 2015). Además, de participar las ERO en la maduración epididimaria participan en un proceso posterior que ocurre en el tracto reproductor femenino, la capacitación de los espermatozoides, en donde experimentan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, en donde se describe, un cambio en el flujo iónico que modula el pH intracelular y potencial de membrana, regulando la fisiología de los espermatozoides. Los cambios en las concentraciones intracelulares de calcio son regulados por la actividad de los canales iónicos que forman un poro en la membrana plasmática a través del cual atraviesan los iones, ocasionando cambios en la movilidad flagelar de los espermatozoides (Mendoza- Sánchez *et al.*, 2020). Un aspecto importante en la capacitación espermática que se ha reconocido en las últimas décadas es la existencia y función de las flipasas, flopasas y escramblasas en diversos tipos celulares. Estas enzimas participan con cada glicerofosfolípido de la membrana plasmática, uno de ellos es la fosfatidilserina y ha sido identificado en las células eucariotas y que a pesar de no ser muy abundante en la membrana plasmática, tiene una gran importancia por ser una molécula de señalización dentro

de los mecanismos de muerte celular programada “apoptosis” en las células somáticas. Sin embargo, en el espermatozoide no se cumplen todos los criterios que conlleva el proceso de apoptosis, pero la presencia de este fosfolípido se ha estudiado como una posible señal de eliminación celular y también como sitio de unión en eventos de fertilización (Sámano-Barbosa *et al.*, 2020).

7. Justificación

En los últimos 20 años la prevalencia de la infertilidad masculina ha aumentado, y uno de los factores involucrados es la condición corporal, el sobrepeso y la obesidad en nuestro país ocupa los primeros lugares dentro de los problemas de salud pública y desde 1975 se ha triplicado en el mundo.

En la fertilidad femenina los efectos del sobrepeso y la obesidad son mucho más evidentes por alteraciones del ciclo menstrual, presentan síndrome de ovario poliquístico e incluso favorecen a conducir abortos espontáneos y a un incremento del riesgo de defectos de nacimiento, por lo que han sido extensamente estudiados. Sin embargo, las consecuencias negativas de estas condiciones en la fertilidad del hombre han sido menos objeto de estudio.

Durante los últimos 10 años se ha reportado por diferentes clínicas de reproducción asistida en México, que el factor masculino representa el 30% de las causas de infertilidad y en donde contribuyen si se combinan con otras patologías. Las causas más conocidas de infertilidad masculina son: la criptorquidia, varicocele, torsión o trauma testicular, infección urogenital e hipogonadismo hipogonadotrópico.

La obesidad, particularmente el fenotipo de obesidad visceral abdominal se asocia con patologías y anormalidades metabólicas, entre las que se encuentra la infertilidad.

Por tal motivo, el estudio se elaboró debido a que los reportes son escasos, y al generar un modelo en rata que asemeje sobrepeso y obesidad a corto plazo, y el efecto que tiene en diferentes aspectos de la maduración epididimaria en el espermatozoide es de vital importancia para conocer los mecanismos moleculares y bioquímicos que pueden verse afectados y que expliquen el funcionamiento no óptimo del espermatozoide, causando infertilidad.

8. Pregunta de Investigación

¿Cómo afecta la obesidad a la maduración espermática epididimaria?

9. Hipótesis

Al administrar una dieta hipercalórica en el modelo animal de rata Wistar se verá afectada negativamente a la maduración espermática epididimaria, al disminuir la concentración de testosterona, alterar la distribución de glicoproteínas y glicolípidos en la membrana, fosforilación o desfosforilación de proteínas y aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno evitando así la funcionalidad óptima del espermatozoide.

10. Objetivo General

Evaluar los parámetros bioquímicos, celulares y moleculares de la maduración espermática epididimaria en un modelo de rata Wistar obesa.

11. Objetivos Específicos

1. Caracterizar el modelo de obesidad en ratas Wistar usando una dieta hipercalórica.
2. Determinar el efecto de la obesidad en la fertilidad masculina, comprobando el número y sexo de las crías.
3. Determinar si la obesidad afecta los parámetros espermáticos, elaborando un análisis espermático a través de la viabilidad, morfología y concentración.
4. Evaluar si la obesidad disminuye la concentración de testosterona en sangre.
5. Establecer si la obesidad altera la distribución de las glicoproteínas y glicolípidos de manosa, n-acetilglucosamina y/o ácido siálico y fucosa en la membrana del espermatozoide de rata Wistar obesa y control.
6. Determinar el efecto de la obesidad en las proteínas espermáticas y en la fosforilación en residuos de tirosina de ratas Wistar.
7. Determinar si la obesidad provoca un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en espermatozoides.
8. Determinar si la obesidad genera un aumento en la actividad enzimática de SOD, CAT y GPX en testículo y epidídimo.

12. Metodología

12.1. *Caracterización del modelo de obesidad*

Diseño experimental: Las ratas de la cepa Wistar machos de 3 meses de edad se dividieron en dos grupos, de la siguiente manera:

Grupo 1 (CN): 6 ratas macho Wistar. Dieta: 22 g de Alimento Purina rat Chow 5001 (3% de grasa) y agua (n=10).

Grupo 2 (SOB): 6 ratas macho Wistar (para asegurar un número de muestra con obesidad, n=20). Dieta: Que con la finalidad de asemejar los hábitos dietéticos inadecuados como el alto consumo de grasa que favorecen el sobrepeso, recibirán alimento rico en grasas, marca Test Diet 10% (Energy F/fat PD Yellow) (Molinar Toribio 2015).

Grupo 3 (OB): 6 ratas macho Wistar (para asegurar un número de muestra con obesidad, n=20). Dieta: Que con la finalidad de asemejar los hábitos dietéticos inadecuados como el alto consumo de grasa que favorecen la obesidad, recibirán, alimento rico en grasas, marca Test Diet, 60% (Energy F/fat PD y PD Blue) (Molinar Toribio 2015).

Las ratas de la cepa Wistar se obtuvieron del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El proyecto fue aceptado por el Comité de Ética Animal de esta Universidad, los animales serán manejados y cuidados de acuerdo con la Guía de Cuidados y Usos de Animales Experimentales y a la NOM.062.ZOO 1999. La manipulación animal apropiada se realizó de acuerdo con las especificaciones de ética, ciencia, comunicación e investigación por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAMI (dictamen: 1851) y las guías por La Organización estipulado en el Código de Salud Animal Terrestre de Salud Animal, capítulo 7.8. Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua, y se mantuvieron en el bioterio de la Unidad Iztapalapa de la UAM a 24°C en un ciclo de iluminación de 12 de horas de luz y 12 de oscuridad invertido.

Los machos se mantuvieron en cajas individuales. El peso corporal de los individuos se verificó diariamente, al igual que el consumo, durante el régimen de dieta,

aproximado de cuatro semanas. Las variables biométricas que se tomaron en cuenta para la caracterización de la obesidad al cumplirse el régimen de dieta fueron la medida naso-anal (mm) y el peso corporal (g). A través, de estas medidas biométricas, se determinó el índice de masa corporal o índice de Lee para ratas Wistar (Bernardis y Patterson, 1968), el que se calcula, obteniendo, la raíz cuadrada del peso corporal entre la medida naso-anal X 10.

12.2. Prueba de fertilidad

Para determinar si la obesidad afecta la fertilidad masculina. Las ratas hembra de la cepa Wistar estuvieron alojadas en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas. Se pusieron a copular los siguientes grupos:

Hembras control con machos control (n=3 [3♀+ 3♂])

Hembras control con machos sobrepeso (n=3 [3♀+ 3♂])

Hembras control con machos obesos (n=3 [3♀+3♂])

Se puso a una hembra con un macho sexualmente experto de forma natural, para esto las hembras utilizadas fueron previamente cicladas. Después de una evaluación de conducta sexual, con duración de 30 minutos, se dejó a la hembra ciclante y sexualmente activa con su macho en la misma caja durante 12 horas consecutivas. Se determinó la fase del ciclo estral en la cual se encontraban las hembras, a través, del análisis del tipo de células presentes y su abundancia en un exudado vaginal realizado con solución salina. Este protocolo se realizó una vez al día con el fin de minimizar el estrés y otros potenciales efectos de la manipulación. Una vez cumplidas las 12 horas y comprobada la presencia de tapón vaginal se procedió la extracción de la hembra a una caja individual y ese día se consideró

como día cero de gestación esperando hasta el día del parto para contar el número y sexo de las crías de cada camada.

12.3. Obtención de órganos y extracción de espermatozoides de rata

En cada experimento que se realizó, se seleccionaron tres ratas macho de cada grupo, los que fueron transportados vivos al laboratorio. Después de la inducción de obesidad, los animales se eutanizaron mediante anestesia y decapitación. Se determinó la glucemia al momento de la decapitación, mediante el uso de tiras y el monitor AccuCheck active (Diagnosticos Roche kit). Posterior a esto, las muestras de sangre se colectaron en tubos vacutainer de tapón amarillo con gel separador, y se centrifugaron a 1500x g por 12 minutos, y almacenando el plasma a -20°C para el análisis posterior de testosterona, a través de radioinmunoensayo (TKTT-1, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Los Angeles, CA). El límite de sensibilidad fue de 0,0045 ng/ml. Todas las medidas fueron tomadas por duplicado. (Reame *et al.*, 2014)³¹ También, en plasma se realizó la determinación de glucemia, cantidad de colesterol y triglicéridos, a través, de una Química sanguínea, por espectrofotometría, en el equipo ILab 600.

Posteriormente, se extrajeron los epidídimos, para lo cual se tomaron las tijeras de punta roma y unas pinzas con algodón con alcohol, se limpió el área abdominal y por medio de una incisión se observaron las estructuras perigonadales, exponiéndose las gónadas, se separó la grasa, misma que se pesó para determinar el peso relativo con respecto al corporal (Malafaia *et al.*, 2013). Se cortaron los conductos eferentes, el testículo y epidídimo colocándolos a temperatura corporal de la rata (37°C), para mantener la viabilidad de los espermatozoides.

Se pesaron los órganos, epidídimo derecho, testículos, grasa derecha e izquierda alrededor del epidídimo y grasa parda, colocándose en criotubos, y almacenándose, el testículo izquierdo, grasa blanca izquierda y derecha, y grasa parda, a -70°C. El epidídimo y testículo derecho, fue fijado en una solución de formalina neutra, para su posterior procesamiento histológico.

Inmediatamente después, el epidídimo izquierdo fue seccionado en sus tres regiones anatómicas gruesas (*caput*, *corpus* y *cauda*) de acuerdo con el procedimiento descrito por (Cervantes *et al.*, 2008), las regiones epididimarias (*caput*, *corpus* y *cauda*) del lado derecho se fijaron con formalina neutra, para su posterior procesamiento histológico. Las regiones epididimarias del lado izquierdo fueron depositadas en una caja con 4 pozos, haciendo unas ligeras incisiones y exprimido con tijeras, se adicionó medio Ringer (750µl), dejándose por unos minutos para provocar el desprendimiento de los espermatozoides, todo a temperatura de 37°C, enjuagando la caja de cuatro pozos con 250µl de Ringer, para filtrar el remanente de material biológico y así separar el fluido con espermatozoides del tejido epididimario (León-Galvan *et al.*, 1999). La suspensión de espermatozoides se dividió para las evaluaciones a realizar.

A los espermatozoides obtenidos se les determinó, viabilidad y morfología, según el método descrito por el 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 y Tlachi-López 2008; OMS 2010).

12.4. Determinación de carbohidratos mediante lectinas en espermatozoides

Se utilizaron lectinas conjugadas con FITC: WGA, que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico; ConA, a residuos de manosa, y UEA, que se une a fucosa (Fierro *et al.*, 1996)⁴³. Se usaron alícuotas de 5 millones de espermatozoides ($\approx 50\mu\text{l}$) y se agregaron 5 μl de lectina (a una dilución 1:50) + FITC incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados, centrifugando a 500 g durante 5 minutos con PBS (50 μl) y se procedió a fijarlas con paraformaldehído al 1% en PBS y se cubrieron de la luz. Se observaron al microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX41. Se determinó el patrón de distribución de la lectina en la membrana del espermatozoide, posteriormente a las alícuotas de 500 μl o 1×10^6 espermatozoides se le agregarán 475 μl de PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo (FacScan Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, USA), y determinar la intensidad de fluorescencia (De Maistre *et al.*, 1996, Jimenez *et al.*, 2003). Se evaluaron 10,000 células por muestra.

12.5. Determinación de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides

Se tomaron 5 millones de espermatozoides (50 μl) de cada región del epidídimo en una solución Ringer y se fijó con formaldehído al 2% (1:1) en PBS (pH=7.4, a 4°C) durante 30 minutos. Se centrifugó a 700G durante 3 min. Se permeabilizó con 100 μl de Saponina al 0.05% en PBS durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se bloquearon los sitios inespecíficos con albumina sérica bovina al 0.1% y tween 20 al 0.01%, colocando 1 μl de cada uno durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugaron a 700 x g durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante y se añadió el anticuerpo. Al botón se le agregó 1.5 µl de PY20 + 8.5 de medio BSA+PBS (2µg/ml) y al botón del control negativo 1.5µl de IgG (10µg/ml), dejándose incubar durante toda la noche. Se centrifugó a 700 G durante 3 minutos y se resuspende con 100µl de PBS, dos repeticiones. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 100µl de PBS. Se observaron al microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX41. Se determinó el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en el espermatozoide, posteriormente se toma la alícuota de espermatozoides se les agregó 475 µl de PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo (FacScan Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, USA), y determinar la intensidad de fluorescencia (De Maistre *et al.*, 1996; Jimenez *et al.*, 2003). Se evaluaron 10, 000 células por muestra.

12.6. Evaluación de especies reactivas de oxígeno presentes en espermatozoides

El contenido de ERO en espermatozoides se determinó mediante citometría de flujo (FacScan Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, USA), usando ensayos con DCF (Cathcart, 1983). Se usaron 3 alícuotas de 0.5×10^6 espermatozoides de rata Wistar (60µl) en 1 ml de Ringer, en tubos cubiertos de la luz, a las que se les agregó 50µl de DCF 32µM.

Para incorporar el DCF fueron incubados 15 minutos en total oscuridad a 4°C se centrifugó, con la finalidad de desechar el DCF que no se incorpore a las células, a 1500 x g por 5 minutos. El botón espermático se resuspendió en 1ml de Ringer, antes de cuantificar la intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo, usando

una longitud de onda de excitación de 480nm, y una longitud de onda de emisión de 520nm.

Una alícuota se usó como control negativo (sin DCF); a una se le agregó DCF; y a una se le agregó H₂O₂. Todo esto en el momento previo para cuantificar la intensidad de fluorescencia (Arenas *et al.*, 2009).

12.7. Actividad enzimática antioxidante

Antes de determinar la actividad de GPX, SOD y CAT, los órganos se descongelaron a 4 °C en 10 volúmenes de tampón HEPES frío (0,1 M, pH 7,4) y se homogeneizaron en un Potter. Homogeneizador vidrio-vidrio tipo Elvehjem. Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron durante 10 min a 5000 x g. Se descartaron los precipitados y se midió la actividad enzimática en los sobrenadantes. Los ensayos para cuantificar la actividad enzimática se realizaron como se describió anteriormente.

La actividad GPX (EC.I.II.1.9) se determinó a 25°C utilizando kit Ransel (RS504, Randox Laboratorio, Limited, Crumlin, Irlanda del Norte) para determinar la oxidación de NADPH a 340 nm durante 5 min (DE Paglia & WN Valentine, 1967). (i) La actividad de SOD (EC.I.15.1.1) se midió utilizando kits RANSOD (SD125, Randox Laboratories) a 37 °C. La absorbancia se controló a 505 nm durante 3 minutos. (ii) La actividad CAT (EC1.11.1.6) se determinó a 25 °C después del pretratamiento de las muestras con etanol (64-17-5, 0,01 ml de EtOH/ml de homogeneizado) y TritonX- 100 (1,0%) (concentración final v/v; 9036-19-5, EMPROVE EXPERT Ph Eur, Sigma Aldrich, México) en un baño de hielo (B Chance y D Herbert, 1950). Después de la incubación, la cantidad de H₂O₂ (7722-84-1,

Millipore Sigma, Darmstadt, Alemania) que permaneció en la mezcla se determinó midiendo el KMnO₄ sin reaccionar (7722-64-7, Merck, Darmstadt, Alemania) a 25°C y 480 nm.

La actividad enzimática se expresó de la siguiente manera: para la superóxido dismutasa, en USOD (una unidad de actividad definida como la cantidad de enzima que inhibió la tasa de formación del colorante formazán en un 50%) (JJ Bogdanska *et al.*, 2003); catalasa, como el cambio en k (la velocidad constante de la reacción de primer orden) (G. Cohen *et al.* 1970); y glutatión peroxidasa, como AGPX (nmol de NADPH oxidado por minuto).

12.8. Análisis de resultados

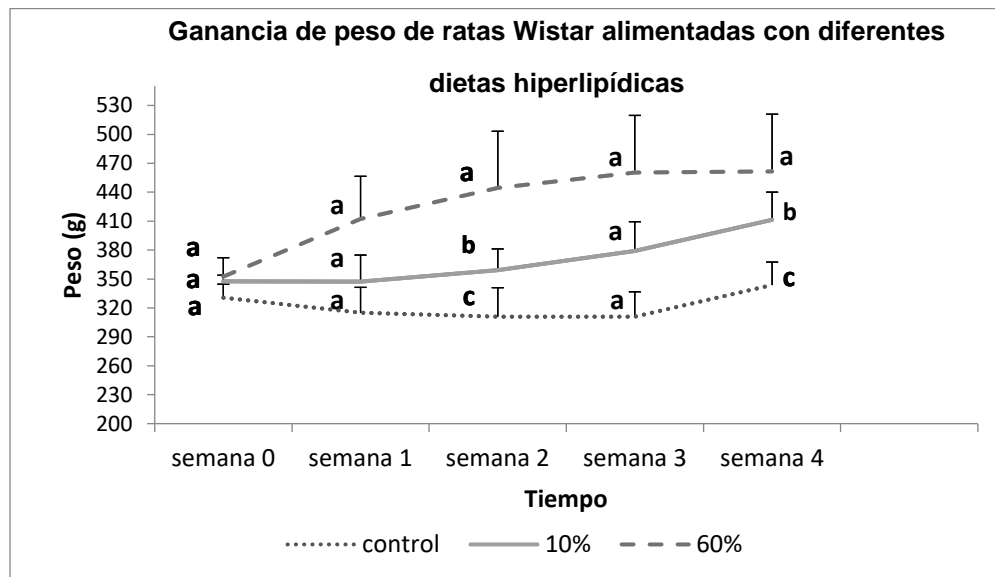
Los datos de ganancia de peso se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Estos datos biométricos registrados en las ratas: peso corporal, índice de Lee, índice gonadosomático, datos de peso de testículo, epidídimo y grasa se representaron como media \pm desviación estándar, así como, los datos espermatobioscópicos, la distribución y composición de carbohidratos, y la determinación de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se agruparon y se analizaron utilizando Saphiro Wilk para afirmar o descartar normalidad y prueba de Bartlett o Levene para homocedasticidad, seguido de una prueba ANOVA de una vía, y cuando esta ANOVA mostraba un resultado significativo, los valores se compararon mediante una prueba post-hoc de Tukey y Kramer. En el caso de que las poblaciones comparadas fueran asimétricas se utilizó una prueba de Kruskal Wallis.

Las diferencias entre los distintos grupos fueron considerados significativos cuando $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPad PRISM versión 5.0.

13. Resultados

13.1. Inducción de obesidad y prueba de fertilidad

A cada individuo se le tomó el peso diariamente (gráfica 1), de tal forma que pudiera observarse la ganancia de peso de todos los grupos (CN, SOB y OB).



Gráfica 1. Promedio \pm ES de los pesos de rata Wistar alimentadas durante 4 semanas con una dieta hipercalórica (n=6). Letras distintas indican diferencias significativas (control vs 10% (sobrepeso) vs 60% (obesidad), $P < 0.05$).

Indicando que las ratas del grupo control, se mantuvieron en un peso entre 310 y 340 g, no excediendo los 400 g. Los grupos de sobrepeso y obesidad tuvieron un aumento de peso del 24.17 y 51.12% respectivamente (Tabla 2), con respecto al control. En cuanto a los consumos, todos los grupos consumían alimento en un rango de 18 y 40 g al día.

Al final, basándonos en la diferencia de pesos, porcentaje e índice de Lee (Tabla 2 y 3) podemos afirmar que hubo un aumento de peso, determinando sobrepeso en el caso del grupo de 10% y obesidad en el grupo de 60%, y que concuerda con lo reportado por otros autores que han inducido obesidad en otro modelo de rata (Rui-Ying *et al.*, 2016 ; Novelli *et al.*, 2007).

Tabla 2. Peso corporal e índice de Lee en animales alimentados con una dieta balanceada (grupo CN) o hiperlipídica (grupo de SOB y OB).

Parámetro	CN	SOB	OB
	Valor ± D.E.		
Peso (g)	343.7 ± 41.2	411 ± 49.7*	462 ± 102.7*
Índice de Lee (g/mm)	0.337 ± 0.002	0.355 ± 1.301*	0.357 ± 0.551*

* grupo CN vs SOB vs OB. $p < 0.05$ (n=6)

Datos expresados en media ± DE

Tabla 3. Ganancia de peso de ratas Wistar (porcentaje), tomando como referencia el promedio del peso de los controles como el 100%.

Individuos	CN	SOB	OB
Peso (%)	100	124.17	151.12

13.2. Depósitos de grasa gonadal

En la figura 1 se muestran los depósitos de grasa en las ratas Wistar control y obeso, observándose que estos aumentan conforme aumenta el peso corporal. Los pesos de la grasa derecha e izquierda retirada de alrededor del epidídimo y testículo aumentaron significativamente ($P < 0.05$), 8.542 ± 1.205 en el grupo de sobrepeso y 12.38 ± 2.304 en el de obesidad, con respecto al control, 3.859 ± 0.077 (gráfica 2).

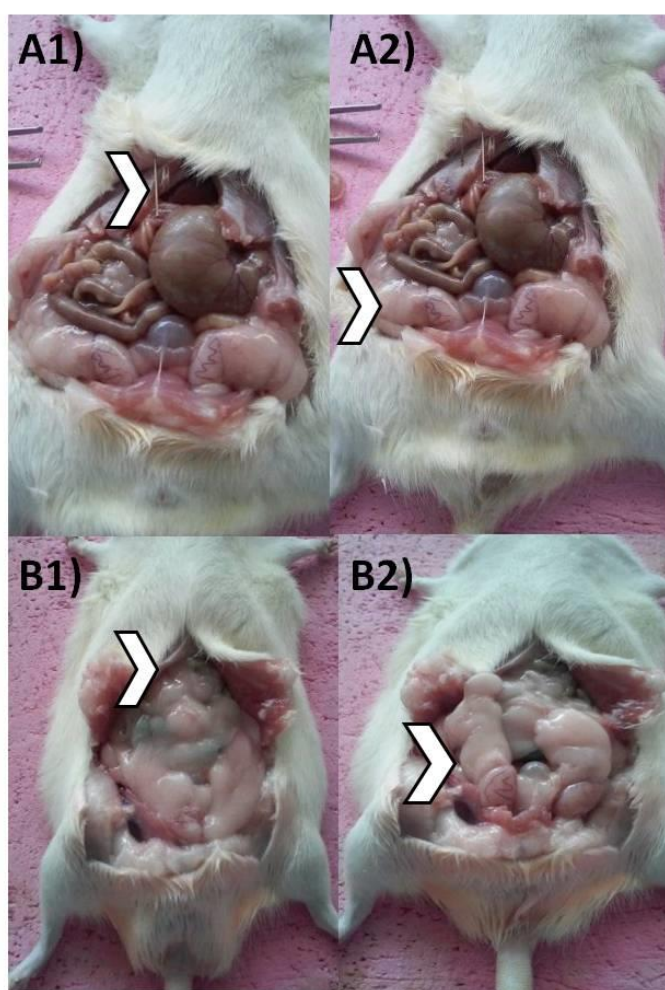
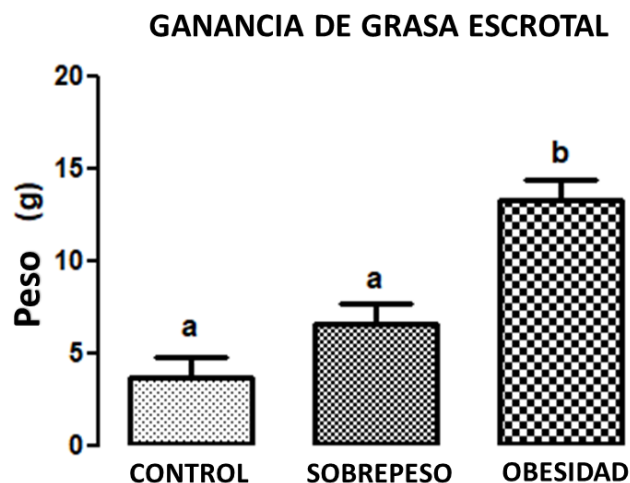


Figura 1 Fotografías que muestran los depósitos de grasa mesentérica y periférica al testículo y epidídimo (indicados con flecha blanca), en ratas Wistar: control (A1 y A2) y obeso (B1 y B2).



Gráfica 2. Peso de la grasa escrotal en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (CN) y alimento alto en grasa (SOB y OB). Datos expresados como media \pm DE, $P < 0.05$ ($n=6$) (letras diferentes indican diferencias significativas, CN vs OB).

Tabla 4. Fertilidad en ratas Wistar control (CN) y con sobrepeso (SOB) y obesidad (OB).

Parámetros	Crías por camada		
	CN	SOB	OB
Tamaño de camada	11.600 \pm 1.020	7.800 \pm 1.470*	9.800 \pm 0.748
Número de machos	7.400 \pm 1.356	3.400 \pm 1.020*	4.400 \pm 0.490**
Número de hembras	4 \pm 1.225	4.400 \pm 0.490	5.400 \pm 0.490

*Indica diferencias significativas entre el grupo CN vs SOB.

**Indica diferencias significativas entre el grupo CN vs OB ($P < 0.05$) ($n=3$).

Datos expresados como media \pm DE

En la prueba de fertilidad (tabla 4) se observó que, el grupo control produjo 12 crías por camada y el grupo de obesidad 10 crías, sin embargo, el grupo de sobrepeso produjo 8 crías ($P<0.05$).

Por otro lado, la distribución de género en la camada del grupo control fueron 4 hembras y 7 machos ($H/M=0.571$), mientras que en el grupo de obesidad 5 hembras y 2 machos ($H/M=2.5$); sorprendentemente en el grupo de sobrepeso el número de machos disminuyó significativamente con respecto a las hembras (4 hembras y 3 machos; $H/M=1.3$; $P<0.05$).

13.3. Parámetro macrométrico de testículo

Al determinar el parámetro morfométrico que indica la condición de las gónadas, a través del IGS $g^{-1} \pm DE$ ($n=6$), podemos encontrar que no hay ninguna diferencia entre los grupos. Sin embargo, ésta tiende a disminuir inversamente proporcional al aumento de peso, 0.431 ± 0.064 en el grupo sobrepeso, 0.376 ± 0.059 en el grupo de obesidad y 0.448 ± 0.033 en el grupo control.

13.4. Análisis de los parámetros metabólicos

Utilizando las alícuotas de sangre recuperadas al momento de la eutanasia, se evaluó la concentración de glucosa en sangre, utilizando un glucómetro y, a través, de una química sanguínea encontrándose que, en el grupo de sobrepeso en ambos métodos, parece haber una tendencia a presentar una mayor concentración de glucosa. En cuanto al colesterol y triglicéridos parece que estos aumentan en la condición de sobrepeso y obesidad (tabla 5). Sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre los tres grupos.

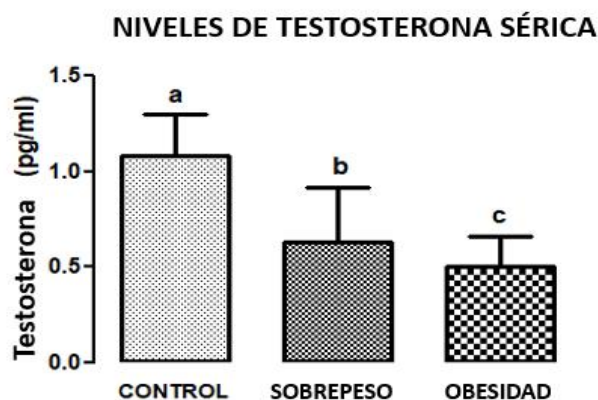
Tabla 5. Parámetros metabólicos: glucosa, colesterol y triglicéridos, obtenidos a través de una determinación de química sanguínea, en animales alimentados con una dieta balanceada (CN), y alimento alto en grasa (SOB y OB).

Parámetro (mg/dL)	CN	SOB	OB
Glucosa	111±42	149.6 ± 43.6	126.3 ± 7.7
Colesterol	50±4.5	71.3 ± 1.5	69 ± 8.1
Triglicéridos	53±7	216 ± 68.4	185.6 ± 42.1
Glucosa	189.5 ± 24.5	227 ± 69.50	195 ± 51.61

Los valores están expresados en media ± DE (n=3).

13.5. Niveles séricos de testosterona

Se determinó la concentración de testosterona sérica en todos los grupos (gráfica 3), en sobrepeso y obesidad disminuyó ($0.635 \text{ pg/ml} \pm 0.27$; $0.502 \text{ pg/ml} \pm 0.15$; $P < 0.05$) con respecto al control ($1.078 \text{ pg/ml} \pm 0.21$).



Gráfica 3. Niveles séricos de testosterona en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (CN) y alimento alto en grasa (SOB y OB) de alimento alto en grasa. Datos expresados como media \pm DE (letras indican diferencias significativas, $P < 0.05$, $n=6$).

13.6. Análisis de la calidad de los espermatozoides

La tabla 6 muestra los parámetros espermáticos evaluados en los tres grupos (control, sobrepeso y obesidad), estos son: viabilidad y morfología (cabeza amorfa, pieza media angular, pieza media asimétrica, flagelo angulado, flagelo enrollado). Los grupos de sobrepeso y obesidad tuvieron más espermatozoides teñidos en tono rosa (figura 2), es decir, una disminución de la viabilidad (70 ± 10 y 32 ± 20 vs 96 ± 3) y un aumento de las anomalías en la forma de la cabeza, pieza media y flagelo de los espermatozoides.

Tabla 6. Evaluación espermática en ratas Wistar alimentadas con una dieta balanceada (CN), y alimento alto en grasa (SOB y OB).

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

Grupo	Viabilidad	Anormalidades morfológicas del espermatozoide				
		Cabeza amorfa	Pieza media Angular	Pieza media Asimétrica	Flagelo enrollado	Flagelo angular
CN	96 ±3 ^a	1 ± 1 ^a	7±6 ^a	0 ^a	13 ±2 ^a	2 ±2 ^a
SOB	70 ±10 ^b	2 ±1 ^b	19±9 ^b	1±1 ^{ab}	45±17 ^b	14±15 ^{ab}
OB	32±20 ^c	3±1 ^c	34±9 ^c	1± 1 ^b	54±14 ^b	22±20 ^b

Valores expresados en media ± DE

Letras diferentes indican diferencias significativas (^{a≠b≠c}) entre los grupos, $P<0.05$ ($n=6$).

Comparaciones con diferencias significativas: Viabilidad (control vs sobrepeso vs obesidad); cabeza amorfa (control vs sobrepeso vs obesidad); pieza media angular (control vs sobrepeso vs obesidad); pieza media asimétrica (control vs obesidad); flagelo enrollado (sobrepeso y obesidad vs control) y flagelo angular (control vs obesidad).

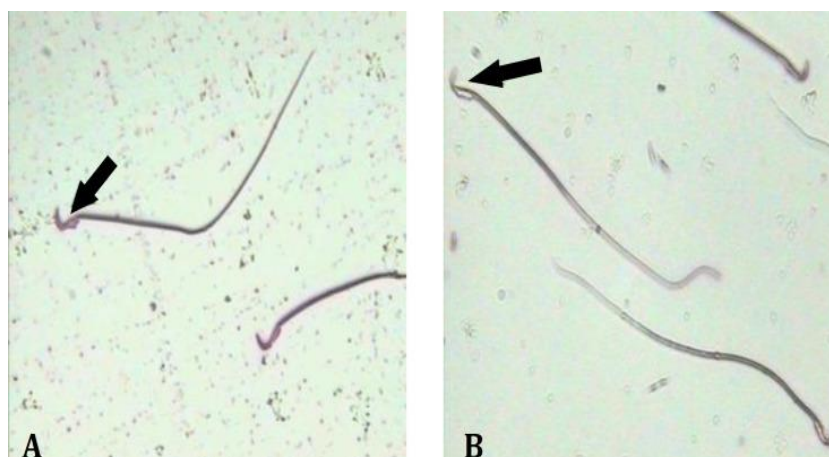


Figura 2. Microfotografía que muestra la viabilidad espermática. A) Espermatozoide muerto, en tono rosa-morado B) Espermatozoide vivo, transparente, señalados por flechas negras.

13.7. Determinación de la distribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide

Se determinó la distribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide, mediante microscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Para estos, se usaron tres diferentes lectinas, WGA que reconoce a N-acetilglucosamina y ácido siálico; CoA que reconoce a Manosa y UEA que reconoce a fucosa. Los patrones de fluorescencia encontrados en el reconocimiento de N-acetilglucosamina y ácido siálico fueron: en el acrosoma, todo el espermatozoide y sin fluorescencia; en el reconocimiento de Manosa fueron: en acrosoma, todo el espermatozoide y sin fluorescencia; en el reconocimiento de fucosa fueron: todo el espermatozoide y sin fluorescencia (Figs. 3 y 4).

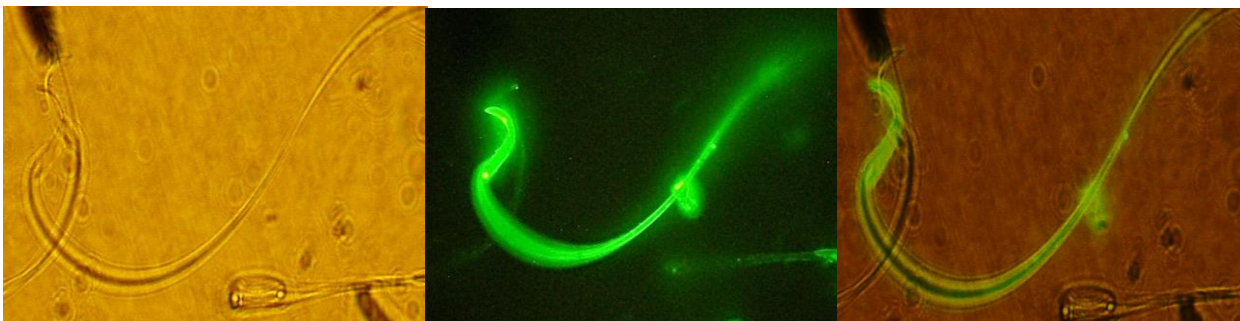


Figura 3 Microfotografías de campo claro, epifluorescencia y merge del patrón denominado tinción total, encontrado a través de marcaje con lectinas: WGA, COA y UEA, en toda la membrana del espermatozoide (se observó a 100X).

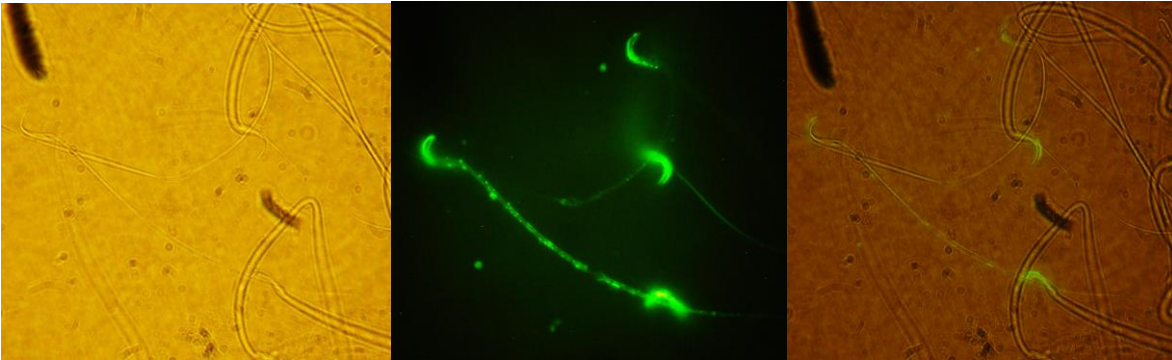


Figura 4 Microfotografías de campo claro, epifluorescencia y merge del patrón denominado Cabeza, encontrados a través de marcaje con lectinas: WGA, COA, UEA, en toda cabeza del espermatozoide (observado a 100X).

Determinación de la distribución de n-acetil glucosamina y ácido siálico

El marcaje de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en la región de la cabeza de los espermatozoides provenientes del *caput* y *corpus* del epidídimo en los grupos control, sobrepeso y obesidad disminuyó (66, 31.6 y 30% y 69.5, 31 y 33.5% respectivamente). Sin embargo, en la región de la *cauda* del epidídimo, no se encontraron diferencias.

Por otro lado, la distribución de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en toda la membrana del espermatozoide aumentó en los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto al control en el *caput* (54.33 ± 7.77 y 55 ± 10 vs 27 ± 2) y *corpus* (60.67 ± 1.15 y 55.5 ± 2.5 vs 25.5 ± 10.5) de epidídimo, sin embargo, en la cauda del epidídimo no hubo cambios de la distribución.

La distribución de N- acetil-glucosamina y ácido siálico en la cabeza del espermatozoide, va de menos a más conforme transita por el epidídimo en el grupo alimentado con una dieta balanceada, todo lo contrario, con el patrón de distribución en toda la membrana del espermatozoide, que va de más a menos (Tabla 7).

Determinación de la distribución de Manosa

La distribución de Manosa en la cabeza y toda la membrana del espermatozoide no tuvo cambios significativos entre los grupos de sobrepeso y obesidad, con respecto al grupo control (Tabla 8).

Determinación de la distribución de Fucosa

La distribución de Fucosa con la lectina UEA fue evaluada en cada una de las regiones del epidídimo en los grupos control y tratamiento con dietas hipercalóricas, pero no fue posible detectar a través de microscopía de epifluorescencia su distribución en toda la membrana ni en la cabeza del espermatozoide.

Por medio de microscopía de campo claro se verificó que los espermatozoides se encontraran en la muestra seleccionada para la evaluación de este carbohidrato, por lo que no fue posible establecer ningún patrón de fluorescencia.

Tabla 7. Distribución de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en espermatozoides epididimarios de la región de *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas Wistar alimentadas con dietas balanceada (CN) e hipercalóricas (SOB y OB).

Grupo	Patrón de fluorescencia en <i>caput</i>		Patrón de fluorescencia en <i>corpus</i>		Patrón de fluorescencia en <i>cauda</i>	
	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>
CN	63 ± 5 ^a	27 ± 2 ^a	69.5 ± 10.5 ^a	25.5 ± 10.5 ^a	74.5 ± 1.5 ^a	21 ± 1 ^a
SOB	31.67 ± 7.64 ^b	54.33 ± 7.77 ^b	31 ± 3.61 ^b	60.67 ± 1.15 ^b	44.6 ± 29.3 ^a	36 ± 18.5 ^a
OB	30 ± 2 ^c	55 ± 10 ^c	33.5 ± 3.5 ^c	55.5 ± 2.5 ^c	24.6 ± 22.8 ^a	24.6 ± 22.8 ^a

Letras indican diferencias entre grupos: ^a≠ ^b≠ ^c control vs sobrepeso vs obesidad y sobrepeso vs obesidad, $P < 0.05$.

Los valores se representan como media ± DE (n=6)

Tabla 8. Distribución de Manosa en espermatozoides epididimarios de la región de *caput*, *corpus* y *cauda* de ratas Wistar alimentadas con dietas balanceada (CN) y alimento alto en grasa (SOB y OB).

Grupo	Patrón de fluorescencia en <i>caput</i>		Patrón de fluorescencia en <i>corpus</i>		Patrón de fluorescencia en <i>cauda</i>	
	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>	<i>Cabeza</i>	<i>Tinción total</i>
CN	77.5 ± 0.5	6.5 ± 0.5	74.5 ± 0.5	14.5 ± 0.5	76 ± 6	14.5 ± 8.5
SOB	70 ± 24.5	13.6 ± 8	45.6 ± 36	29 ± 28.7	51 ± 36.6	34 ± 25.6
OB	67 ± 19.6	15.3 ± 8	67 ± 24	16 ± 12.6	60.6 ± 34	28.3 ± 25

Los valores se representan como media ± DE (n=6)

13.8. Análisis de la composición de carbohidratos en espermatozoides

N-acetil-glucosamina y ácido siálico

En la región de *caput* se observó que disminuyó la composición de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en el grupo de obesidad, 118.15 ± 73.69 ($P < 0.05$), con respecto al grupo control y de sobrepeso, 279.74 ± 26.87 ; 309.29 ± 113.36 (Tabla 9). Sin embargo, en la región de *corpus* parecía encontrarse mayor presencia de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en el grupo de sobrepeso con respecto al control y el grupo de obesidad. A pesar de que en la región de la *cauda* parecía observarse menos intensidad de fluorescencia no se observaron diferencias entre grupos.

Manosa

La composición de Manosa puede apreciarse en la tabla 9. Se muestra que en la región de *corpus* no tuvo diferencias entre grupos. Mientras que en la región de *caput* y *cauda* el grupo de obesidad presentó una disminución significativa con respecto al grupo de sobrepeso (98.97 ± 5.46 vs 309.3 ± 334.6 ; 56.18 ± 14 vs 130.72 ± 59.9 , $P < 0.05$).

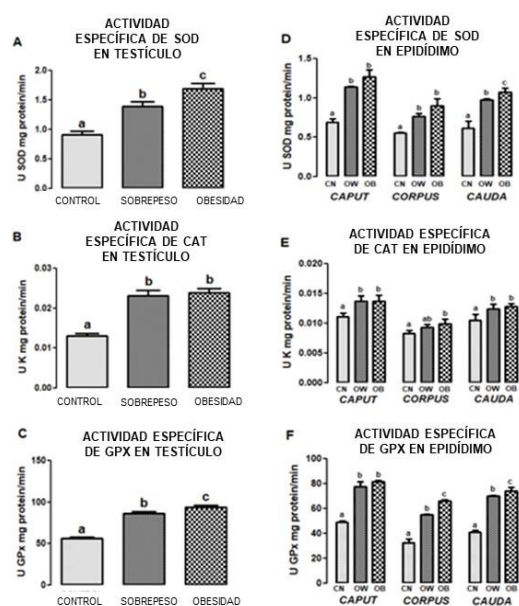
Fucosa

Se puede observar la composición de Fucosa en los espermatozoides (Tabla 9), es importante mencionar que su índice de fluorescencia (IF) tuvo una tendencia a ser menor en comparación con los demás carbohidratos tanto así que al determinar su distribución, a través, de patrones de fluorescencia mediante microscopía no fue posible evaluarla. En la región de *caput* la presencia de fucosa fue mayor en el grupo de sobrepeso que con respecto al grupo control y obesidad (120.83 ± 101 vs $8.78 \pm$

6.07 vs 5.31 ± 4.6, $P < 0.05$) sin embargo, el grupo de obesidad presentó el menor IF (5.31 ± 4.6, $P < 0.05$).

13.9. Actividad específica de las enzimas SOD, CAT y GPX en testículo y epidídimo

Los resultados de la actividad específica (SA) de la enzima antioxidante SOD en los testículos (Figura 3 (a)) de las ratas de los grupos CN, OW y OB mostraron un aumento en el tejido testicular para OW y OB en comparación con CN. SA fue mayor en el *caput* y *cauda* que en el *corpus*, pero la diferencia entre *caput* y *corpus* no fue significativa. En las tres regiones, la SA de SOD fue mayor en OW y OB que en CN. Respecto a la SA de CAT en el tejido testicular (Figura 3 (b)) para los tres grupos de estudio, OW y OB



Gráfica 5. Actividad específica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en el testículo y epidídimo de rata Wistar alimentadas con una dieta regular (control (CN)) y dietas hiperlipídicas

con 10 y 60% grasa (sobrepeso (OW) y obesidad (OB)) respectivamente. La actividad específica esta expresada en mg de proteína/min. ^{a,b,c} indican diferencias entre los grupos de estudio ($P \leq 0.05$) (CN vs OW vs OB).

13.10. Proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides

En la Tabla 10 se muestran los resultados de las proteínas que presentaron fosforilación en los residuos de tirosina de espermatozoides obtenidos de las regiones de *caput*, *corpus* y *cauda* de epidídimo de ratas Wistar, en los tres grupos de estudio (control, sobrepeso y obesidad). El índice de fluorescencia presente en la región del *corpus* del epidídimo fue mayor en el grupo de obesidad con respecto al control (^{a b} $P < 0.05$). El grupo control mostró que la fosforilación disminuye en el *corpus* y en la *cauda* con respecto a la intensidad que se aprecia en la región de *caput* (* $P < 0.05$).

Tabla 10. Porcentaje de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en espermatozoides de rata Wistar alimentadas con una dieta balanceada (control) y alimento 10 y 60% de grasa (sobrepeso y obesidad respectivamente) (media \pm DE, n=3).

Grupo	Regiones del epidídimo		
	<i>caput</i>	<i>corpus</i>	<i>cauda</i>
CN	14.84 \pm 4.1	2.05 \pm 0.7 ^{a*}	3.95 \pm 2.9*
SOB	7.02 \pm 2.9	4.15 \pm 3.9 ^a	3.53 \pm 1.8
OB	6.45 \pm 3.2	11.06 \pm 3.6 ^b	6.13 \pm 2.9

Letras diferentes indican diferencias significativas (CN vs SOB vs OB)

*Indica diferencias significativas (*caput* vs *corpus* vs *cauda*).

14. Discusión

En los últimos 70 años, varios estudios indican que la disminución de la calidad seminal se debe, en parte, al estado de sobrepeso y obesidad que presenta un varón, sin embargo, aún no se ha dilucidado cómo el espermatozoide puede perder su funcionalidad. El presente estudio muestra que una dieta alta en grasa induce en la rata Wistar sobrepeso y obesidad, caracterizados por un incremento en el peso corporal y en el índice de Lee.

Numerosos marcadores de obesidad han sido asociados con la acumulación excesiva de tejido adiposo, tales como el peso corporal (Woods 2017), el índice de masa corporal (Akiyama *et al.* 2017), el índice de Lee (Macedo *et al.* 2021), así como las concentraciones de leptina sérica (Ren *et al.* 2005, Frederich *et al.* 2002). Respecto al peso, en animales un aumento del 15% es considerado como sobrepeso (Ibañez *et al.*, 2005) y obesidad arriba del 30% (Nascimento *et al.*, 2008). En este trabajo, las ratas con sobrepeso mostraron aumento del 19% del peso, mientras que las ratas obesas 35%, con un índice de Lee mayor en ambos grupos respecto al grupo control, considerados como marcadores de obesidad sugiriendo que la dieta rica en grasa induce sobrepeso y obesidad, además de mostrar alteraciones en las concentraciones de T y la viabilidad espermática, sin embargo solo la obesidad induce disminución en las concentraciones de T, mientras tanto el sobrepeso como la obesidad inducen daño en el DNA del espermatozoide, así como su capacitación, lo que sugiere que el aumento de la adiposidad a nivel del epidídimo y grasa visceral es capaz de afectar la maduración.

Muchos de los estudios, se enfocan solo en los animales obesos, pero para nuestra mayor comprensión fue necesario proponer un modelo que reprodujera el modelo de sobrepeso, ya que esta condición ha sido muy poco analizada en los modelos animales experimentales. Utilizando un modelo de rata con un tratamiento hiperlipídico del 10%, Woods *et al.* (2017) determinó que el peso aumenta un 10 y hasta un 25% en comparación con el grupo que recibe una dieta balanceada. Esta ganancia de peso, por lo tanto, indica una condición de sobrepeso u obesidad moderada.

Las ratas con hiperlipidemia con 60 a 75% de grasa, mostraron un aumento de peso mucho mayor al 40% lo que indica que tienen una condición de obesidad severa. En nuestro estudio las ratas del tratamiento 10% alto en grasa muestra un aumento del peso corporal del 24.17%, por lo que ha sido considerarlo un grupo de sobrepeso. Las ratas que recibieron el tratamiento 60% alto en grasa aumento el peso corporal hasta un 51.12% comparado con las ratas del grupo control, por lo que ha sido considerado como grupo de obesidad.

Varios autores han reportado que los valores del índice de Lee como indicadores de obesidad, pueden variar dependiendo de la edad del animal, sin embargo, Viguera-Villaseñor (2011) administró una dieta hipercalórica a ratas Sprague-Dawley de 30 días, y reportaron un índice de Lee de 0.3; en el estudio de Leopoldo (2016) el índice de Lee calculado en ratón Thellier de 30 días de edad y alimentados con una dieta hiperlipídica por 15 días, fue de 0.7. Los índices de Lee calculados en este estudio fueron de 0.329 en tratamiento 10% de grasa y 0.339 en el tratamiento 60% de grasa, razón suficiente para considerar que se encuentran dentro del rango

de una condición corporal anormal, sin embargo, no para diferenciarse entre ellas como sobrepeso y obesidad.

Algunos estudios sugieren la importancia de considerar la correlación entre el índice de Lee y la masa grasa de los animales para estimar el índice corporal en ratas (Chemes and Rawe., 2010; Luque et al., 2016). Esos informes sugieren que el índice de Lee por sí solo no debe usarse como referencia para determinar la obesidad, ya que en algunos casos no existe una correlación directa entre el peso corporal y este índice (Paglia and Valentine, 1967). Esto ocurrió en nuestros resultados, donde las ratas con sobrepeso y obesidad tenían índices de Lee similares, pero el peso corporal fue significativamente mayor en el grupo de obesidad y la grasa escrotal fue diferentes entre ellos, siendo mayor con respecto al control.

Varios estudios han informado que la obesidad puede afectar la calidad del espermatozoide. Anteriormente se ha informado que al menos dos generaciones de varones que provienen de padres obesos (resultado de consumir una dieta hipercalórica) presentan un gran número de enfermedades crónicas como obesidad, diabetes tipo 2, trastornos del comportamiento y reproductivos (Kahn and Brannigan, 2017; Sheynkin et al., 2005). Sin embargo, en el presente trabajo se observa un efecto inmediato, presentándose una disminución en el tamaño de las camadas, de padres con sobrepeso, además de una menor proporción de machos, lo que podría explicarse por una mayor vulnerabilidad en los gametos masculinos a los efectos provocados por sobrepeso y obesidad.

Además, se encontró que la dieta alta en grasas (10%) fue suficiente para alterar la espermatogénesis, como lo informaron previamente en Viguera *et al.* (2011) y Yang *et al.* (2005). Este proceso puede verse afectado por el grado de obesidad (Hess, 2003). En las ratas obesas, se observó un efecto negativo, ya que mostraron una viabilidad espermática significativamente más baja y un aumento en las anomalías del espermatozoide que las ratas con sobrepeso.

El presente estudio encontró que en sobrepeso y obesidad (alimentados con dietas ricas en grasas, al 10 y 60% respectivamente) se presentaron niveles reducidos de testosterona, como se ha informado para animales obesos en varios otros estudios (Bianchi, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2017). Estos niveles reducidos de T se relacionaron con el grado de obesidad y con un aumento en los niveles de estrona y estradiol debido a la aromatización periférica de los andrógenos que induce la desregulación endocrina, lo que conduce a niveles bajos de T (Cui *et al.*, 2008; Álvarez y Storey, 1984).

Se ha demostrado que una de las causas de una mala calidad espermática se debe a un mal funcionamiento del eje HHT, concentraciones bajas de FSH y LH (Blancas *et al.*, 2010) y alteraciones en la síntesis de SHBG en la condición de obesidad (Zhang *et al.*, 2011) que provoca un aumento de T libre, haciéndola disponible para la conversión a E₂, una hormona que inhibe la secreción de GnRH en el hipotálamo. Esto reduce la concentración de T que, a su vez, afecta la funcionalidad de las células de Leydig (Jia *et al.*, 2018). Se ha reportado también que la acumulación de grasas saturadas en células testiculares como las células de Sertoli alteran a la

espermátogénesis debido a modificaciones en la composición de ácidos grasos en la membrana (Palmer *et al.*, 2012; Godeas *et al.*, 2017).

Es importante señalar que las alteraciones antes mencionadas, fueron significativamente mayores en el grupo de obesidad que en las ratas con sobrepeso, diferencia que podría deberse, además, a la reducción de testosterona, y que altera la diferenciación y supervivencia espermática.

El aumento de la grasa escrotal también puede desempeñar un importante papel, ya que fue significativamente mayor en las ratas obesas que en el grupo de sobrepeso, consideramos que esta acumulación de grasa puede aumentar la temperatura escrotal en las zonas que rodean a los testículos y epidídimos, estas condiciones generan hipertermia escrotal, que es un factor de riesgo para la fertilidad masculina y tiene un efecto deletéreo sobre la espermátogénesis (Agarwal y Allamaneni, 2004; Valeri *et al.*, 1993).

Algunos estudios han sugerido que la presencia excesiva de grasa alrededor de los testículos y epidídimos en modelos animales de obesidad y humanos pueden alterar la temperatura de estos órganos, desencadenando un aumento del tejido adiposo que recubre el plexo pampiniforme y afecta el sistema de enfriamiento testicular (Lue *et al.*, 1999). Este aumento de la temperatura escrotal induce una serie de alteraciones a nivel testicular que se asocian con un aumento de la apoptosis y una disminución del número de espermátogonias en el epitelio germinal (Zhu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005).

La obesidad también puede causar estrés oxidante sistémico (Baumber *et al.*, 2009) en los testículos y el epidídimo, reduciendo la síntesis de T, la espermátogénesis y

la funcionalidad óptima del espermatozoide (Banks *et al.*, 2015; Dastig *et al.*, 2011). En el caso de un estrés oxidante excesivo, la maduración nuclear del espermatozoide puede verse afectada, dando como resultado un exceso de puentes disulfuro, sitios abásicos (que en sí mismos no constituyen una ruptura del ADN), entrecruzamiento de proteínas nucleares y, finalmente, rupturas del ADN (solo cuando se produce oxidación por estrés severo) (Asadi *et al.*, 2017; Schwaab *et al.*, 1995; Kang, 2013). Los espermatozoides son muy sensibles, especialmente al superóxido y al peróxido de hidrógeno (Jeyakumar *et al.*, 2011; Magnúsdóttir *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2013), por lo que la exposición puede generar daño en la membrana y fragmentación del ADN. Las ratas con sobrepeso y obesidad presentan un aumento en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX en testículo y epidídimo, particularmente en el epidídimo las ERO se encontraron sumamente elevadas por lo que el aumento en la actividad específica de estas enzimas está contrarrestando este efecto oxidante, y se confirma cuando observamos que la integridad del ADN no se afectó.

Los mecanismos que explican cómo las ERO causan daño en el ADN son: 1) la generación de nuevas moléculas a partir de la degradación de los lípidos, específicamente, el malondialdehído que causa la oxidación de las bases nitrogenadas del ADN para producir 8'-hidroxiguanosina (pro-mutágeno); o 2) interacción directa de ERO con el ADN que induce a roturas en una o las dos cadenas. Es importante señalar que, aunque la temperatura se ha relacionado con el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, también se ha reportado que una disminución en los niveles de testosterona se asocia con un

aumento en el estrés oxidante, incluso en el sistema nervioso de la rata y en la glándula prostática del humano, la testosterona puede tener un efecto antioxidante (Ruiz et al., 2022).

Anteriormente no se había reportado que el sobrepeso y la obesidad pudieran afectar otro proceso de maduración espermática como lo es el proceso de glicosilación. Es por eso, que se llevó a cabo un marcaje de carbohidratos mediante la unión específica con lectinas, para observar si el sobrepeso y la obesidad eran capaces de alterar la distribución de estos durante el paso del espermatozoide, a través del epidídimo. Xin *et al.*, (2016), solo había reportado la cantidad de espermatozoides que presentaban el glicoconjugado, a través, de citometría de flujo permitiendo explorar la composición de la cubierta celular rica en carbohidratos del espermatozoide (glucocálix) pero no como esta composición puede modificarse en las regiones del epidídimo debido a la condición de obesidad.

Actualmente es importante reportar que efecto tiene el sobrepeso y la obesidad en este proceso, ya que, estudios realizados por Shalgi *et al.*, (1986) demostró, a través de sus estudios en rata, que los carbohidratos son necesarios para la interacción del espermatozoide y el ovocito; y que una faceta importante de esto son las alteraciones en el glicoma del espermatozoide. Las modificaciones de ácido siálico regulan la presentación del epítipo, la adhesión y señalización celular, algo que es crítico para que los espermatozoides alcancen y fertilicen con éxito al ovocito. Por otro lado, el carbohidrato N-acetil-glucosamina juega varios papeles para la adquisición de la movilidad del espermatozoide (Tourzani *et al.*, 2018), el reconocimiento de gametos (González-Santos *et al.*, 2019), el inicio de la reacción

acrosomal y en la unión del espermatozoide-ovocito (Wu y Sampson, 2014; Teclé y Gagneaux, 2015). Ambos carbohidratos, ácido siálico y N-acetil-glucosamina, estuvieron presentes en los tres grupos de estudio (control, sobrepeso y obesidad) en nuestros resultados. Presentándose mayormente una distribución en el área de la cabeza del espermatozoide donde se ubica el acrosoma y el núcleo, en el grupo control, hallazgo que concuerda con lo reportado por Ma *et al.*, (2016) y Hernández *et al.*, (2021).

Mientras que, en el grupo de sobrepeso estuvo menos presente en la cabeza, predominando en toda la membrana del espermatozoide, lo mismo en el grupo de obesidad, sin embargo, la presencia de carbohidratos disminuyó entre un grupo y otro.

El carbohidrato manosa se ha descrito como vital para que se lleven a cabo los procesos de capacitación, reacción acrosomal y en la unión con la zona pelúcida del ovocito. Se demostró, a través, del estudio de Shalgi *et al.*, 1986 que una concentración de 0.17 IU/ml de la enzima α -manosidasa tenía un potente efecto inhibitorio en el ovocito de hasta un 81%. Los residuos de manosa se agregan a la membrana del espermatozoide durante la espermatogénesis y se modifica a medida que pasan por el epidídimo (Jiménez *et al.*, 2003). Sharma *et al.*, (2014) ha reportado que los residuos de manosa se encuentran en la membrana del espermatozoide. En nuestros estudios se encontró la distribución de manosa en la cabeza y toda la membrana del espermatozoide, sin embargo, en ningún caso se observaron diferencias significativas.

El 30% de los residuos de manosa se encontraron en toda la membrana del espermatozoide para el grupo con obesidad, poco en comparación con lo encontrado en la región cefálica del espermatozoide, sin embargo, la presencia permanente de este carbohidrato concuerda con lo reportado por Aliabadi *et al.*, (2013) que es parte de la superficie de la membrana, en todas las regiones del epidídimo.

En este estudio pudimos apreciar que la composición de N-acetil-glucosamina y ácido siálico, representado por el índice o intensidad de fluorescencia (IF) en el grupo control suele apreciarse que esta parece disminuir en el espermatozoide conforme transita por el espermatozoide, sin embargo, en los grupos de sobrepeso y obesidad esta composición se mantiene en *caput* y *corpus*, pero en la *cauda* es menor. La IF en la región de *caput* en el grupo de obesidad con respecto al grupo control y sobrepeso disminuyó significativamente. Algo parecido se reporta por López- Trinidad (2021) en ratas Wistar jóvenes donde se observa que la composición de N-acetil-glucosamina y ácido siálico se presenta en altos niveles en las regiones de *caput* y *corpus*, pero disminuye en *cauda*, y en el caso de ratas Wistar que han envejecido disminuye significativamente en el área del *cuerpo* del epidídimo.

Por otro lado, la composición de manosa, representado por el índice de fluorescencia en espermatozoides de ratas Wistar jóvenes se presenta de mayor a menor conforme el espermatozoide transita el epidídimo, es decir, de *caput* a *cauda* (López-Trinidad *et al.*, 2021). En nuestro caso se apreció en los controles (ratas Wistar adultas) que la composición, representada por el índice de fluorescencia (IF)

se mantuvo en *caput* y *corpus*, y pareció disminuir en la *cauda*. Sin embargo, fue muy claro en nuestro estudio que en el caso del grupo con obesidad la composición en *caput* y *cauda* disminuyó significativamente con respecto al grupo de sobrepeso. Un impacto similar lo tuvieron espermatozoides de rata Wistar que recibieron tratamiento con cadmio, la composición, representada por el índice de fluorescencia en este estudio, disminuyó en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, en todas las regiones del epidídimo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021).

Lo mismo que en el caso de nuestro estudio, las ratas administradas con cadmio presentaron una reducción significativa de la composición de fucosa en la región del *caput* del epidídimo. Los valores de IF de fucosa, fueron muy bajos en todas las regiones del epidídimo. Sin embargo, en el caso del grupo con sobrepeso curiosamente parecía que estos valores fueron los más altos en nuestro estudio y que esta composición disminuía durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo.

Otros aspectos observados en este estudio fue el efecto que puede causar la obesidad en el proceso de capacitación espermática. Recordemos que además de la modificación de los carbohidratos, en la maduración del espermatozoide también es primordial que haya una externalización de fosfatidilserina y aminofosfolípidos para los cuales el ovocito tiene sitios de reconocimiento específicos (Rival *et al.* 2019; López-Trinidad *et al.* 2021). La fosfatidilserina en ciertos eventos se externaliza para realizar diversas funciones, entre ellas, durante la capacitación espermática, desde la región caudal del epidídimo relacionado con la fecundación (Samano *et al.* 2020). En nuestros modelos de estudio se determinó la

externalización de la fosfatidilserina en espermatozoides de la región de la cauda de epidídimo, a través de un marcador específico de membrana, encontrando que conforme aumenta el peso corporal se presenta más externalización de fosfatidilserina (**ANEXO**). Esto, también, puede relacionarse con una apoptosis temprana, como lo hallado en rata Sprague Dawley obesa en donde se aprecian en cortes histológicos correspondientes a la región de la cauda del epidídimo, que hay presencia de cuerpos apoptóticos, lo que nuevamente nos habla de un posible daño celular (Vigueras-Villaseñor et al., 2011). Por lo tanto, siendo la capacitación espermática un proceso previo a la reacción acrosomal podemos suponer que este podría verse afectado también, sin embargo, aún debe comprobarse.

La maduración espermática epididimaria es un proceso dependiente de andrógenos, particularmente requiere de T y DHT, así que al asociarse al sobrepeso y la obesidad con el aumento de la grasa escrotal, la disminución de T y de la calidad seminal, así como el aumento de las especies reactivas de oxígeno, podemos con certeza decir que los cambios fisiológicos y bioquímicos que experimenta el espermatozoide, a través, de su paso por el epidídimo, como las modificaciones post traduccionales (glicosilación y fosforilación) se verán afectadas, reflejándose en la disminución de la fertilidad bajo estas condiciones corporales.

15. Conclusión

Los resultados reportados aquí confirman que una dieta alta en grasa disminuye la concentración de testosterona, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en la región de cuerpo del espermatozoide; y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide. Sin embargo, la distribución y presencia

de N-acetil glucosamina y ácido siálico en la región de la cabeza del espermatozoide disminuyen; la presencia de fucosa fue mayor en la región de la cabeza del espermatozoide en el grupo de sobrepeso y en el grupo de obesidad su presencia disminuye en la región de la cauda del espermatozoide.

16. Referencias bibliográficas

- Agarwal A, Allamaneni S (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *9(3): 338-347.*
- Akiyama M, Okada Y, Kanai M, Takashi A, Momozawa Y, Ikeda M, Iwata N, Ikegawa S, Hirata M, Matsuda K, Iwasaki M, Yamaji T, Sawada N, Hachiya T, Tanno K, Shimizu A, Hozawa A, Minegishi N, Tsugane S, Yamamoto M, Kubo M, Kamatani Y (2017) Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nature Genetics 49(10): 1458-1467.*
- Alvarez J, Storey B (1984) Lipid Peroxidation and the Reactions of Superoxide and Hydrogen Peroxide in Mouse Spermatozoa *Biology of Reproduction 30(4): 833-841.*
- Ameratunga, D., Gebeh, A., & Amoako, A. (2023). Obesity and male infertility. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 90*, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102393>
- Asadi N (2017) The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic research.*
- Awano M, Kawaguchi A, Mohri H. (1993) Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil. 99(2):375-83.*
- B. Chance and D. Herbert, The enzyme substrate compounds of bacterial catalase and peroxides. *Biochemical Journal*, vol. 46, no. 4, pp. 402–414, 1950.
- B. Robaire and M. Hamzeh, Androgen action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 2011 vol. 32, no. 6, pp. 592–599.
- Banks W, Gray A, Erickson M, Salameh T, Damodara M, Sheibani N, Meabon J, Wing E, Morofuji Y, Cook D, Reed M (2015) Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit *Journal of Neuroinflammation and elements of the neurovascular unit 12(1): 223.*
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies MC (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology 21(6): 895–902.*
- Bedford JM. Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv Biosci.* 1973; 10:145-55. PMID: 4618526.
- Bernardis LL, Patterson BD (1968) Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology 40(4): 527-528.*
- Bianchi VE (2019) The Anti-Inflammatory Effects of Testosterone. *Journal of the Endocrinology Society 3(1): 91-107.*
- Blancas FG, Almanza PJ, López RR, Alarcón AF, García MR, Cruz M (2010). La Obesidad como un proceso inflamatorio *Biol. Med. Hosp. Infant 67(2): 88-97.*
- Cabler S, Agarwal A, Flint M y du Plessis S S (2010). Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl 12(4): 480-489.*

- Cervantes M I, Arenas-Rios E, Leon-Galvan M A, Lopez-Wilchis R, Ambriz D y Rosado A (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med* 54(4-5): 196-204.
- Chandra A, Srinivasan KR, Jamal F, Mehrotra PK, Singh RL, Srivastav A. (2008) Post-translational modifications in glycosylation status during epididymal passage and significance in fertility of a 33 kDa glycoprotein (MEF3) of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Reproduction*. 135(6):761-70.
- Cooper TG (1998) Interaction of proteins with epididymal secretions. *J Reprod Fertil Suppl* 53,119–136.
- D. E. Paglia and W. N. Valentine (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal Lab Clinical Medicine* 70(1): 158–169.
- Dacheux JL, Dacheux F (2013) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. 147(2): 27-42.
- Dastig S, Nenicu A, Otte D, Zimmer A, Seitz J, Baumgart E, Lùers G (2011) Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochemistry and Cell Biology* 136(4): 413-425.
- De Maistre E, Bene M C, Foliguet B, Touati F y Faure G C (1996). Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm: a flow cytometric analysis. *Arch Androl* 37(3): 179-187.
- E. Rodríguez, R. Fierro, H. González, F. García, and R. Arenas, Boar sperm incubation with reduced glutathione (GSH) differentially modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in sperm, in vitro fertilization, and embryo development depending on concentrations. *Research in Veterinary Science*, vol. 135, no. 1, pp. 1–11, 2020.
- Ecroyd H, Asquith KL, Jones RC, Aitken RJ. (2004) The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Dev Biol*. 268(1):53-63.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales (2012) Subdirección de Comunicación Científica y Publicaciones del Instituto Nacional de Salud Pública.
- Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S (2012) The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Actas Urologicas Espanolas* 36(3):153–159.
- Fàbrega A, Puigmulé M, Yeste M, Casas I, Bonet S, Pinart E. (2011) Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology* 76(7):1356-66.
- Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene M C, Faure G C y Barbarino-Monnier P (1996). "Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry." *Arch Androl* 36(3): 187-196.
- Frederich R, Hu S, Raymond N, Pomeroy C. Leptin in anorexia nervosa and bulimia nervosa: importance of assay technique and method of interpretation. *J Lab Clin Med*. 139(2):72-9. doi: 10.1067/mlc.2002.121014. PMID: 11919545.

- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili E (1997) Distribution and Possible Novel Role of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Rat Epididymal Spermatozoa¹. *Biology of Reproduction* 57(6): 1502-1508.
- González S, Ávalos RA., Martínez GJ, Rosales TA, Herrera J. (2019). Sperm Morphophysiology in Different Sections of the Rooster Reproductive Tract. *Int. J. Morphol.* 37(3), 861–866.
- H. E. Chemes and V. Y. Rawe, The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis, *Cell Tissue Research*, vol. 341, no. 3, pp. 349–357, 2010.
- H. Y. Kang. Beyond the male sex hormone: deciphering the metabolic and vascular actions of testosterone. *Journal of Endocrinology*, vol. 217, no. 3, pp. 1–3, 2013.
- Hammoud A O, Gibson M, Peterson C M, Hamilton B D y Carrell D T (2006). Obesity and Male Reproductive Potential. *Journal of Andrology* 27(5): 619-626.
- Hernández C, Pérez C, Martínez M, Ortiz B, Martínez G. (2005) Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*; 24 (1): 21-27.
- Hernández R, Arenas R, Jiménez M, Cortés B, Montes S, Viguera VRM, Arteaga S. (2021) Postnatal cadmium administration affects the presence and distribution of carbohydrates in the sperm membrane during maturation in the epididymis in adult Wistar rats. *Reprod Fertil Dev.* 33(5):349-362.
- Huang YH, Chu ST, Chen YH. (1999) Seminal vesicle autoantigen, a novel phospholipid-binding protein secreted from luminal epithelium of mouse seminal vesicle, exhibits the ability to suppress mouse sperm motility. *Biochem J.* Oct 1; 343:241-8.
- Ibáñez, Claudia Patricia Bonilla, & Heredia, Luz Patricia Díaz. (2019). Características de las intervenciones realizadas con adolescentes en condición de sobrepeso y obesidad: una revisión integrativa. *Revista Cuidarte*, 10(3), e681. Epub December 20, 2019. <https://doi.org/10.15649/cuidarte.v10i3.681>
- Jeyakumar A, Fettman N, Armbrecht ES, Mitchell R, (2011) A systematic review of adenotonsillectomy as a risk factor for childhood obesity. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 144(2):154–158.
- Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Herrera J A, Garcii A, Betancourt M y Fierro R (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59(5-6): 1171-1180.
- Jia YF, Feng Q, Ge ZY (2018) Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urology* 18(1): 42.
- Kahn BE, Brannigan RE (2017) Obesity and male infertility, *Current Opinion in Urology* 27(5): 441–445.
- L. Zhang, S. Wu, Y. Ruan, L. Hong, X. Xing, and W. Lai, Testosterone suppresses oxidative stress via androgen receptor- independent pathway in murine cardiomyocytes. *Molecular Medical. Reproduction*, vol. 4, no. 6, pp. 1183–1188, 2011.

- Légaré C, Thabet M, Picard S, Sullivan R. Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biol Reprod.* 64(2):720-7. doi: 10.1095/biolreprod64.2.720. PMID: 11159378.
- Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*, 53(1), e13617. <https://doi.org/10.1111/and.13617>.
- León-Galvan M A, Fonseca T, López-Wilchis R y 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(1): 7-12.
- Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF (2016) Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49:5028.
- Lewis B, Aitken RJ. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl.* 22(4):611-22. PMID: 11451358.
- Lucio R A, Tlachi J L, López A A, Zempoalteca R y 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.
- Lue YH, Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity1. *Endocrinology* 140(4): 1709–1717.
- Ma, X., Pan, Q., Feng, Y., Choudhury, B., Ma, Q., Gagneux, P., and Ma, F. (2016). Sialylation Facilitates the Maturation of Mammalian Sperm and Affects Its Survival in Female Uterus. *Biol. Reprod.* 94(6), 123. doi:10.1095/BIOLREPROD.115.137810.
- Macêdo APA, Cordeiro GS, Santos LS, Santo DAE, Perez GS, Couto RD, Machado MEPC, Medeiros JMB. Murinometric measurements and retroperitoneal adipose tissue in young rats exposed to the high-fat diet: Is there correlation? *Braz J Biol.* 2021 Mar-May;81(2):246-250. doi: 10.1590/1519-6984.221405. PMID: 32428096.
- Magnusdottir E V, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M y Olafsdottir K (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 20(1): 208-215.
- Malafaia A B, Nassif P A, Ribas C A, Ariede B L, Sue K N y Cruz M A (2013). Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arq Bras Cir Dig* 26 Suppl 1: 17-21.
- Martini A C, Tissera A, Estofán D, Molina R I, Mangeaud A, de Cuneo M F y Ruiz R D (2010). Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and Sterility* 94(5): 1739-1743.
- Mendoza S, Arenas R, Chávez Z, León G, Rodríguez T (2020) Participación de los canales de Ca⁺ en la capacitación espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 7(3): 51-58.
- Micucci H A. and Camps E. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta Farm. Bonaerense* 1987; 6 (1): 35-54.
- N. Asadi, M. Bahmani, A. Kheradmand, and M. Rafieian- Kopaei, The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving

- it: a review. *Journal of Clinical Diagnostic Research*, vol. 11, no. 5, pp. IE01–IE05, 2017.
- N. O. Palmer, H. W. Bakos, T. Fullston, and M. Lane, “Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition,” *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 4, pp. 253–263, 2012.
- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, Padovani CR, Cicogna AC. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res*. 2008;41(3):253-9. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19399338.
- Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 Nov 9;2:75. doi: 10.1186/1477-7827-2-75. PMID: 15535886; PMCID: PMC533862.
- Oliveira PF, Sousa M, Silva BM, Monteiro MP, Alves MG (2017) “Obesity, energy balance and spermatogenesis.” *Reproduction* 153(6): 173–185.
- R. A. Hess, “Estrogen in the adult male reproductive tract: a review,” *Reproductive Biological Endocrinology*, vol. 1, no. 1, p. 52, 2003.
- R. Cathcart, E. Schwiers, and B. N. Ames, “Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay,” *Analytical Biochemistry*, vol. 134, no. 1, pp. 111–116, 1983.
- R. M. Luque, J. Cordoba-Chacon, A. I. Pozo-Salas et al. Obesity- and gender-dependent role of endogenous somatostatin and cortistatin in the regulation of endocrine and metabolic homeostasis in mice. *Science Reports*, vol. 6, no. 1, Article ID 37992, 2016.
- R. M. Viguera-Villaseñor, J. C. Rojas-Castañeda, M. Chávez-Saldaña et al., “Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats,” *Acta Histochemica*, 2011; vol. 113, no. 2, pp. 214–220.
- Reame V, Pytlowanciv E Z, Ribeiro D L, Pissolato T F, Taboga S R, Goes R M y Pinto-Fochi M E (2014). "Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status." *Biol Reprod* 91(6): 151.
- Ren J, Relling DP. Interaction between tumor necrosis factor- α and leptin-induced inhibition of cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes. *Cytokine*. 2005 Dec 7;32(5):213-8. doi: 10.1016/j.cyto.2005.09.010. Epub 2005 Nov 17. PMID: 16298137.
- Robaire B, Henderson NA. Actions of 5 α -reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 May 16;250(1-2):190-5. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.044. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16476520.
- Robaire B, Hamzeh M (2011) “Androgen action in the epididymis,” *Journal of Andrology* 32(6): 592–599.
- Rochwerger L and Cuasnicú PS (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after *in vitro* and *in vivo* capacitation. *Mol Reprod Dev* 31, 34–41.
- Rodríguez-Tobón, A. (2016). Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

- Rowley MJ, Teshima F, Heller CG. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril*. 21(5):390-6. PMID: 5508505.
- Ruiz-Valderrama, L., Posadas-Rodríguez, J., Bonilla-Jaime, H., Tarragó-Castellanos, M. D. R., González-Márquez, H., Arrieta-Cruz, I., González-Núñez, L., Salame-Méndez, A., Rodríguez-Tobón, A., Morales-Méndez, J. G., & Arenas-Ríos, E. (2022). Sperm Dysfunction in the Testes and Epididymides due to Overweight and Obesity Is Not Caused by Oxidative Stress. *International journal of endocrinology*, 2022, 3734572. <https://doi.org/10.1155/2022/3734572>
- Sallmén M, Sandler D P, Hoppin J A, Blair A y Baird D D (2006). Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. *Epidemiology* 17(5): 520-523.
- Sámano B, Rodríguez T, López T, Chávez Z, Arenas R (2020). La fosfatidilserina en el espermatozoide: marcador apoptótico e indicador de potencial fértil. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 7(3): 71-82.
- Shalgi R, Matityahu A, Nebel L. The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol Reprod*. 1986 Apr;34(3):446-52. doi: 10.1095/biolreprod34.3.446. PMID: 3008866.
- Sharma, V., Ichikawa, M., & Freeze, H. H. (2014). Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 220–228.
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E (2005) Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Human Reproduction* 20(2): 452–455.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*. 2007 Jul;9(4):483-91. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x. PMID: 17589785.
- Swan S H, Elkin E P y Fenster L (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives* 108(10): 961-966.
- Tajiri S, Fukui T, Sawaguchi A, Yoshinaga K. Changes in lectin-binding sites on epididymal cells during postnatal development of the mouse. *Okajimas Folia Anat* 88(4):153-7. doi: 10.2535/ofaj.88.153. PMID: 22645907.
- Tash JS, Bracho GE. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl*. 1994 Nov-Dec;15(6):505-9. PMID: 7721653.
- Teclé, E., and Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol. Reprod. Dev.* 82(9), 635–650. doi:10.1002/MRD.22500.
- Tourzani DA, Paudel B, Miranda PV, Visconti PE, Gervasi MG. Changes in Protein O-GlcNAcylation During Mouse Epididymal Sperm Maturation. *Front Cell Dev Biol*. 11;6:60. doi: 10.3389/fcell.2018.00060. PMID: 29942801; PMCID: PMC6004373.
- Toyonaga M, Kaihara A, Tsutsui T. The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides stored at room temperature. *J Vet Med Sci*. 2011 Oct;73(10):1395-8. doi: 10.1292/jvms.11-0052. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21697642.
- Tulsiani DR. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell*

- Endocrinol.* 2006 May 16;250(1-2):58-65. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.025. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16413674.
- Turner RM, McDonnell SM. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology*. 2003 Jun;60(1):1-10. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00956-1. PMID: 12620574.
- Valeri A, Mianne A, Merouze F, Bujan L, Altobelli A, Masson J (1993) Scrotal temperature in 258 healthy men, randomly selected from a population of men aged 18 to 23 years old. statistical analysis, epidemiologic observations, and measurement of the testicular diameters. *Progres en urologie: journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie* 3 : 444–452.
- Vernet P, Fulton N, Wallace C, Aitken RJ. Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 2001 Oct;65(4):1102-13. doi: 10.1095/biolreprod65.4.1102. PMID: 11566731.
- W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson et al., Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, vol. 12, no. 1, p. 223, 2015.
- WHO. (2015, enero 2015). Obesidad y Sobrepeso. Notas descriptivas extraído de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
- Wood LG. Diet, Obesity, and Asthma. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Nov;14(Supplement_5):S332-S338. doi: 10.1513/AnnalsATS.201702-124AW. PMID: 29161081.
- Wu, L., and Sampson, N. (2013). Fucose, Mannose, and b-N-Acetylglucosamine Glycopolymers Initiate the Mouse Sperm Acrosome Reaction through Convergent Signaling Pathways. *ACS Chem. Biol.* 9(2), 468–475. doi:10.1021/CB400550J.
- X. P. Cui, B. Y. Li, H. Q. Gao, N. Wei, W. L. Wang, and M. Lu, Effects of grape seed proanthocyanidin extracts on peripheral nerves in streptozocin-induced diabetic rats. *Journal Nutrition Science Vitaminology*, vol. 54, no. 4, pp. 321–328, 2008.
- Xin A, Cheng L, Diao H, Wu Y, Zhou S, Shi C, Sun Y, Wang P, Duan S, Zheng J, Wu B, Yuan Y, Gu Y, Chen G, Sun X, Shi H, Tao S, Zhang Y. Lectin binding of human sperm associates with DEFB126 mutation and serves as a potential biomarker for subfertility. *Sci Rep.* 2016 Feb 1;6:20249. doi: 10.1038/srep20249. PMID: 26832966; PMCID: PMC4735291.
- Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S (2006) Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproductive Fertilization Development* 18(6):647–653.
- 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(4): 477–479, 2005.
- Y. F. Jia, Q. Feng, Z. Y. Ge et al., Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis, *BMC Urology*, 2012 vol. 18, no. 1, p. 42.
- Y. F. Jia, Q. Feng, Z. Y. Ge et al., Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis, *BMC Urology*, vol. 18, no. 1, p. 42, 2018.
- Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. (2006) Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 16;250(1-2):98-105.

- Zhang L, Wu S, Ruan Y, Hong L, Xing X, Lai W (2011) Testosterone suppresses oxidative stress via androgen receptor- independent pathway in murine cardiomyocytes. *Molecular Medical. Reproduction* 4(6): 1183–1188.
- Zhu P, Ma Y, Huang Y (2004) Role of sperm DNA integrity in male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10(3): 222–226.

17. Productos derivados del trabajo de tesis doctoral

17.1. Artículo de investigación

Hindawi
International Journal of Endocrinology
Volume 2022, Article ID 3734572, 13 pages
<https://doi.org/10.1155/2022/3734572>



Research Article

Sperm Dysfunction in the Testes and Epididymides due to Overweight and Obesity Is Not Caused by Oxidative Stress

Lorena Ruiz-Valderrama ¹, Jaqueline Posadas-Rodríguez ¹, Herlinda Bonilla-Jaime ³,
María del Rosario Tarragó-Castellanos ³, Humberto González-Márquez ⁴,
Isabel Arrieta-Cruz ³, Leticia González-Núñez ³, Arturo Salame-Méndez ³,
Ahlezer Rodríguez-Tobón ⁶, José Guadalupe Morales-Méndez ⁷,
and Edith Arenas-Ríos ⁵

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad y Estado de México, Mexico

²Maestría en Biología de la Reproducción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

³Departamento de Biología de La Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

⁴Departamento de Ciencias de La Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

⁵Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátrica, Ciudad de México 10200, Mexico

⁶Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

⁷Ciencias Físicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

Correspondence should be addressed to Edith Arenas-Ríos; editharenas2000@yahoo.com.mx

Received 22 March 2022; Revised 5 August 2022; Accepted 11 August 2022; Published 10 October 2022

Academic Editor: Muhammad Faruq Akhtar

Copyright © 2022 Lorena Ruiz-Valderrama et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Obesity is a condition that has been linked to male infertility. The current hypothesis regarding the cause of infertility is that sperm are highly sensitive to reactive oxygen species (ROS) during spermatogenesis in the testes and transit through the epididymides, so the increase in ROS brought on by obesity could cause oxidative stress. The aim of this study was to evaluate whether the activity of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPX) is capable of counteracting oxidative stress in sperm. The male Wistar rat was used as an overweight and obesity model, and analysis of fertility in these groups was carried out including the control group. Serum testosterone levels were determined, and the scrotal fat, testes, and epididymides were extracted. The epididymides were separated into 3 principal parts (caput, corpus, and cauda) before evaluating sperm viability, sperm morphology, damage to deoxyribonucleic acid of the sperm, and ROS production. The protein content and specific activity of the three enzymes mentioned above were evaluated. Results showed a gain in body weight and scrotal fat in the overweight and obese groups with decreased parameters for serum testosterone levels and sperm viability and morphology. Fertility was not greatly affected and no DNA integrity damage was found, although ROS in the epididymal sperm increased markedly and Raman spectroscopy showed a disulfide bridge collapse associated with DNA. The specific activities of CAT and GPX increased in the overweight and obesity groups, but those of SOD did not change. The amounts of proteins in the testes and epididymides decreased. These findings confirm that overweight and obesity decrease concentrations of free testosterone and seem to decrease protein content, causing poor sperm quality. Implications. An increase in scrotal fat in these conditions fosters an increase of ROS, but the increase of GPX and CAT activity seems to avoid oxidative stress increase in the sperm without damaging your DNA.

1. Introduction

Obesity is a global health problem that has been increasing in recent years. It is associated with hypertension [1], cancer [2], diabetes [3], metabolic disorders [4], and male infertility [5]. Infertility due to a high body mass index (BMI)—above 25–30 kg/m²—is associated with decreased sperm concentration and viability, increased morphological abnormalities [6, 7], hormonal alterations [8, 9], modified GnRH pulsatility, altered leptin, insulin, cholesterol, and triglyceride levels, high estradiol levels, and decreased testosterone (T) concentrations [8–10]. These effects alter testicular and epididymal functions and T-dependent organs [11, 12], since one of testosterone's main functions is to induce protein synthesis for the processes of spermatogenesis and sperm maturation and survival [10, 11, 13]. One of the changes in epididymal maturation is the oxidation of SH groups to S-S, generally by ROS [14].

Sperm are at serious risk from the moment they form in the testicles and during transit through the epididymides, since the processes in which they participate are highly sensitive to ROS, especially superoxide and hydrogen peroxide [15], substances that can cause membrane damage and DNA fragmentation in sperm.

Obesity can trigger systemic oxidative stress [16] in the testicles and sperm that can reduce T synthesis, spermatogenesis, and sperm quality [17–21]. In addition, higher amounts of adipose tissue in the scrotal area have been associated with increased oxidative stress [22]. Oxidative stress is caused by an imbalance between ROS production and the activity of three anti-ROS enzymes: SOD, CAT, and GPX. When the amounts of ROS are excessive, cell damage ensues [23]. The presence of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPX in the reproductive tract of rats has been reported, with high concentrations of GPX in the testes upon reaching sexual maturity but low levels in the epididymides. However, it has been suggested that these enzymes also participate in spermatogenesis and protect the spermatozoa during their transit through the epididymides, from *caput* to *cauda* [12, 24, 25].

SOD is found in extracellular tissues and fluids from the epididymides, prostate gland, and bladder of different animal models (mouse, pig, and bear) [26–28]. In the rat's epididymides, increased SOD and GPX activity has been observed in the *caput* and *cauda* [17, 19].

GPX is one of the most important enzymes in the antioxidant system of the male reproductive tract because its concentration in the testicular epithelium is higher than that of the other antioxidant enzymes [29]. Especially in the epididymis, GPX (snGPX4 and GPX5 in rodents or snGPX4 and PRDX in humans) is very important to achieve optimal sperm maturation [30]. In summary, oxidative processes regulated by GPX are necessary to generate a properly condensed mature sperm nucleus [7]. In addition, as many as 4 isoforms of GPX are associated with the epididymal fluid [31]. GPX-1 and GPX-3 are present in the testes and epididymides but in the latter are expressed mainly in the *cauda* [1, 32]. GPX 1, 3, 4, and 5 are all found in the epithelial cells of the epididymides, luminal fluid, and sperm [31, 33]. GPX-

4 is influenced by testosterone since in rat testes it is expressed after puberty and is necessary for germ cell differentiation; hence, it may be involved in spermatogenesis [34].

CAT activity has been found in the *caput* and *cauda* of the epididymis [19]. It is also expressed in Leydig, peritubular myoid, and Sertoli cells and in spermatogonia, though expression is low in spermatocytes and spermatogonia during spermatogenesis [35–37]. It is present, as well, in the epithelium of the epididymis, though at very low levels, and in spermatozoa [19].

Reports in humans indicate the presence of antioxidant enzymes in semen and have found that when the normal concentrations of these enzymes are altered, sperm parameters (motility, viability, and acrosomal reaction capacity) are affected [38–40].

The condition of obesity is defined as a state of acute chronic inflammation that favors an oxidizing environment, so it has been directly associated with infertility in obese individuals [41, 42]. Body weight and length are used to determine obesity in rats by calculating the Lee index, which is analogous to the BMI in humans [8]. This index makes it possible to estimate body composition in rats [43]. It categorizes values <0.300 as normal weight but values >0.300 as obesity [6, 43–47].

Given this background, the aim of this work was to determine whether some male fertility problems that occur in overweight and obesity conditions are attributable to an alteration in the activity of the antioxidant enzymes SOD, GPX, and CAT in the testes and epididymides.

2. Materials and Methods

All experiments were conducted according to the Mexican Guidelines for Animal Handling and Protection (NOM-062-ZOO-1999). The rats were obtained from the closing breeding colony at the Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Proper animal handling was performed in accordance with the Ethical, Science, Communication, and Research specifications established by the Division of Biological and Health Sciences, UAMI (dictum: 1851), and the Organization for Animal Health (OIE) guidelines stipulated in the Terrestrial Animal Health Code, chapter 7.8.

2.1. Animals. The study was performed with 3-month-old male Wistar rats which were housed individually in 6 mm crystal acrylic boxes with galvanized and stainless steel lids, a parasite-free pine sawdust bedding and a 250 ml polypropylene drinker were used under controlled light conditions with ad libitum access to regular or high-fat-diet feed and tap water. The animals ($n = 6$ rats per group) were assigned to one of three groups (1) control (CN: regular chow; 4.5% lard); (2) overweight (OW: high-fat diet; 10% lard); and (3) obese (OB: very high-fat diet; 60% lard) (LabDiet and TestDiet, St. Louis, MO). All animals had free access to food

for four weeks. Body weight was measured every day at the same hour. It is important to mention that the initial weight of the animals used, which determine that they have reached adulthood and are in a normal weight condition, was 310 ± 5.066 . The measures used to calculate OW or OB were body weight (g), snout-anus length (cm), and the Lee Index (cube root of body weight (g) divided by the snout-anus length (SAL) (cm)) [43].

2.2. Fertility Analysis. Each male in each group mated with two proven fertile females. The test was performed before and after inducing overweight and obesity, with each male being its own witness. All males were sexually skilled, and all females were in estrus. The intercourse schedule was always between 3 and 4 in the afternoon, and mating was confirmed by the presence or absence of the vaginal plug. After successful mating, males were separated, and that day was considered as day zero of gestation (GD 0) for the females and count 21 for spontaneous delivery. Litter size and sex of the progeny were examined 4 days after birth [48].

At the end of the four-week test period, the rats were euthanized by decapitation and their organs dissected. The fat located around the testis and mesenteric fat was weighed. Blood was collected and centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min. Serum was stored at -20°C for later processing. The fat surrounding the epididymides (right and left) was removed and weighed. The epididymides were regionalized into three sections: caput, corpus, and cauda, and each section was divided into two parts, one of which was squeezed to obtain spermatozoa to evaluate viability and morphology and determine DNA damage and reactive oxygen species (ROS). Another section was weighed, frozen in liquid nitrogen (-196°C), and used for the enzymatic determination.

The segments of the epididymides were thawed to 4°C in 10 volumes of cold HEPES buffer (0.1 mol/L, pH 7.4, H0887 Sigma Darmstadt, Germany) and homogenized in a Potter-Elvehjem type, glass-glass homogenizer. The corresponding segments of both epididymides from each rat were always homogenized together. The homogenates obtained were centrifuged for 10 min at $5000 \times g$. Precipitates were discarded, and all enzymatic activity was measured using the supernatants.

2.3. Testosterone Serum Levels. Testosterone levels were measured by radioimmunoassay (RIA) using a commercial kit TKTT-1 (6550-01-288-7029, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Los Angeles, CA). The procedure used antibody-coated tubes in which ^{125}I -labeled testosterone competed with free testosterone for antibody sites in the sample. After incubation, separation of bound T was achieved by decanting. The tubes were then counted in a gamma counter (Cobra, Packard, USA), and the counts were inversely related to the amount of T present in the serum. Total quantities of T in (pg/ml) were determined by comparing

counts to a calibration curve. Specific activity was 4 μCi . The sensitivity limit was 0.0045 ng/ml. All measures were made in duplicate.

2.4. Sperm Parameters. Each region of the epididymides was rinsed with Ringer physiological solution (95 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.7 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.19 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.19 mM KH_2PO_4 , Sigma Aldrich, México) at 37°C and squeezed with small tweezers to remove the spermatozoa. 10 μl of the solution was placed on a glass slide stained with eosin-nigrosin for 1 minute at 37°C . Approximately 100 cells were counted using a light microscope with a 40X objective (Optisum, New York, USA).

2.5. Analysis of DNA Integrity. Samples of spermatozoa in a physiological solution were used to evaluate DNA integrity. Sperm smears were spread on pre-cleaned slides and allowed to air dry. The slides were fixed with Carnoy's solution (methanol/glacial acetic acid 3/1; 64-56-1, QUÍMICA UNIVERSAL LTDA, Santiago, Chile/64-19-7, ISQUISA CORPORATIVO, Córdoba Veracruz, México) for 24 hours. Once dry, they were stained with freshly prepared acridine orange stain (65-61-2, Acridine Orange solution, Sigma Aldrich, México) for 5 minutes and then rinsed with distilled water. The samples were read on the same day under epifluorescence microscopy (490 nm) with a 100X objective. One hundred cells were counted, observing the number of green and red fluorescing sperm heads.

2.6. Measurement of ROS Production. ROS production was determined by flow cytometry analysis (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) using dichlorofluorescein diacetate (DCF, 4091-99-0, Sigma Aldrich, México), as described previously [24, 49, 50]. In brief, samples with 0.5×10^6 spermatozoa from each group were incubated with 1 ml of Ringer solution and 50 μl of DCF at $32 \mu\text{M}$ for 15 minutes under dark light at room temperature and then centrifuged for 5 min at $1500 \times g$. The pellet obtained was dissolved in 1 ml of PBS and analyzed by CELLQUEST software.

2.7. Antioxidant Enzyme Activity. Before determining GPX (glutathione peroxidase), SOD (superoxidase dismutase), and CAT (catalase) activity, the organs were thawed to 4°C in 10 volumes of cold HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) and homogenized in a Potter-Elvehjem type, glass-glass homogenizer. The homogenates obtained were centrifuged for 10 min at $5000 \times g$. The precipitates were discarded, and all enzymatic activity was measured in the supernatants. The assays to quantify enzymatic activity were done as described previously [15].

(i) GPX (EC.1.11.1.9) activity was determined at 25°C using Ransel kits (RS504, Randox Laboratories

Table 1: Effect of overweight and obesity on the fertility of Wistar rats.

	Control	Overweight	Obesity
Total pups	11,600 ± 1,020	7,800 ± 1,470*	9,800 ± 0,748
Number of males	7,400 ± 1,356	3,400 ± 1,020*	4,400 ± 0,490**
Number of females	4 ± 1,225	4,400 ± 0,490	5,400 ± 0,490

*Indicates significant differences between the control vs. overweight group.
**Indicates significant differences between the control vs. obesity group.
P < 0.05.

limited, Crumlin, Northern Ireland) to determine NADPH oxidation at 340 nm for 5 min [51].

(II) SOD (EC.1.15.1.1) activity was measured using RANSOD kits (SD125, Bandox Laboratories) at 37°C. Absorbance was monitored at 505 nm for 3 min.

(III) CAT (EC.1.11.1.6) activity was determined at 25°C after pretreatment of samples with ethanol (64-17-5, 0.01 ml EtOH/ml of homogenate) and Triton X-100 (1.0%) (w/v final concentration; 9036-19-5, EMPROVE EXPERT Ph Eur, Sigma Aldrich, México) in an ice bath [52]. After incubation, the amount of H₂O₂ (7722-84-1, Millipore Sigma, Darmstadt, Germany) that remained in the mixture was determined by measuring unreacted KMnO₄ (7722-64-7, Merck, Darmstadt, Germany) at 25°C and 480 nm.

Enzymatic activity was expressed as follows: for superoxide dismutase, in USODs (one unit of activity defined as the amount of enzyme that inhibited the rate of formation of the formazan dye by 50%) [53]; catalase, as the change in k (the constant rate of the first-order reaction) [54]; and glutathione peroxidase, as AGPX (nmol NADPH oxidized per minute).

2.8. Quantification of Total Soluble Proteins. Total protein content was measured using a commercially available bi-cinchoninic acid protein assay (23225, Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). All assays were run in duplicate using single and double amounts of homogenate (6 testicles and 6 epididymides were used for the homogenate) [15].

2.9. Raman Spectroscopy. Sperm were subjected to a density gradient centrifugation for 5 minutes at 1500 g. After removal of the supernatant, the pellet was resuspended in physiological Ringer solution pH 7.2. The sperm were fixed with paraformaldehyde 2%. The samples were spread on slides and allowed to air dry. RAMAN evaluation were performed on a T64000 Horiba-Jobin-Yvon Lab Ram HM 800 Micro Raman System (HORIBA, Kyoto, Japan) triple spectrometer using a laser line at 532.1 nm produced by a Verius laser. A confocal microscope Olympus, BX40 (Edison, NJ, USA), with ×100 objective was used at a power closed to 7 mW on the sample, resulting in a typical coverage of about 1 sperm cell. 20 accumulations of 10 s per spectrum were performed in order to

improve the signal to noise ratio. The spectra were calibrated using the 521 cm⁻¹ line of monocrystalline silicon. Telfex-Plancarte et al., Nazarenko et al.

2.10. Statistical Analyses. Data are presented as mean ± standard deviation (mean ± SD), analyzed using omnibus normality and modified Levene equal variance tests and a one-way analysis of variance (ANOVA). Parametric Tukey–Kramer or non-parametric Kruskal–Wallis tests were applied with their respective post hoc tests. A probability value of P ≤ 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with NCSS 2007 DATA Software (Kayville, UT, USA).

3. Results

3.1. Fertility Analysis. We also observed that control rats produced 11.8 ± 1.6 pups per litter, while the 10% lard group produced only 3 ± 3 pups per litter. Surprisingly, in 60% rats, the number of pups per litter was closer to the control (10 ± 0 pups per litter). Gender distribution in the control litter was 3.8 ± 1.3 females and 7.8 ± 2.2 males, while that in the 10% lard group was 2 ± 2 females and 1 ± 1 males. Finally, that in the 60% lard group was 5.5 ± 0.5 females and 4.5 ± 0.5 males (Table 1).

3.2. Weight Gain, Scrotal Fat Gain, and Serum Testosterone Levels. Body and scrotal fat weight measurements are shown in Figure 1. Testosterone serum levels shown in this figure confirm that gaining weight and fat around the gonads is negatively correlated with testosterone levels. The OW and OB groups had weight increases of 24.17% and 51.12%, respectively, with respect to CN. The weight increase in OB was 29.84% greater than that in OW which also shows that the OW and OB groups had increases in scrotal fat compared to CN (Figure 1). The Lee index for the experimental groups fed regular chow and the two hyperlipidemic diets was 0.329 for OW, 0.339 for OB, and 0.2915 for CN.

Serum testosterone levels (Figure 1) in the OW and OB groups (0.635 pg/ml ± 0.27; 0.502 pg/ml ± 0.15, respectively) decreased significantly compared to CN (1.078 pg/ml ± 0.21).

3.3. Quantification of Proteins in the Testicles and Epididymides. Protein concentrations in the rats' testicular and epididymal tissue (Figure 2) for groups CN, OW, and OB showed that OW and OB had lower concentrations than CN.

3.4. Specific Activity of Proteins in the Testicles and Epididymides. Results for the specific activity (SA) of the antioxidant enzyme SOD in the testes (Figure 3(a)) of the rats in the CN, OW, and OB groups showed an increase in the testicular tissue for OW and OB compared to CN. SA was greater in the caput and cauda than the corpus, but the difference between caput and corpus was not significant. In all three regions, the SA of SOD was greater in OW and OB than CN. Regarding the SA of CAT in the testicular tissue (Figure 3(b)) for the three study groups, OW and OB

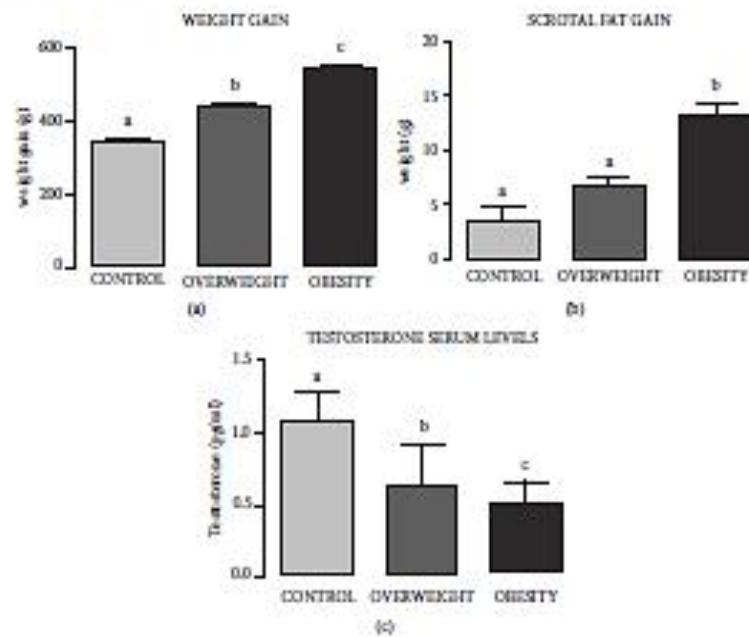


Figure 1: Weight gain, scrotal fat gain, and testosterone serum levels in Wistar rats fed for four weeks with regular chow (control group (CN)) or hyperlipidemic diets with 10% (overweight group (OW)) and 60% fat (obesity group (OB)). Bars represent mean \pm SD. Letters indicate significant differences between groups, $P < 0.05$ (CN vs. OW vs. OB).

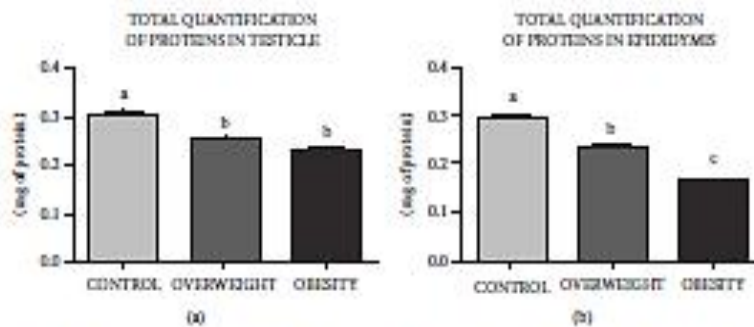


Figure 2: Amount of total soluble protein in testis and epididymis in Wistar rats fed for four weeks with regular chow (control group (CN)) or hyperlipidemic diets with 10% (overweight group (OW)) and 60% fat (obesity group (OB)). Bars represent mean \pm SD. Letters indicate significant differences between groups, $P < 0.05$ (CN vs. OW vs. OB).

showed increases with respect to CN. Finally, the SA of the GPX enzyme in the testicular tissue of the rats (Figure 3(c)) increased in OW and OB compared to CN.

With respect to the epididymal tissue, there was greater SA in the caput and cauda than the corpus (Figures 3(d)–3(f)), with no significant difference between the caput and corpus. In the three regions of the epididymides, the SA of SOD was greater in OW and OB than CN. The SA of CAT in

the epididymal tissue (Figure 3(c)) also increased in OW and OB compared to CN. In addition, the caput, corpus, and cauda all showed increases in the SA of CAT in OW and OB compared to CN. In this case, the caput and cauda had higher SA of CAT than the corpus. Finally, the epididymal tissue (Figure 3(f)) showed greater SA of GPX in OW and OB than CN, with the caput and cauda having greater SA of GPX than the corpus.

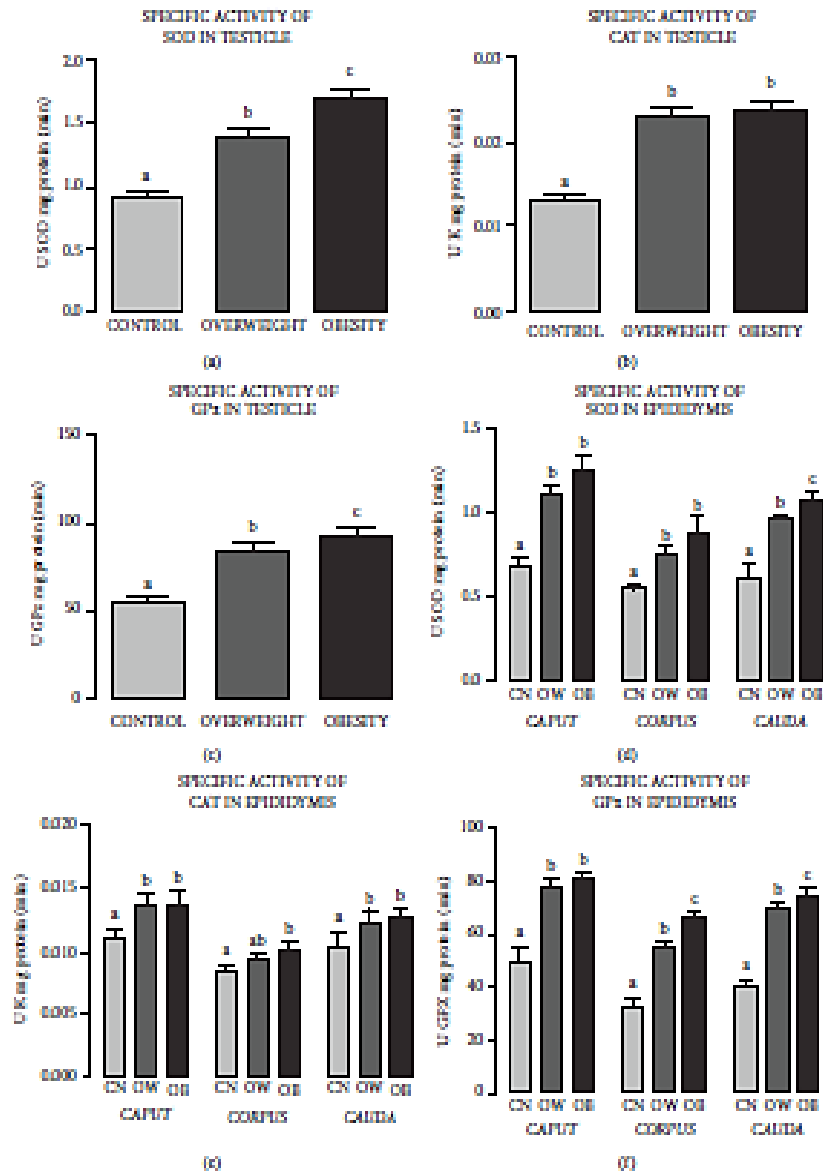


Figure 3: Specific activity (SA) of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in the testes and epididymides of Wistar rats fed with regular chow (control (CN)) or hyperlipidemic diets with 10% or 60% fat (the overweight (OW) and obesity (OB) groups), respectively. Specific activity is expressed in mg of protein/min. Letters indicate significant differences between the study groups ($P < 0.05$) (CN vs. OW vs. OB). Also shown are the SAs of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) (a), catalase (CAT) (b), and glutathione peroxidase (GPx) (c) in the testes, all presented as mean \pm SD.

Table 2: Sperm parameters.

Experimental group	Morphological abnormality of the sperm					
	Viability	Amorphous head	Angle middle piece	Asymmetric middle piece	Rolled flagellum	Angled flagellum
Control	96 ± 3 ^a	1 ± 1 ^a	7 ± 6 ^a	0 ^a	13 ± 2 ^a	2 ± 2 ^a
Overweight	70 ± 10 ^b	2 ± 1 ^b	19 ± 9 ^b	1 ± 1 ^{ab}	45 ± 17 ^b	14 ± 15 ^{ab}
Obesity	52 ± 20 ^b	3 ± 1 ^b	34 ± 9 ^b	1 ± 1 ^b	54 ± 14 ^b	22 ± 20 ^b

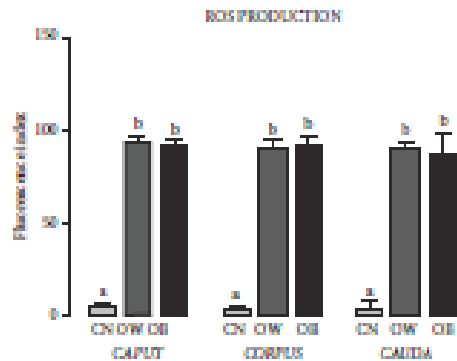


FIGURE 4: ROS production in the plasmatic membrane of the spermatozoa in the caput, corpus, and cauda regions of the epididymides of the rats fed for four weeks with regular chow (control group (CN)) or hyperlipidemic diets (overweight (OW) and obese (OB) groups). Bars represent mean ± SD. Letters show significant differences between the groups, $P < 0.05$ (CN vs. OW vs. OB). Fluorescence index = (average) (number of events).

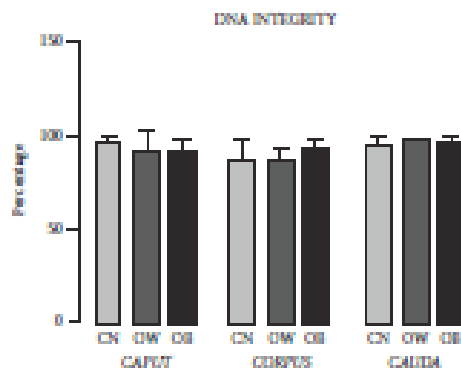


FIGURE 5: Sperm DNA integrity in the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis of Wistar rats fed for four weeks with regular chow (control group (CN)) or hyperlipidemic diets (overweight (OW) and obese (OB) groups). Bars represent mean ± SD.

3.5. Sperm Parameters. Table 2 represents the sperm parameters evaluated for the three groups of Wistar rats (CN, OW, and OB); viability and morphological abnormalities (amorphous head, angled middle piece, asymmetric middle

piece, angled flagellum, rolled flagellum, and coiled). The OW and OB groups had decreased viability and an increased number of abnormalities compared to CN. There was also an increase in morphological abnormalities (angled middle piece, angled flagellum, and coiled) in the sperm in OW and OB compared to CN.

Table 2 shows sperm parameters in Wistar rats fed with regular chow (CN group) or hyperlipidemic diets with 10% or 60% fat (OW and OB groups). Results for the three study groups are shown as mean ± SD. Letters indicate significant differences between the groups, $P < 0.05$ (CN vs. OW vs. OB).

3.6. Production of Reactive Oxygen Species. Figure 4 shows the results for the peroxide content determined in the epididymal sperm obtained from the caput, corpus, and cauda regions of the rats in the three study groups (CN, OW, and OB). The amounts of peroxides present in OW and OB were larger than those in CN.

3.7. Sperm DNA Integrity. Figure 5 shows that there is no damage to the integrity of the DNA in the spermatozoa obtained from the three regions of the epididymis observed in the OW and OB groups compared to CN.

3.8. Raman Spectroscopy. The Raman spectra results are shown in Figure 6. The spectrum of the control sample displays many bands corresponding to lipids, proteins, and the nucleus of the sperm head (Table 3). Many of these bands have an intensity comparable to the S-S stretching of the disulfide bridge at 501 cm^{-1} . The most important change we observed in the sperm spectra of rats fed with 10 and 60% extra fat was the collapse of the bands, mainly those of DNA and proteins, and lipid bands too (1059 and 1128 cm^{-1}) (Figures 6(b) and 6(c)).

4. Discussion

Several studies have reported an association between obesity and reduced fertility including indications of an inverse relationship between the BMI and fertility [55, 56]. Our work found that high-fat diets induced an increase in body weight, as several other researchers have reported [18, 57–59], together with reduced sperm quality that was dependent on the diet administered.

Most of those studies, however, focused only on OB animals. To the best of our knowledge, few have analyzed overweight (OW) animals. Using a rat model with a 10% hyperlipidemic diet, Wood *et al.* [20] determined weight

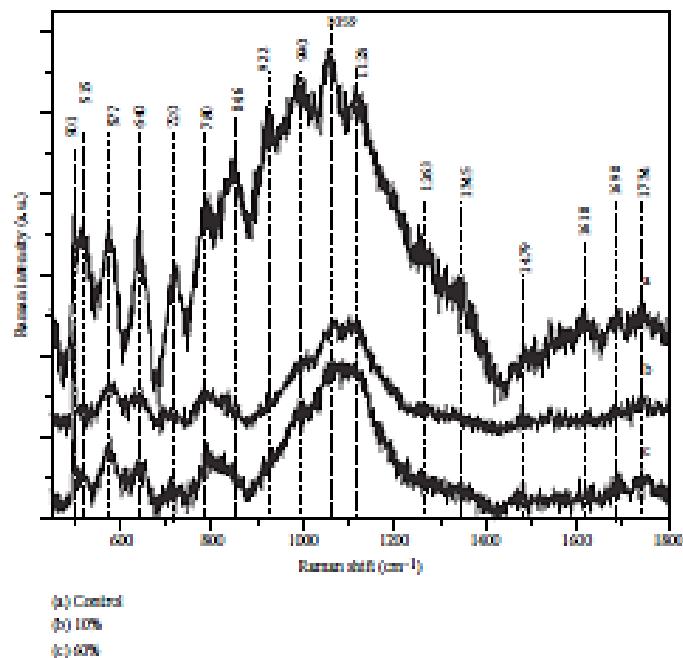


Figure 6: Vibrational information of the chemical bonds of the molecules of the sperm head in Wistar rat in the following groups: (a) control (CN) regular chow, (b) 10% (OW) (c) 60% (OB) high chow groups.

Table 3: Frequencies of the main peaks observed from the spermatozoa head.

Raman peaks (cm^{-1})	Assignment
501	S-S disulfide stretching band
515	Phosphatidylinositol
577	Tyr, C, G
640	C-S stretching
720	DNA
780	DNA
846	Tyr
922	C-C stretching ring
990	C-C stretching
1059	C-N, C-C stretching lipids, PO_2 stretching
1128	C-C stretching lipids
1263	AH, T, A
1345	A, G
1479	CH_2 deformation
1618	Tyr, try, phe C=C
1690	AI
1734	C=O

increases of 10–25% compared to a group that received a balanced diet. This weight gain indicates an overweight condition or moderate obesity. The rats in their study that received a hyperlipidemic diet with 60–75% fat, in contrast, showed a weight increase greater than 40%, indicative of a state of severe obesity [57, 58].

In our study, the rats with the high-fat diet (10%) showed a body weight increase of 24.17%, which was considered as OW. The rats that received the 60% very high-fat diet for four weeks increased their weight by 51.12% compared to the CN group. This was classified as an OB condition. These data agree with the classification presented in Wood *et al.* [20]. However, as in humans, the body mass index is only a reference, their muscular constitution also influences. In the same way, the Lee index is also a reference.

Several authors have reported Lee index values as indicators of obesity that vary with the strain and age of the animal, as well as the time of administration of the diet. Unfortunately, these studies do not provide data regarding OW. Viguera-Villasenor *et al.*, for example, administered a hypercaloric diet to 3 month-old Sprague-Dawley rats for 30 days. They reported a Lee index value of 0.3, while the study by Leopoldo *et al.* calculated a Lee index of 0.7 in 30 day-old male Thayer mice fed a hyperlipidemic diet for 15 weeks. In that case, the Lee index was similar in the OW and OB groups (OW = 0.329, OB = 0.339) and insufficient to characterize or differentiate OW and OB [44].

Some studies suggest the importance of considering the correlation between the Lee index and animals' fat mass in order to estimate the body index in rats [44, 46]. Those reports suggest that the Lee index alone should not be used as a reference to determine obesity since in some cases there

is no direct correlation between body weight and this index [60]. This occurred in our results, where the OW and OB rats had similar Lee indices, while differential body weight and scrotal fat were observed only in the OB group.

We found, as well, that the high-fat diet (10%) was sufficient to alter spermatogenesis, as has been reported previously by Viguera et al. and Yang. This process is affected by the degree of obesity [61]. A similar effect was observed in the OB rats as they showed significantly lower sperm quality and an even larger increase in sperm abnormalities than the OW subjects.

The present study found that both OW and OB (fed high-fat diets, respectively) presented decreased testosterone levels, as has been reported for OB animals in various other studies [47, 62–64]. These reduced T levels were related to the degree of obesity and to an increase in estrone and estradiol levels due to peripheral aromatization of androgens that induces endocrine dysregulation, leading to low T levels [65, 66].

Interestingly, the OW rats also had reduced T concentrations, as has been reported in humans with OW and OB [67]. This decrease in T affects the functionality of the testes and epididymides, both of which are T-dependent organs [14] that function to induce protein synthesis for the various processes involved in spermatogenesis and sperm maturation and survival [14, 68]. In the present case, the OW and OB rats also had a reduction in total protein quantification in both the testes and epididymides that could impact sperm morphology and generate changes in spermatogenesis and epididymal sperm maturation that would result in poor sperm quality [5, 34, 69–71] induced by the reduction in protein synthesis caused by low T concentrations [2, 72].

Several studies have reported that obesity can affect sperm quality. It has previously been reported that at least two generations of males that come from obese parents (the result of consuming a hypercaloric diet) present a large number of chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes, and behavioral and reproductive disorders [73, 74]. However, in the present work, an immediate effect is observed, presenting a decrease in the size of the litters, of overweight parents, in addition to a lower proportion of males, which could be explained by a greater vulnerability in male gametes to the effects caused by overweight and obesity. We observed that our OW and OB rats presented reduced sperm quality. Certain mechanisms have been shown to participate in sperm quality due to obesity, including a malfunctioning of the hypothalamic-pituitary-testicular (HPT) axis, low FSH and LH concentrations [75], and alterations in SHBG synthesis [76] that cause an increase of free testosterone, making it available for conversion to E2, a hormone that inhibits GnRH secretion in the hypothalamus [49]. This reduces the concentration of T which, in turn, affects the functionality of the Leydig cells [11]. Furthermore, the accumulation of saturated fats in testicular cells like the Sertoli cells alters spermatogenesis due to modifications of the composition of fatty acids in the membrane [11, 77].

It is important to note that these alterations in sperm quality were significantly greater in the OB group than the OW rats, a difference that could be due, as well, to the reduction in T, which alters sperm differentiation and survival [17]. The increase in scrotal fat may also play a role, as it was significantly higher in the OB rats than the OW group. This accumulation of fat increases scrotal temperature in the areas surrounding the testicles and epididymides, conditions that generate scrotal hyperthermia, which is a risk factor for male fertility and has a deleterious effect on spermatogenesis [78, 79].

In this regard, studies have suggested that the excessive presence of fat around the testicles and epididymides in animal and human models of obesity can alter the temperature of these organs, triggering a process likely developed by an increase in the adipose tissue that covers the pampiniform plexus and affects the testicular cooling system [80]. This increase in scrotal temperature induces a series of alterations at the testicular level that are associated with increased apoptosis and a decrease in the number of spermatozoa in the germinal epithelium [47, 81].

Obesity can also cause systemic oxidative stress [13] in the testicles and sperm that reduces testosterone synthesis, spermatogenesis, and sperm quality [4, 82]. Increased adipose tissue in the scrotal area has also been associated with greater oxidative stress that can impact testicular and epididymal functioning [83–86] and sperm quality. In the event of excessive oxidative stress, this nuclear maturation can be impaired, resulting in excessive protamine disulfide bridges, abasic sites (which in themselves do not constitute a DNA break), cross-linking of nuclear proteins, and finally DNA breaks (only when oxidative stress is severe) [87–89]. Sperm are highly sensitive, especially to superoxide and hydrogen peroxide [3, 15, 89], so exposure can generate membrane damage and DNA fragmentation. Potential mechanisms that explain how ROS cause DNA damage are (1) the generation of new molecules from lipids degradation, specifically, malondialdehyde that cause oxidation of the nitrogenous bases of the DNA to produce 8'-hydroxyguanosine (promutagen) or (2) direct interaction of ROS with DNA inducing breaks in one or two chains. However, our results obtained with acridine orange do not expose breaks of DNA chains. Nevertheless, the damage to sperm in overweight and obesity conditions observed through RAMAN spectroscopy, include disulfide bonds collapse of proteins associated with DNA. The use of Raman spectroscopy allowed us to perform an *in vivo* analysis of the sperm plasma membrane and determine if there is damage to it or if the damage exists at the genome level of sperm from rats exposed to a high-fat diet.

The use of Raman spectroscopy allowed us to perform a *live* analysis of the plasma membrane and determine whether there is damage to it or to at the genome level of the spermatozoa of rats exposed to a high-fat diet. It is well known that disulfide bridges of DNA associated proteins in rats that were subjected to a high-fat diet (10% and 60%) showed a similar spectrum (501 cm^{-1}) relative to animals that were fed a control (low fat) diet. It makes us think that

the S-S bonds of the proteins that maintain the adequate packaging of the DNA chain in the sperm are not affected. However, the decrease in the intensity of the DNA spectrum (720–780 cm^{-1}), although it may indicate damage, does not seem to be through ROS since it has been reported that ROS oxidize cysteine residues forming disulfide bridges, and according to what was obtained in the present work, there is a collapse in disulfide bridges which may indicate that cysteine residues remain in a reduced state.

The results of this study show that rats with OW and OB present increases in the activity of the enzymes SOD, CAT, and GPX that are similar in the testes and epididymides, together with an increase in ROS in the epididymis, though this did not affect the DNA integrity.

Only the OB rats presented an increase in scrotal fat compared to the CN group, so this increase in the activity of antioxidant enzymes could be due to the decrease in T that was observed in both groups. In this regard, several researchers have reported that testosterone plays a pro-oxidant role and induces oxidative stress in mammalian tissues [90]. However, there are also reports that T has an antioxidant effect on the human prostate gland [91] and the nervous system in rats [16, 92]. Low T levels increase oxidative stress [93] and lead to a redox imbalance [64].

In this regard, Chooibinsri et al. reported that administering T to mice that presented decreased sperm quality and increased oxidative stress induced by spinal cord injury reduced malondialdehyde levels and SOD and GPX activity in the testicles. In addition, recent data suggest that T exerts antioxidant effects, particularly on the aging process, through an AR-independent mechanism. Though still controversial, the proposed mechanism is based on the conversion of testosterone to estradiol that, in turn, increases the levels of antioxidant enzymes and reduces oxidative stress by genomic and non-genomic mechanisms [28, 94, 95].

Some data show that testosterone produced by aromatization via 17 β -estradiol positively regulates the expression and activity of the antioxidant enzymes SOD and GSH-PX while decreasing lipid peroxidation (a marker of oxidative damage) in isolated adult murine cardiomyocytes [21, 96].

5. Conclusions

The testes and epididymides are T-dependent organs, so the decrease in testosterone concentrations due to the effect of OW and OB can induce oxidative stress and an increase in the activity of antioxidant enzymes that counteract this process. By being able to contain this process, the DNA is not affected. So, we think that other physiological processes dependent on testosterone may be affected by these conditions of OW and OB, avoiding optimal functionality of the sperm in cases of infertility.

Data Availability

The data that support this study will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Authors' Contributions

ARE designed the study. ARE, BJH, ACL, TCR, and GMH coordinated the study and participated in the critical revision of the manuscript. PRJ, RTA, MMJ, GNL, and SMA carried out the assessment of some evaluations, conducted statistical data analysis, and drafted the manuscript.

Acknowledgments

Special thanks are due to the Cell Biology and Flow Cytometry Laboratory of Dr. Rocío Ortiz and Dr. Edith Corlós (UAM-I) for allowing the use and support of the Cytometer, and to the Physical Chemistry of Nanostructures Laboratory of Michel Picquart and Emmanuel Haro Pontalowski (UAM-I) for allowing the use of the spectrometer and confocal microscope. The authors are grateful for the support given by the research group Morphophysiology and Biochemistry of Sperm (UAM-I). This study was supported by CONACYT and the PhD's Ciencias Biológicas y de la Salud and Biología de la Reproducción Animal, México City, México (grant nos. 426152 and 302940).

Supplementary Materials

Proposed mechanism of sperm dysfunction. (Supplementary Materials)

References

- [1] V. Schwahn, I. Faure, J. P. Dufaure, and J. R. Drevet, "GPx3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens," *Molecular Reproduction Development*, vol. 51, no. 4, pp. 362–372, 1998.
- [2] D. M. Kelly and T. H. Jones, "Testosterone: a metabolic hormone in health and disease," *Journal of Endocrinology*, vol. 217, no. 3, pp. 25–48, 2013.
- [3] J. MacLeod, "The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa," *American Journal of Physiology-Legacy Content*, vol. 138, no. 3, pp. 512–518, 1943.
- [4] F. Erdemir, D. Atilgan, F. Markoc, O. Bostop, B. Suba-Parlakian, and S. Sahin, "The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters," *Actas Urologicas Espanolas*, vol. 36, no. 3, pp. 153–159, 2012.
- [5] Y. F. Jia, Q. Feng, Z. Y. Ge et al., "Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis," *BMC Urology*, vol. 18, no. 1, p. 42, 2018.
- [6] A. Jayakumar, N. Fettman, E. S. Arribaschi, and R. Mitchell, "A systematic review of adenotomyllectomy as a risk factor for childhood obesity," *Otolaryngology Head Neck Surgery*, vol. 144, no. 2, pp. 154–158, 2011.
- [7] A. Noblanc, M. Peltier, C. Darmon-Soubeyrand et al., "Epididymis response partly compensates for spermatogenesis oxidative deficits in mGPX4 and GPX3 double mutant mice," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, pp. 1–15, Article ID 0038563, 2012.

- [8] L. L. Bernardis and B. D. Patterson, "Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions," *Journal of Endocrinology*, vol. 40, no. 4, pp. 527-538, 1968.
- [9] E. Brenda Sánchez, H. Carlo Gilen, S. G. Cristina Magaly, and Y. S. Salvador Espino, "Efecto del sobrepeso y la obesidad en el perfil hormonal de pacientes masculinos con infertilidad," *Revista Mexicana Reproducción*, vol. 5, pp. 171-177, 2013.
- [10] H. Ghobadineh, M. A. Sadighi Gilani, P. Pauslar, I. Jahromi, E. Ghorbani, and G. Hamanmehr, "The effects of testosterone on oxidative stress markers in mice with spinal cord injury," *International Journal of Fertility and Sterility*, vol. 10, no. 1, pp. 87-93, 2016.
- [11] L. Rato, M. G. Alves, I. E. Carneiro, and P. F. Oliveira, "High-energy diets: a threat for male fertility?" *Obesity Reviews*, vol. 15, no. 12, pp. 995-1007, 2014.
- [12] P. Vermet, N. Fullon, C. Wallace, and R. L. Aitken, "Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal Spermatozoa1," *Biology of Reproduction*, vol. 65, no. 4, pp. 1102-1113, 2001.
- [13] A. J. Hayes, P. M. Clarke, and T. W. C. Lung, "Change in bias in self-reported body mass index in Australia between 1995 and 2006 and the evaluation of correction equations," *Population Health Metrics*, vol. 9, no. 1, p. 53, 2011.
- [14] B. Robaire and M. Harash, "Androgen action in the epididymis," *Journal of Andrology*, vol. 32, no. 6, pp. 592-599, 2011.
- [15] A. R. Edith, R. G. Adolfo, C. B. Edith et al., "Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* bats," *Reproductive Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 79-86, 2016.
- [16] D. C. Guzmán, G. B. Mejía, I. E. Viquez, E. H. García, D. S. d. Angel, and H. J. Olgún, "Effect of testosterone and steroids hormones on indolamines and lipid peroxidation in rat brain," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 94, no. 4, pp. 369-373, 2005.
- [17] J. Hruscke, J. Wistuba, and S. Schlatt, "Spermatogenic stem cells: questions, models, and perspectives," *Human Reproduction Update*, vol. 12, no. 3, pp. 275-282, 2006.
- [18] Y. Liu and Z. Ding, "Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society," *Reproduction*, vol. 154, no. 4, pp. 123-131, 2007.
- [19] F. Tramer, F. Rocca, F. Micali, G. Sandri, and E. Parfili, "Antioxidant systems in rat epididymal Spermatozoa1," *Biology of Reproduction*, vol. 59, no. 4, pp. 753-758, 1998.
- [20] S. C. Woods, R. J. Seeley, P. A. Rushing, D. D'Alessio, P. Tao, and S. C. Woods, "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats," *The Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 4, pp. 1080-1087, 2003.
- [21] L. Zhang, S. Wu, Y. Ruan, L. Hong, X. Xing, and W. Lai, "Testosterone suppresses oxidative stress via androgen receptor-independent pathway in murine cardiomyocytes," *Molecular Medical Reproduction*, vol. 4, no. 6, pp. 1183-1188, 2011.
- [22] N. Azadi, M. Bahmani, A. Khendmand, and M. Rafieian-Kopaei, "The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review," *Journal of Clinical Diagnostic Research*, vol. 11, no. 5, pp. 1E00-1E06, 2017.
- [23] A. Agarwal and S. S. Alamasani, "Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 9, no. 3, pp. 338-347, 2004.
- [24] P. C. Castillo-Castañeda, R. Castiela-Robles, L. C. Méndez-Rodríguez, V. Labrada-Martagón, and T. Zenteno-Savín, "Antioxidantes, especies reactivas de oxígeno y dano oxidativo asociado a la presencia de plaquícidas organoclorados en la leche materna," *Nutritional Hospital*, vol. 33, no. 2, p. 127, 2016.
- [25] A. Roveri, A. Causco, M. Matorino, P. Dahan, A. Calligaris, and F. Ursini, "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis: gonadotropin dependence and immunocytochemical identification," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 9, pp. 6142-6146, 1992.
- [26] X. P. Cai, B. Y. Li, H. Q. Gao, N. Wei, W. L. Wang, and M. Lu, "Effects of grape seed proanthocyanidin extracts on peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of Nutrition Science Vitaminology*, vol. 54, no. 4, pp. 321-328, 2008.
- [27] M. Kowalowska, P. Wysocki, I. Frazer, and J. Strzemecki, "Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma," *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43, no. 4, pp. 490-496, 2008.
- [28] D. D. Mrak, B. Silvestrini, M. Y. Mo, and C. Y. Cheng, "Antioxidant superoxide dismutase: a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility," *Contraception*, vol. 65, no. 4, pp. 305-311, 2002.
- [29] M. Korırowicka-Gilun and B. Strzemecki, "Molecular forms of selected antioxidant enzymes in dog semen—electrophoretic identification," *Polish Journal of Veterinary Science*, vol. 14, no. 1, pp. 29-33, 2011.
- [30] R. Brighaus Flohé and M. Matorino, "Glutathione peroxidase," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, vol. 1830, no. 5, pp. 3289-3303, 2013.
- [31] C. Godem, F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G. Sandri, and E. Parfili, "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal Spermatozoa1," *Biology of Reproduction*, vol. 57, no. 6, pp. 1502-1508, 1997.
- [32] V. Schwahn, E. Baud, N. Chryslirack, M. G. Mattei, J. P. Dufourc, and J. R. Drevet, "Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization," *Gene*, vol. 167, no. 1-2, pp. 25-31, 1995.
- [33] J. G. Alvarez and B. T. Storey, "Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa," *Biology of Reproduction*, vol. 30, no. 4, pp. 833-841, 1984.
- [34] S. Cahler, A. Agarwal, M. Flint, and S. S. de Nassis, "Obesity: modern man's fertility nemesis," *Asian Journal of Andrology*, vol. 12, no. 4, pp. 480-489, 2010.
- [35] S. Dastig, A. Nericiu, D. M. Otte et al., "Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 136, no. 4, pp. 413-425, 2011.
- [36] G. H. Lüters, S. Thiele, A. Schud, A. Vöhl, S. Yokota, and J. Seitz, "Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis," *Histochem Cell Biology*, vol. 125, no. 6, pp. 693-703, 2006.
- [37] A. Nericiu, G. H. Lüters, W. Kovacs et al., "Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis1," *Biology of Reproduction*, vol. 77, no. 6, pp. 1060-1072, 2007.
- [38] J. G. Alvarez, J. C. Touchstone, I. Ilkay, and B. T. Storey, "Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide

- dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity," *Journal of Andrology*, vol. 8, no. 5, pp. 338–348, 1987.
- [39] J. Ramirez, B. A. Hall, C. G. Gravaso, V. Medina, and M. C. Davico-Mord, "The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation," *Journal of Andrology*, vol. 21, no. 6, pp. 893–902, 2000.
- [40] C. K. Chen, J. M. Liaw, J. G. Juang, and T. H. Lin, "Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialyzed patients," *Biological Trace Element Research*, vol. 58, no. 1–2, pp. 149–157, 1987.
- [41] G. Hancas-Flores, J. C. Alvarado-Pérez, R. I. López-Roa, F. J. Alarcón-Aguilar, R. García-Macedo, and M. Cruz, "La obesidad como un proceso inflamatorio," *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, vol. 2, no. 67, pp. 10–27, 2010.
- [42] K. M. Hyatt, "Dysfunctional hormonal regulation of metabolism in obesity," *South Dakota Medicine: The Journal of the South Dakota State Medical Association*, vol. 1, pp. 10–21, 2011.
- [43] L. L. Bernardis, "Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hyperphalamic obesity," *Experientia*, vol. 26, no. 7, pp. 788–790, 1970.
- [44] A. B. Malafina, P. A. N. Nassif, C. A. P. M. Ribou, B. L. Ariede, K. N. Sae, and M. A. Cruz, "Indução de obesidade com sacarose em ratos," *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, vol. 26, no. 1, pp. 17–21, 2013.
- [45] E. I. B. Novelli, Y. S. Diniz, C. M. Galhardi et al., "Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats," *Lab Animation*, vol. 41, no. 1, pp. 111–119, 2007.
- [46] A. Schifini and A. N. German, "Effects of age, sex, and prior body weight on the development of dietary obesity in adult rats," *Physiology and Behavior*, vol. 10, no. 6, pp. 1021–1026, 1977.
- [47] R. M. Viguera-Villaheer, J. C. Rojas-Gastarota, M. Chaves-Saldana et al., "Alterations in the spermiatic function generated by obesity in rats," *Acta Histochemica*, vol. 113, no. 2, pp. 214–220, 2011.
- [48] K. A. Kamaruzaman, W. M. Aizat, and M. Mat Noor, "Cytus procambius improved fertility of diabetic rats: preliminary study of sperm proteomic," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018, pp. 1–13, 2018.
- [49] P. Amadio, M. H. Sullivan, D. Gamble, S. A. Baldwin, and B. A. Cooke, "An investigation of glucose uptake in relation to steroidogenesis in rat testis and tumour Leydig cells," *Biochemical Journal*, vol. 249, no. 3, pp. 925–928, 1988.
- [50] R. Calhoun, E. Schwierz, and B. N. Ames, "Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 134, no. 1, pp. 111–116, 1983.
- [51] D. E. Puglia and W. N. Valentine, "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase," *Journal Lab Clinical Medicine*, vol. 70, no. 1, pp. 158–169, 1967.
- [52] E. Chance and D. Herbert, "The enzymatic substrate compounds of bacterial catalase and peroxidase," *Biochemical Journal*, vol. 46, no. 4, pp. 402–414, 1952.
- [53] J. J. Bogdanica, P. Kormati, and B. Todorova, "Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia," *Brazil J Lab Ery*, vol. 104, no. 3, pp. 108–114, 2003.
- [54] C. Cohen, D. Dembise, and J. Marcus, "Measurement of catalase activity in tissue extracts," *Analytical Biochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 30–38, 1970.
- [55] T. K. Jensen, A. M. Andersson, N. Jørgensen et al., "Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1558 Danish men," *Fertility and Sterility*, vol. 82, no. 4, pp. 863–870, 2004.
- [56] E. V. Magnúsdóttir, T. Thorsteinsson, S. Thorsteinadóttir, M. Heimisdóttir, and K. Ólafsdóttir, "Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility," *Human Reproduction*, vol. 20, no. 1, pp. 200–215, 2005.
- [57] B. E. Kahn and R. E. Brannigan, "Obesity and male infertility," *Current Opinion in Urology*, vol. 27, no. 5, pp. 441–445, 2017.
- [58] R. Kolb, F. S. Satterweh, and W. Zhang, "Obesity and cancer: inflammation bridges the two," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 29, pp. 77–89, 2006.
- [59] R. M. Luque, I. Gordón-Chacón, A. I. Pozo-Sabá et al., "Obesity- and gender-dependent role of endogenous anastrozole and crotianol in the regulation of endocrine and metabolic homeostasis in mice," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, Article ID 37992, 2016.
- [60] A. S. Leopoldo, A. P. Lima-Leopoldo, A. F. Nascimento et al., "Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 49, Article ID e5008, 2016.
- [61] R. Pascual, "Obesity, fat distribution, and infertility," *Maturitas*, vol. 71, pp. 54–60, 2006.
- [62] H. Pantana, W. Pritchard, P. Sa-nguanwong et al., "Testosterone deprivation has neither additive nor synergistic effects with obesity on the cognitive impairment in orchidectomized and/or obese male rats," *Metabolism*, vol. 65, no. 2, pp. 54–67, 2016.
- [63] S. Wang, G. Wang, B. E. Barton, T. F. Murphy, and H. F. Huang, "Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat is associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling," *Journal of Andrology*, vol. 26, no. 5, pp. 582–600, 2005.
- [64] A. J. Yang, H. Gu, Y. Gu, H. C. Ye, and Y. Li, "Effects on development of the testicle in diet-induced obesity rats," *Wei Sheng Yan Jiu*, vol. 34, no. 4, pp. 477–479, 2005.
- [65] H. L. Chughtai, T. M. Morgan, C. A. Hamilton et al., "Intra-abdominal fat is associated with thickening of the thoracic aorta in individuals at high risk for cardiovascular events," *Obesity*, vol. 19, no. 5, pp. 1784–1790, 2011.
- [66] S. S. Du Plessis, S. Cabler, D. A. McAllister, E. Sahaneagh, and A. Agarwal, "The effect of obesity on sperm disorders and male infertility," *Nature Reviews Urology*, vol. 7, no. 3, pp. 153–160, 2010.
- [67] D. C. Sanchez-Ramirez, H. Long, S. Mowat, and G. Hein, "Obesity education for front-line healthcare providers," *BMC Medical Education*, vol. 18, no. 1, p. 270, 2018.
- [68] R. A. Hean, "Nitrogen in the adult male reproductive tract: a review," *Reproductive Biological Endocrinology*, vol. 1, no. 1, p. 52, 2003.
- [69] P. F. Oliveira, M. Souza, R. M. Silva, M. P. Monteiro, and M. G. Alves, "Obesity, energy balance and spermatogenesis," *Reproduction*, vol. 153, no. 6, pp. 173–183, 2007.
- [70] N. O. Palmer, H. W. Baker, T. Fullerton, and M. Lane, "Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition," *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 4, pp. 252–263, 2012.
- [71] T. E. Saez-Lucasoli, P. V. Boardill, A. A. Romero et al., "Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, Article ID e52386, 2013.

- [72] H. Y. Kang, "Beyond the male sex hormone: deciphering the metabolic and vascular actions of testosterone," *Journal of Endocrinology*, vol. 217, no. 3, pp. 1-3, 2013.
- [73] C. A. Maggio and F. X. R-Sanchez, "Obesity and type 2 diabetes," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 32, no. 4, pp. 805-822, 2003.
- [74] G. Scrovallo and G. Grassi, "Obesity and hypertension," *Pharmacological Research*, vol. 122, pp. 1-7, 2017.
- [75] E. R. Hofny, M. E. Ali, H. Z. Abdel-Halim et al., "Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males," *Fertility and Sterility*, vol. 94, no. 2, pp. 580-584, 2010.
- [76] J. E. Chavarro, T. L. Toth, D. L. Wright, I. D. Meeker, and R. Hauser, "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*, vol. 93, no. 7, pp. 2222-2231, 2010.
- [77] G. Domínguez-Viña, A. R. Segarra, M. Martínez-Catanzano, M. Ramírez-Sánchez, and I. Prieto, "Influence of a virgin olive oil versus butter plus cholesterol-enriched diet on testicular enzymatic activities in adult male rats," *International Journal of Molecular Science*, vol. 18, no. 8, p. 1701, 2017.
- [78] H. E. Chemes and V. Y. Rowe, "The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis," *Cell Tissue Research*, vol. 341, no. 3, pp. 349-357, 2003.
- [79] Y. Sheynkin, M. Jung, P. Yoo, D. Schulzinger, and E. Komaroff, "Increase in scrotal temperature in laptop computer users," *Human Reproduction*, vol. 20, no. 2, pp. 452-455, 2005.
- [80] A. Valeri, D. Mianze, F. Microsini, L. Bujan, A. Altobelli, and I. Mazoni, "Scrotal temperature in 258 healthy men, randomly selected from a population of men aged 18 to 25 years old: statistical analysis, epidemiologic observations, and measurement of the testicular diameter," *Progrès en urologie journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*, vol. 3, pp. 444-452, 1993.
- [81] C. K. Naughton, A. K. Nangia, and A. Agarwal, "Varicocele and male infertility: part II: pathophysiology of varicocele in male infertility," *Human Reproduction Update*, vol. 7, no. 5, pp. 473-481, 2003.
- [82] Ö. Tunc, H. W. Baksoz, and K. Tuzemken, "Impact of body mass index on seminal oxidative stress," *Andrologia*, vol. 43, no. 2, pp. 121-126, 2011.
- [83] W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson et al., "Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 12, no. 1, p. 223, 2015.
- [84] Y. H. Lee, A. P. Sinha Hikim, R. S. Swerdloff et al., "Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity¹," *Endocrinology*, vol. 140, no. 4, pp. 1709-1717, 1999.
- [85] J. Yaaram, H. P. Seitchell, and S. Maddocks, "Effect of heat stress on the fertility of male mice *in vivo* and *in vitro*," *Reproductive Fertilization Development*, vol. 18, no. 6, pp. 647-653, 2006.
- [86] F. Zhu, Y. Ma, and Y. Huang, "Role of sperm DNA integrity in male infertility," *Zhonghua Nan Ke Xue*, vol. 10, no. 3, pp. 222-226, 2004.
- [87] A. Champroux, I. Torres-Carrera, P. Garagodos, J. R. Drevet, and A. Escar, "Mammalian sperm nuclear organization: resilience and vulnerabilities," *Basic Clinical Andrology*, vol. 26, no. 1, p. 17, 2024.
- [88] J. R. Drevet and R. J. Aitken, "Oxidation of sperm nucleus in mammals: a physiological necessity to some extent with adverse impacts on oocyte and offspring," *Antioxidants*, vol. 9, no. 2, p. 95, 2020.
- [89] E. Rodríguez, R. Fierro, H. González, F. García, and R. Arenas, "Boar sperm incubation with reduced glutathione (GSH) differentially modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in sperm, *in vitro* fertilization, and embryo development depending on concentrations," *Research in Veterinary Science*, vol. 135, no. 1, pp. 1-11, 2020.
- [90] J. Barp, A. S. Araújo, T. R. Fernandes et al., "Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormone," *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, vol. 35, no. 9, pp. 1075-1081, 2002.
- [91] N. N. Tam, Y. Gao, Y. K. Leung, and S. M. Ho, "Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate in involvement of NAD(P)H oxidase and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth," *The American Journal of Pathology*, vol. 163, no. 6, pp. 2513-2522, 2003.
- [92] V. E. Bianchi, "The anti-inflammatory effects of testosterone," *Journal of the Endocrine Society*, vol. 3, no. 1, pp. 91-107, 2019.
- [93] L. Wang, J. H. Pei, J. X. Liu et al., "Inhibition of oxidative stress by testosterone improves synaptic plasticity in senescence accelerated mice," *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 82, no. 20, pp. 1061-1068, 2019.
- [94] D. Cruz-Topete, P. Durrinik, and K. Y. Stokes, "Uncovering sex-specific mechanisms of action of testosterone and redox balance," *Redox Biology*, vol. 33, Article ID 101490, 2020.
- [95] A. Zini and P. N. Schlegel, "Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis," *International Journal of Andrology*, vol. 20, no. 2, pp. 86-91, 1997.
- [96] L. Zhang, D. Lei, G. P. Zhu, L. Hong, and S. Z. Wu, "Physiological testosterone retards cardiomyocyte aging in Th1 mice via androgen receptor-independent pathway," *Chinese Medical Sciences Journal*, vol. 28, no. 2, pp. 88-94, 2013.

17.2. *Capítulo de libro*



El espermatozoide: una mirada desde México

EDITH ARENAS RÍOS
GISELA FUENTES MASCORRO
Coordinadoras



Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, México
Universidad Autónoma Metropolitana, México
Universidad Nacional Autónoma de México, México
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
Universidad Autónoma de Tlaxcala, México
Universidad Autónoma del Estado de México, México
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco
Suárez", México
Instituto de Geriátrica, México
Universidad de Syracuse, Estados Unidos de Norteamérica

Citar los capítulos del libro de la siguiente forma:
Nombre del autor (es). (Año). Nombre del capítulo. *Nombre del libro* (pp. - pp.).
Lugar de edición: Editorial

La presente edición fue financiada parcialmente con recursos
del PFCE 2018.

El espermatozoide: una mirada desde México

© 2019

D. R. © Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca

Primera edición, 2019

ISBN versión electrónica: 978-607-9061-69-2

ISBN versión impresa: 978-607-9061-68-5

Servicios editoriales Scriptus
www.scriptus.com.mx

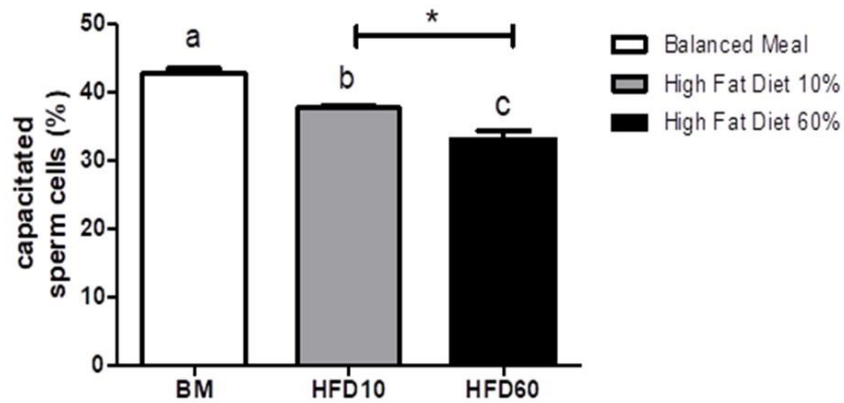
Impreso en México

IMPLICACIONES ACTUALES DE LA OBESIDAD EN LA FERTILIDAD MASCULINA

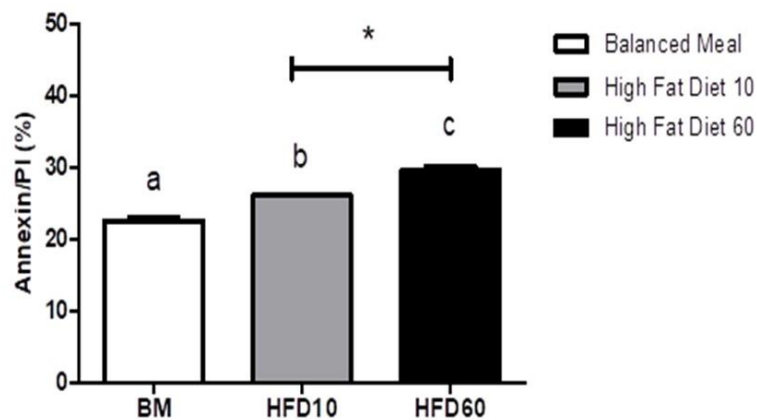
Lorena Ruiz Valderrama,¹
Román Espinosa Cervantes,²
Ileri Fragoso Hernández,³
Isabel Arrieta Cruz,⁴
Humberto González Márquez,⁵
Ma. del Rosario Tarragó Castellanos,⁶
Leticia González Núñez,⁶
Marcela Arteaga Silva⁶ y
Edith Arenas Ríos⁶

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Itzapalapa.
² Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM Xochimilco.
³ Maestría en Biología de la Reproducción Animal, UAM Itzapalapa.
⁴ Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátrica.
⁵ Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM- Itzapalapa.

18. Anexo



a) Capacitación espermática en ratas Wistar que consumen una dieta balanceada, dieta 10 y 60% alta en grasa (promedio \pm DE) analizadas con CTC después de un tiempo de 6 horas de incubación en un medio capacitante. ^{a, b, c} indica diferencias estadísticamente significativas; * indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos 10 y 60% ($P \leq 0.05$).



b) Fosfatidilserina externalizada en espermatozoides de ratas Wistar que consumen una dieta balanceada, dieta 10 y 60% alta en grasa (promedio \pm DE). a, b, c indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos; * indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos 10 y 60% ($P \leq 0.05$).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00145

Matrícula: 2153804438

Efecto de la obesidad en la maduración espermática epididimaria en rata Wistar.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 12 del mes de abril del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS
DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
DRA. ANGELICA TRUJILLO HERNANDEZ
DRA. MARIA DEL CONSUELO LOMAS SORIA
DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: LORENA RUIZ VALDERRAMA

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

APROBAR

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




LORENA RUIZ VALDERRAMA
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL



DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ

VOCAL



DRA. ANGELICA TRUJILLO HERNANDEZ

VOCAL



DRA. MARIA DEL CONSUELO LOMAS SORIA

SECRETARIO



DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ