



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO DEL SOBREPESO Y CONSUMO DE  
PLASTIFICANTES EN LA FRAGMENTACIÓN DE ADN  
ESPERMÁTICO EN RATONES DE LA CEPA CD-1.

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:  
DÁNAE ORTIZ SUÁREZ

DIRECTOR (A): M.C. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

SEPTIEMBRE, 2018



## AGRADECIMIENTOS

Al M. C. Juan Carlos Flores Alonso, por su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente por brindarme las instalaciones y el material para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo

A mis compañeros Ulises Martínez Galindo y Williams W. Espinosa Cano por su participación en este proyecto y su apoyo incondicional.

Al MVZ. Humberto Trejo Martínez y la D. C. Rosalina Reyes Luna por su colaboración.

A Martin, por ayudarme en todo momento.

A mis amigos y familia por su paciencia, por su ánimo y su amistad.

A mis padres por su apoyo, confianza y guía siempre. Gracias por enseñarme a luchar y por estar conmigo en cada paso.

## Contenido

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 OBESIDAD.....	4
1.1.2 CLASIFICACIÓN DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD.....	4
1.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OBESIDAD.....	5
1.1.4 OBESIDAD EN MÉXICO.....	6
1.1.5 EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA	7
1.2 PLASTIFICANTES.....	8
1.2.1 DISRUPTORES ENDÓCRINOS (DE).....	8
1.2.2 EFECTOS DE LOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS EN LA SALUD...9	
1.2.3 EFECTOS DE LOS PLASTIFICANTES EN LA FERTILIDAD MASCULINA.....	10
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
1.4 ESPERMATOGÉNESIS.....	12
1.5 FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO.....	14
1.5.1 FACTORES QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO.....	15
1.5.2 IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE ADN Y SU FUNDAMENTO.....	16
1.5.2.1 ENSAYO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA).....	17
1.5.2.2 DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD).....	17
1.5.2.3 ELECTROFORESIS DE CÉLULA ÚNICA (ENSAYO COMETA).....	18
1.5.2.4 MARCAJE DE SITIO TERMINAL A TRAVÉS DE DESOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA (TUNEL).....	19
2. ANTECEDENTES.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS.....	26
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26

7.	METODOLOGÍA.....	27
7.1	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	27
7.2	MODELO ANIMAL.....	28
7.3	INDUCCIÓN DE SOBREPESO .....	28
7.4	ADMINISTRACIÓN DE PLASTIFICANTE .....	29
7.5	OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	29
7.6	ANÁLISIS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA .....	29
7.7.1	CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES .....	30
7.7.2	MOTILIDAD .....	30
7.7.3	VITALIDAD.....	31
7.7.4	PRUEBA COMETA.....	31
7.7.5	PRUEBA TUNEL.....	32
7.7.5	ANÁLISIS DE LAS FOTOGRAFÍAS .....	33
7.7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
8.	RESULTADOS.....	36
8.1	PESO DE RATONES.....	36
8.2	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	37
8.3	MOVILIDAD ESPERMÁTICA.....	38
8.4	VITALIDAD ESPERMÁTICA.....	39
8.5	FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO .....	40
8.5.1	PRUEBA COMETA .....	40
8.5.2	ÁREA DE FRAGMENTACIÓN.....	42
8.5.3	FRAGMENTACIÓN.....	43
8.5.4	APERTURA DE FRAGMENTACIÓN.....	44
8.4.5	FRAGMENTACIÓN POR PRUEBA TUNEL .....	45
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIONES.....	53
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	54
12.	ANEXOS.....	60
12.2	TAE 10X.....	60
12.3	BUFFER DE LISIS .....	61
12.4	BUFFER TRIS.....	61

## ABREVIATURAS

ABH-DHT	Proteína fijadora de andógenos- dihidrotestosterona
AC	Área celular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Área de fragmentación
AO	Anaranjado de acridina
ATP	Adenosin trifosfato
BPA	Bisfenol A
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
DBD-FISH	Detección de roturas de ADN mediante hibridación <i>in situ</i> fluorescente
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Disruptor endócrino
DFI	Índice de fragmentación de ADN
DTT	Dithioethreitol
ER	Receptor de estrógeno
FasL	Proteínas ligando Fas
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
ICSI	Inyección intracitoplasmática

IMC	Índice de masa corporal
LH	Hormona luteinizante
LH/CG	Hormona luteinizante/coriogonadotropina
MC4	Receptor de la melacortina 4
mA	Miliamperes
P	Protaminas
PPAR	Receptores activados por la proliferación de peroxisomas
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCB	Bifenilos policlorados
pH	Potencial de hidrógeno
PP	Polipropileno
PVC	Policloruro de vinilo
ROS	Sustancias reactivas de oxígeno
SCSA	Ensayo de la estructura de la cromatina espermática
SCD	Dispersión de la cromatina espermática
TP	Proteínas de transición nuclear
TRA	Técnica de reproducción asistida
TUNEL	Marcaje de sitio terminal a través de desoxinucleotidil transferasa
UV	Ultravioleta
V	Voltios

## RESUMEN

Diversos factores ambientales pueden amenazar la fertilidad de una pareja en edad reproductiva. La obesidad es una enfermedad crónica que altera la calidad de los gametos. Recientes investigaciones han mostrado que existen toxinas liberadas por los plásticos que pueden afectar la calidad de los gametos, sin embargo, aún se desconocen los efectos sobre la calidad del ADN (ácido desoxirribonucleico) espermático.

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos del sobrepeso y la exposición a plastificantes sobre la calidad espermática y la fragmentación de ADN. Se utilizaron ratones 20 machos de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad. Se formaron 4 grupos de estudio: control (C), sobrepeso (S), plástico (P) y sobrepeso+plástico (S+P). El grupo S fue alimentado con una dieta alta en grasa, P ingirió agua calentada en recipiente de polipropileno, en S+P los ratones se alimentaron con las dietas ya descritas, y el grupo C consumió alimento estándar de ratón y agua calentada en recipiente de vidrio. Después de 30 días de tratamiento, los espermatozoides se obtuvieron de la cauda del epidídimo y se hizo un análisis por espermatobioscopía. Después, la integridad del ADN espermático fue analizado por TUNEL (marcaje de sitio terminal a través de desoxinucleotidil transferasa) y electroforesis de célula única (COMETA), en este estudios se midieron parámetros como la apertura de fragmentación, área fragmentada e intensidad de fluorescencia. Se observó que el numero de espermatozoides y la motilidad espermática es reducida en el grupo S. Por otra parte, la vitalidad espermática es reducida de manera significativa en el grupo P. Además, la calidad la integridad del ADN espermático se ve afectado significativamente en los grupos S, P y S+P en comparación al grupo control. Por lo que se concluye que el sobrepeso y la exposición a plastificantes son perjudiciales para la calidad del espermatozoide.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad causada por un exceso de grasa corporal que se debe a un desbalance energético por un consumo calórico mayor comparado al gasto energético. Es una condición que impacta a todas las edades y grupos sociales, además predispone a la población a padecer enfermedades crónicas y degenerativas (Barrientos-Pérez, 2008).

Es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes, enfermedades cardiovasculares, aumento de la presión arterial, dislipidemias, problemas osteoarticulares, también está asociada a algunos tipos de cáncer como el de mama y próstata (Barquera y cols., 2010).

La obesidad tiene una etiología multifactorial, donde se involucra tanto la carga genética como el estilo de vida y entorno. Además de otros determinantes como la cultura, situación económica, educación, nivel de urbanización, etc.

#### 1.1.2 CLASIFICACIÓN DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD

El principal indicador para diferenciar el sobrepeso y la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), donde se establece una relación entre el peso y la talla del individuo. Se divide el peso de una persona en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (OMS, 2017).

De acuerdo a esto, se considera sobrepeso cuando una persona tiene un IMC igual o mayor a 25 y obesidad cuando es igual o superior a 30. Dentro de la obesidad existe una subclasificación: se trata de grado 1 cuando el IMC es mayor que 30 pero menor que 35, grado 2 cuando es mayor a 35 y menor a 40, por último, grado 3 cuando es mayor a 40 (Flegal K. y cols, 2013).

### 1.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OBESIDAD

La obesidad tiende a darse en grupos familiares pero no corresponde a un patrón de herencia que se conozca y este padecimiento puede depender de factores ambientales (Tejero, 2008). La herencia puede participar sobre la cantidad de grasa y su distribución y en algunos casos hay mutaciones del material genético que pueden causar el fenotipo de obesidad.

Se conocen algunas mutaciones, como las del gen de la leptina, que puede causar obesidad infantil e hiperfagia. Otro ejemplo es cuando hay una mutación en el receptor de MC4 (receptor de la melancortina 4) en el hipotálamo, al no obtener la señal de saciedad, dispara la ingesta de alimento en exceso, esta mutación se puede presentar entre un 0.5 a 1% en una población de adultos. Existen aproximadamente 120 genes relacionados inconsistentemente al fenotipo de la obesidad, pero los estudios no permiten dar un panorama claro sobre el verdadero impacto de la genética en esta enfermedad (Tejero, 2008).

Existe una mayor susceptibilidad genética a la obesidad en la población mexicana, pero los factores genéticos no justifican el gran aumento de esta problemática en tan corto tiempo (Barquera y cols., 2010).

La globalización y la necesidad de alimentos empaquetados y procesados que son baratos, de fácil preparación y acceso para las personas, ha conducido a la ingesta de comida hipercalórica que contienen mucha grasa, azúcar y sal. Así como la disminución en la ingesta de fibra, ya que se reemplazaron los vegetales y frutas con alimentos con sabores artificiales y bajo contenido nutricional.

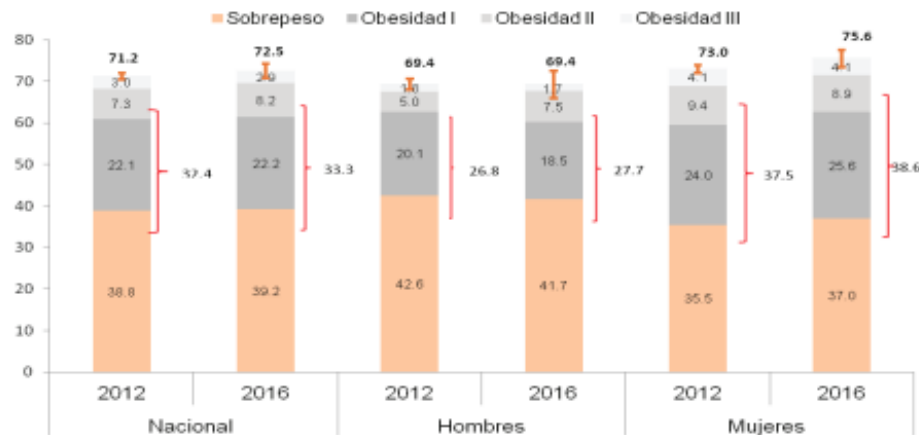
La actividad física es necesaria para mantener una vida saludable. Las actividades laborales actuales de escritorio y las formas de desplazamiento, como el autobús y los coches, han influenciado para que disminuya la actividad física en la población (Barrera-Cruz y cols., 2013). La suma de una ingesta hipercalórica y la carencia de actividad física llevan al desbalance energético, por lo tanto al sobrepeso y obesidad.

### 1.1.4 OBESIDAD EN MÉXICO

La obesidad en México es un problema muy grande de salud, pues se da en cualquier edad y grupo social. La incidencia de sobrepeso y obesidad de niños y adultos entre 1988 y 1999 aumentó radicalmente: en niños menores a 5 años el aumento fue de 27%, de 5 a 11 años de 28%, en el caso de mujeres en edad reproductiva se observó un aumento de 70%. Al comparar a mujeres y hombres entre 1994 y 2000 el sobrepeso aumentó un 50% y la obesidad un 150%. Estos números fueron reportados en todas las regiones tanto urbanas como rurales. El grupo con mayor aumento fue en adultos jóvenes de 20 a 39 años (Barquera y cols., 2016).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino, del 2012 al 2016 el sobrepeso en hombres de 20 años de edad ó más subió en 1.1% y la de obesidad en 42.8% (Hernández M. y cols., 2016).

**Prevalencia de sobrepeso y obesidad\* en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.**



Fuente: ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.

\* Clasificación de IMC descrita por la OMS: sobrepeso = 25.0-29.9 kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado I = 30.0-34.9 kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado II = 35.0-39.9 kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado III ≥ 40.0 kg/m<sup>2</sup>

Fig. 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población de 20 ó más años de edad, en la ENSANUT 2012 y 2016.

### 1.1.5 EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA

El rango de edad en el que se observa un aumento en el porcentaje de personas con obesidad está entre los 20 y 39 años, en este rango los varones se encuentran en edad reproductiva, por lo que se puede estar viendo afectada su capacidad reproductiva. El concepto de infertilidad varía de un médico a otro, pero en general se trata de la incapacidad para lograr un embarazo después de un tiempo razonable (de uno a tres años) de mantener relaciones sexuales sin protección anticonceptiva (Brugo-Olmedo, 2003). En el 40-50% de las parejas que no pueden concebir son por factores masculinos (Bonet, 2016). Las principales causas son: el tabaquismo, aneyaculación por traumatismo, varicocele o exposición a altas temperaturas (Brugo-Olmedo, 2003).

En numerosos estudios se ha encontrado una relación entre la obesidad y alteraciones en la calidad espermática e infertilidad. Un factor es el hormonal, ya que la obesidad provoca cambios hormonales asociados a la espermatogénesis (Sánchez-Ramírez y cols., 2013). Es común que hombres obesos presenten un perfil hormonal alterado, caracterizado por la disminución de testosterona, el aumento de los niveles de estradiol y en caso de obesidad mórbida se pueden presentar cambios en la secreción de gonadotropinas (Pasquiali, 2006).

En trabajos más recientes se ha encontrado una relación entre la obesidad y un bajo nivel de inhibina B, que es un producto de la funcionalidad de las células de Sertoli y que repercute sobre la espermatogénesis (Pauli y cols., 2008).

La obesidad también afecta el eje hipotálamo-hipófisis-célula de Leydig en pacientes obesos a través de las endorfinas, que al elevarse tienen un efecto negativo en la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), bajando la concentración de gonadotropinas (hormona folículo estimulante [FSH] y hormona luteinizante [LH]) y dañando la producción androgénica en el testículo (Sánchez-Ramírez y cols., 2013).

Los varones obesos pueden afectar su calidad espermática debido a las altas concentraciones de insulina en la sangre y a su resistencia, lo que conlleva a una baja producción en testosterona dando como consecuencia disminución en la fertilidad. Además, presentan la elevación de la temperatura escrotal por la acumulación de grasa en el área del pubis, el escroto y la ingle en personas obesas (Sánchez-Ramírez y cols., 2013).

## 1.2 PLASTIFICANTES

Debido al ritmo de vida atareada de los humanos es cada vez más común consumir alimentos que no sólo tienen una alta cantidad de grasas y azúcares sino que se encuentran empaquetados. Por lo que estamos en continua exposición con contaminantes y sustancias tóxicas a través de alimentos envasados, productos de limpieza y de aseo personal.

El avance de la industria de los materiales ha incrementado el desarrollo de síntesis de compuestos químicos. A pesar de que esto supone una ventaja en nuestra vida diaria, también representa un peligro para la salud. Muchas de estas sustancias tienen propiedades físicas y químicas que les permite ser solubles en lípidos y almacenarse en tejidos grasos de los seres vivos (Martínez de Paz, 2012). Un gran grupo de los monómeros plásticos y polímeros sintéticos se describen como disruptores endócrinos (DE; Chichizola y cols, 2009).

### 1.2.1 DISRUPTORES ENDÓCRINOS (DE)

Los disruptores endócrinos son compuestos químicos también conocidos como estrógenos ambientales, xenoestrógenos, hormonas ambientales, moduladores endócrinos o xenobióticos (Chichizola y cols, 2009). Estas sustancias imitan la acción de hormonas naturalmente sintetizadas por el cuerpo, lo que lleva a su desequilibrio (Martínez de Paz, 2012).

Dependiendo del tipo de DE pueden actuar con diferentes mecanismos de acción, como incrementar o bloquear la función de hormonas esteroideas, tener un efecto antagónico o sinérgico sobre los receptores, alterar la transcripción de receptores nucleares, regular la mutilación de ADN y el metabolismo de lípidos (Chichizola y cols, 2009).

Existen muchos tipos de DE, pueden tener un origen natural como las isoflavonas y lignanos que se encuentran en la soya y otras legumbres. Dentro de los DE artificiales y de uso cotidiano están el insecticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), los alquifenoles que están presentes en artículos de limpieza y algunos alimentos, los ftalatos que componen a los plásticos blandos en juguetes, el bisfenol-A que es un compuesto importante en los envases de alimentos y la 3-benzofenoma que se encuentra en protectores solares con filtro UV (Argemi y cols, 2005).

### 1.2.2 EFECTOS DE LOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS EN LA SALUD

Debido al contacto directo que tienen estos compuestos con el ser humano, es muy importante conocer el daño y sus efectos en la salud (Argemi y cols, 2005).

Los efectos de estos químicos se pueden presentar a cualquier edad, los niños son especialmente vulnerables, así como las mujeres embarazadas por la exposición transplacentaria. También se ha relacionado a los DE con un bajo peso y talla al nacer así como un estado nutricional alterado en el bebé. Se pueden ver alterados también el aprendizaje y la conducta dependiendo de la etapa del desarrollo con exposición a DE (Argemi y cols., 2005).

La principal fuente de exposición de ftalatos, compuestos químicos utilizados como plastificantes, es a través de los alimentos almacenados en contenedores de plástico, estos químicos se encuentran en mayores concentraciones en productos altos en grasa como aceites, leche, carne y pescado. Los residuos de plastificante aumentan dependiendo de la temperatura y el tiempo que se almacenen en los contenedores de plástico (Bustamante y cols., 2001).

Actualmente no se conoce mucho sobre los efectos crónicos que los plastificantes tienen en el cuerpo humano, la mayoría de las conclusiones están basadas en estudios en animales (Bustamante y cols., 2001).

### 1.2.3 EFECTOS DE LOS PLASTIFICANTES EN LA FERTILIDAD MASCULINA

Se ha observado que los agentes tóxicos presentes en el medio ambiente, así como el estilo de vida y otros factores como el cigarro, el alcohol y la obesidad, pueden afectar la calidad espermática para fecundar.

El bisfenol-A (BPA) es un disruptor del receptor de estrógenos que es usado para hacer plástico en envase de alimentos y bebidas, así como en materiales dentales. Es uno de los químicos con mayor producción en el mundo. Al calentar los envases de alimentos estos químicos se pueden desprender en la comida (Vom Saal, 2005).

El BPA actúa directamente sobre receptores hormonales presentes en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal por lo que afecta la maduración sexual. El testículo parece ser un órgano blanco a ftalatos y bifenilos policlorados (PCB's), y tiene una relación negativa con la motilidad espermática. En modelos animales, la exposición a BPA ha mostrado efectos en el sistema reproductivo masculino, incluyendo la inhibición del desarrollo de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis (Jeng, 2014).

La función transcripcional de los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR), son receptores nucleares que actúan factores transcripcionales, y es uno de los mecanismos de acción para que los plásticos induzcan cambios transcripcionales, toxicidad en órganos reproductivos y estrés oxidativo. Los PPARs son proteínas receptoras nucleares que se ligan con secuencias específicas de ADN y regulan su transcripción. PPAR $\alpha$  regula los genes que controlan la degradación de ácidos grasos, PPAR $\beta$  maneja los genes que controlan el metabolismo de los ácidos grasos y PPAR $\gamma$  regula los que controlan los niveles de glucosa (Mathieu-Denocourt y cols., 2014).

### 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

Muchas sustancias químicas como el bisfenol A se han relacionado con el estrés oxidativo. Estudios donde se administró bisfenol A en ratas macho se midieron enzimas que participan en el estrés oxidativo y se encontraron niveles elevados de peróxido de hidrógeno. El oxígeno se encuentra normalmente en su forma estable ( $O_2$ ) donde es poco reactivo con otras moléculas. A pesar de ello, debido a reacciones químicas o enzimáticas, se producen especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres). Estas son capaces de generar reacciones con otros compuestos del organismo y llegan a producir daño celular, a estas sustancias se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Venereo-Gutierrez, 2002).

Las ROS tienen funciones muy importantes en los espermatozoides durante la capacitación, la hiperactivación y en la reacción acrosomal. Es por esto que un desbalance en estas sustancias puede resultar en la oxidación de las membranas espermáticas principalmente compuestas por grasas poliinsaturadas así como la pérdida de la función mitocondrial y la fragmentación de ADN (Wang y cols, 2003., Kodama y cols, 1997).

Por otro lado, el estrés oxidativo también se ha asociado a una alta tasa de daño celular por oxígeno y radicales libres derivados de oxígeno. Se ha propuesto que los radicales libres pueden afectar la fertilidad masculina. El mecanismo probable es que los radicales libres pueden estar ocasionando daño en el ADN y sus proteínas, a través de la oxidación de las bases o rompiendo las hebras de ADN (Sikka & Wang, 2008).

## 1. 4 ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso muy complejo donde una célula diploide llamada espermatogonia, sufre diferentes transformaciones para ser una célula haploide llamada espermatozoide (Fig.1) El propósito es producir gametos genéticamente únicos, poder fertilizar un óvulo y generar descendencia.

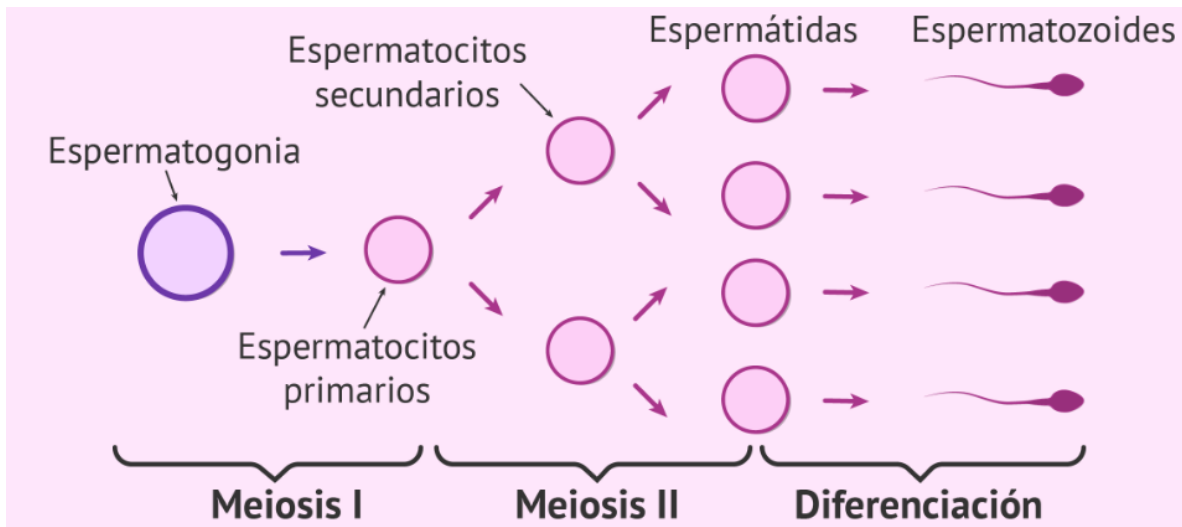


Fig. 1 Proceso de división celular presente en la espermatogénesis (reproducciónasistida.org, 2018).

El proceso de división empieza cuando la espermatogonia tiene dos meiosis donde a partir de un espermatocito primario se generan dos espermatocitos secundarios, ambos haploides. Por último cuatro espermátidas (Moore y cols., 2016). Estas espermátidas maduran por un proceso llamado espermiogénesis, en donde se desarrolla el flagelo. La cabeza del espermatozoide se reduce, hay una disminución del citoplasma, formación del acrosoma y la condensación de ADN que permite que el material genético quepa en el núcleo reducido (Moore y cols, 2016).

La espermatogénesis se considera un mecanismo neuroendócrino debido a que inicia la producción hormonal en el hipotálamo que libera GnRH, su blanco es la adenohipófisis y este órgano libera dos hormonas anteriormente mencionadas: FSH y LH. Estas hormonas tienen diferentes células diana, la LH actúa sobre las células de Leydig para producir testosterona. Por otro lado, la FSH interactúa con las células de Sertoli que proporcionan soporte y nutrición durante el desarrollo y proliferación de los espermatozoides (Fig. 2) (Jubiz y cols., 2007). Además de esas dos hormonas, la adenohipófisis también secreta la hormona adrenocorticotrópica, prolactina, hormona de crecimiento y hormona estimuladora de tiroides, todas participan en distintas fases de la espermatogénesis (Jubiz y cols., 2007).

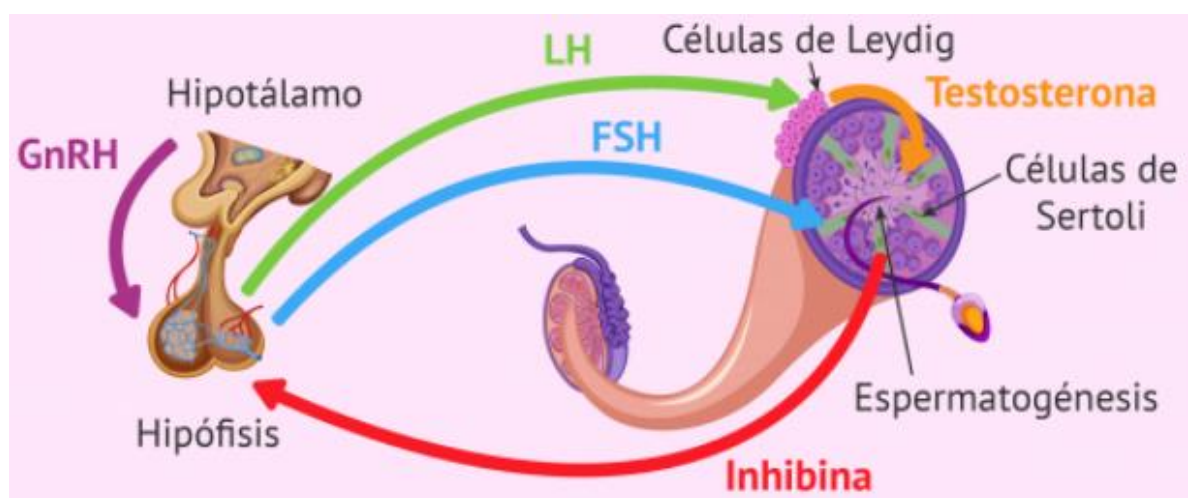


Fig. 2 Regulación hormonal de la espermatogénesis (reproducciónasistida.org).

En el proceso de la espermatogénesis las histonas somáticas tienen una hiperacetilación y se reemplazan por las proteínas de transición nuclear (TP1 y TP2), las cuales posteriormente se cambian por otras proteínas llamadas protaminas (P1 y P2) (Bernúdez-Cruz, 2015). La función de las protaminas es empaquetar el genoma dentro del núcleo del espermatozoide. Estas proteínas son ricas en arginina y residuos de cisteína que le confiere una mayor afinidad

hacia el ADN espermático y favorece una mayor estabilidad estructural. Así se asegura el reemplazo de las histonas y las TP's, para que exista una mayor compactación del ADN dentro del núcleo (Quintero-Vásquez, 2015). Los residuos de cisteína presentes en las protaminas son oxidados y se forman puentes disulfuro y esto ayuda a estabilizar la cromatina en las últimas fases de la maduración espermática (Ding y Jin, 2017).

Este proceso de reemplazamiento de histonas le confiere al núcleo una compactación seis veces mayor que el de los cromosomas mitóticos (Carretero y cols., 2009) y protección durante su paso por los aparatos genitales femeninos y masculinos. Si se lleva a cabo un defecto durante la síntesis de protaminas o la formación de puentes disulfuro, se afecta el empaquetamiento del ADN, y se aumenta su vulnerabilidad a la fragmentación de ADN (Quintero-Vásquez, 2015).

### 1.5 FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

Para evaluar la calidad espermática de un animal se toman en cuenta diferentes parámetros como la motilidad, viabilidad y concentración. Pero en años recientes se ha contemplado la realización de estudios de fragmentación de ADN espermático.

Cualquier célula del cuerpo sufre daños en su material genético ya sea por roturas bicatenarias o monocatenarias, un espermatozoide aparentemente normal puede tener su integridad genética dañada y aún así es capaz de fecundar un óvulo, afectando el posible desarrollo del embrión (Sánchez y cols., 2014). La fragmentación de ADN espermático puede alterar el desarrollo embrionario, así como la probabilidad de fecundación. A veces el óvulo es capaz de reparar estos daños gracias a la maquinaria que posee, pero si no logra hacerlo, el embrión puede desarrollarse con problemas (Sánchez y cols., 2014).

### 1.5.1 FACTORES QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

La fragmentación de ADN se puede dar en cualquier momento de la espermatogénesis (Morales y cols., 2007) y por distintas razones, dos de las más importantes son daño por apoptosis y por estrés oxidativo. Por lo que un exceso de especies reactivas de oxígeno provoca efectos negativos en las células que participan en la espermatogénesis.

Las células de Sertoli soportan un número de células germinales limitado, debido a esto, se lleva a cabo el proceso de apoptosis y así se previene la sobreproducción. La proteína Ligando Fas (FasL) está relacionada con la apoptosis en células germinales, ya que algunas empiezan el proceso de apoptosis pero no la completan (Álvarez, 2007).

El reemplazamiento de histonas por protaminas durante la espermatogénesis es una fase crítica para la protección del ADN. La acetilación de histonas es necesaria para que se lleve a cabo este reemplazamiento (Ding y Jin, 2017).

Otro factor importante es la edad del hombre, ya que se ha asociado con mayor frecuencia de mutaciones, rupturas en el ADN espermático, y se considera la mayor causa de nuevas mutaciones en la población humana (Ding y Jin, 2017)

La exposición a tóxicos ambientales, como los ftalatos, insecticidas y pesticidas, se asocia con daño al material genético. Incluso se considera que la exposición a aire contaminada puede causar daño en el ADN (Sikka y cols., 2008)

También en los casos donde se llevan a cabo técnicas de reproducción asistida, al momento de manipular la muestra de espermatozoides, se ha observado la activación del proceso apoptótico. Existen otros escenarios en los cuales existe la fragmentación de ADN: como en el uso de ciertos fármacos, el consumo de tabaco y presentar episodios de fiebre donde se aumente la temperatura testicular (Cortés y cols, 2007).

## 1.5.2 IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE ADN Y SU FUNDAMENTO

Se estima que entre el 10 y 15% de los varones estériles presentan parámetros de motilidad, viabilidad, morfología y concentración espermática dentro de los rangos normales. Por lo que en estos hombres, la infertilidad se puede deber a defectos en la membrana de la célula masculina, factores ambientales o genéticos que no se pueden detectar a través de la espermatobioscopìa (Morales y cols., 2007).

Debido a que la integridad del ADN espermático es muy importante para el correcto desarrollo del embarazo, es necesario su estudio y la aplicación de técnicas que nos permitan conocer el grado de fragmentación e incluirlo dentro de los parámetros para evaluar la calidad espermática. Se ha demostrado que un alto grado de degradación de ADN está relacionado con efectos negativos en los procesos reproductivos como el aborto y defectos en la descendencia. Sin embargo, un espermatozoide con el ADN fragmentado aún mantiene la capacidad de fertilizar (Zhao y cols., 2014).

Se han desarrollado diferentes técnicas para el estudio de fragmentación de ADN espermático. Algunos métodos dañan a la célula para desnaturalizar su ADN y poder ser evaluado, por ejemplo: Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), Detección de roturas de ADN mediante hibridación "*in situ*" fluorescente (DBD- FISH), Dispersión de la cromatina espermática (SCD) y electroforesis de célula única, también conocida como Ensayo Cometa. También hay técnicas de mayor precisión como las técnicas que marcan la ruptura de la cadena de ADN incorporando fluorocromos en los extremos de la ruptura. Dentro de estas técnicas se puede apreciar la prueba TUNEL o Marcaje de sitio terminal a través desoxinucleotidil transferasa (Morales y cols., 2007).

### 1.5.2.1 ENSAYO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)

El SCSA es una técnica que permite identificar espermatozoides con empaquetamiento anormal de la cromatina, tiene como principio desnaturalizar la molécula de ADN con una solución ácida para posteriormente teñirla con anaranjado de acridina (AO) (Morales y cols., 2007). El AO permite distinguir entre una región del espermatozoide desnaturalizada (fluorescencia roja, asociado a hebra única) y una nativa (fluorescencia verde, asociado a doble hebra). Los espermatozoides que se tiñen de rojo se consideran como fragmentados y los verdes con ADN intacto (Fig.3). El nivel de rupturas en el ADN se expresa por el índice de fragmentación de ADN (DFI), que es la razón de los rojos entre el total (rojos más verdes) (Bungum y cols, 2004).

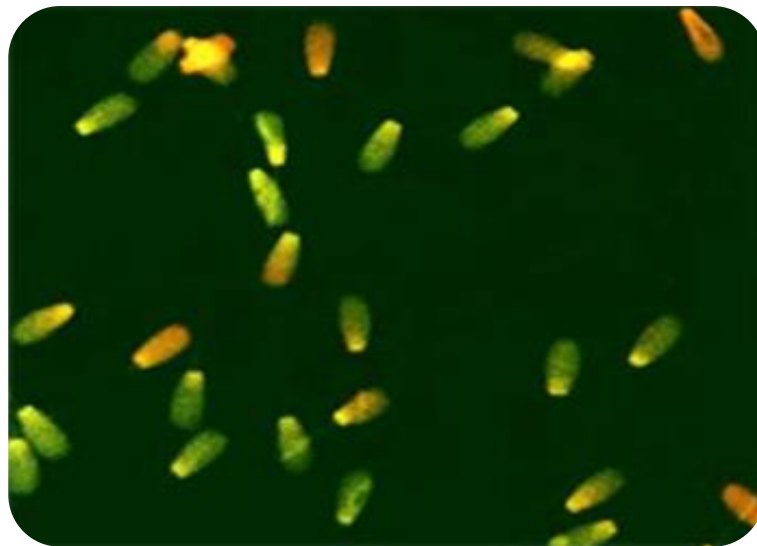


Fig. 3 Imagen del ensayo de la estructura de la cromatina en un microscopio de fluorescencia, donde se observan espermatozoides con ADN integro (células verdes) y con ADN fragmentado (células rojas).

### 1.5.2.2 DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD)

Con este método se descondesa diferencialmente la cromatina de los espermatozoides con ADN fragmentado. Después se somete a un medio ácido y

después a una desproteinización, para que los espermatozoides con fragmentación no liberen las hebras de ADN y así no generen un halo de dispersión (Fig. 4). Aquí las células que presentan halo se consideran con ADN íntegro (Morales y cols., 2007).

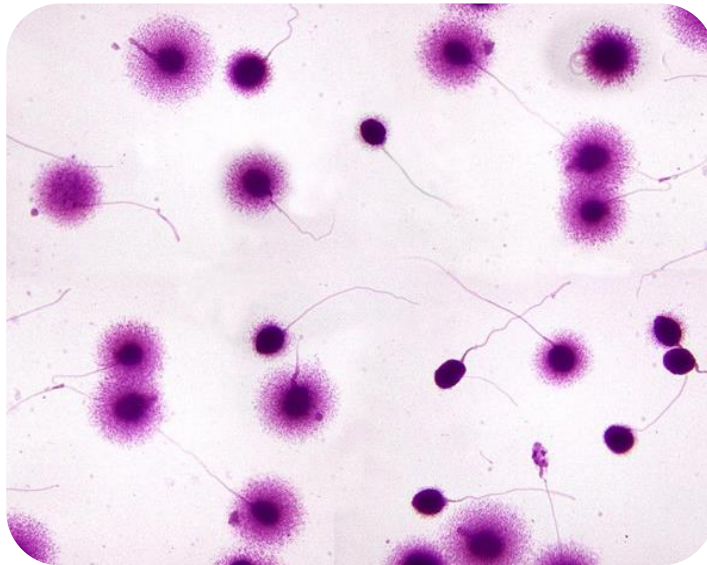


Fig. 4 Imagen del método de dispersión de la cromatina. Se observan dos tipos de células: con ADN íntegro (con dispersión) y ADN fragmentado (sin dispersión).

#### 1.5.2.3 ELECTROFORESIS DE CÉLULA ÚNICA (ENSAYO COMETA)

En esta técnica las células se incluyen en un microgel de agarosa hecho en un portaobjetos, después se realiza una lisis y de ahí una electroforesis para finalizar con un teñido con fluorocromos, el más usado es el anaranjado de acridina (fig, 5). El ADN fragmentado migra hacia el lado positivo por efecto del campo eléctrico y se forman colas o halos (Cortés y cols., 2007). La electroforesis se puede dar en un medio alcalino o neutral. El medio neutral fue el primero en utilizarse, pero el alcalino es más utilizado porque es capaz de detectar sitios alcalinos poco estables. La fragmentación de ADN está relacionado con el tipo de roturas de ADN (sencillas o dobles) y su susceptibilidad. La prueba Cometa con pH alcalino requiere un una previa desnaturalización para detectar fragmentos, en cambio, cuando se realiza con pH neutro, no es necesario este paso y se miden las roturas

verdaderas o el daño “real” (Álvarez, 2007). Debido la forma de dispersión de ADN fragmentado en forma de cometa que se observa, se le conoce como prueba Cometa (Cortés y cols., 2007).

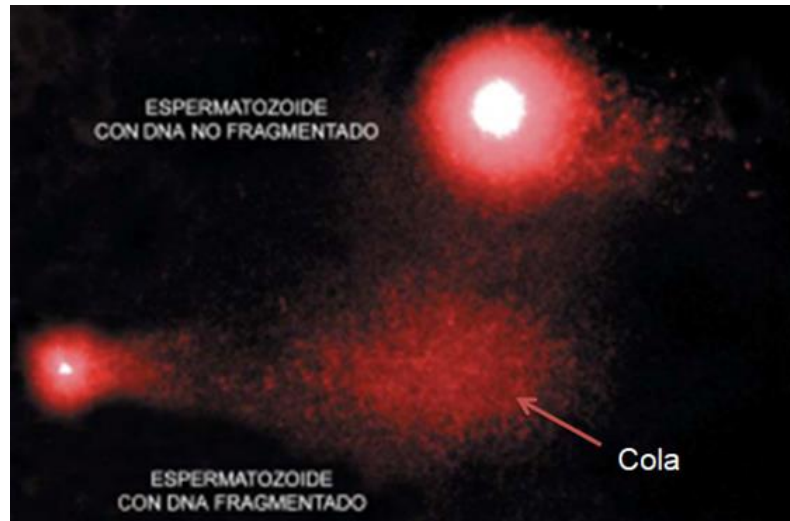


Fig. 5 Imagen de la electroforesis de célula única a través de un microscopio de fluorescencia. En el lado superior derecho reobserva un espermatozoide intacto, ya que no presenta migración de ADN como es el caso del espermatozoide de lado inferior izquierdo que presenta una “cola”.

#### 1.5.2.4 MARCAJE DE SITIO TERMINAL A TRAVÉS DE DESOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA (TUNEL)

Esta prueba incorpora nucleótidos marcados con fluorocromos en los extremos 3'-OH presentes en las roturas del ADN. El proceso realiza una reacción por una transferasa terminal (Deoxynucleotidyl Transferase), y su señal o intensidad de fluorescencia representa la fragmentación del material genético (Fig. 6; Morales y cols., 2007).

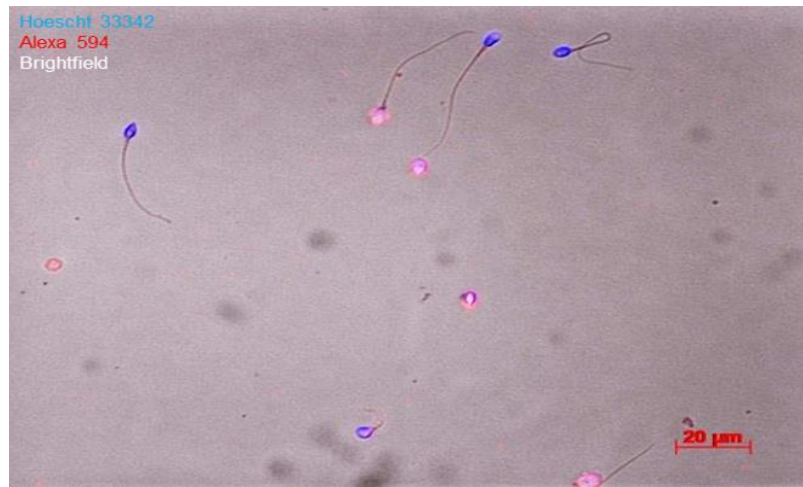


Fig. 6 Prueba TUNEL en espermatozoides. Las partes teñidas de rojo son las que se encuentran fragmentadas y las que están en color azul están intactas.

Las pruebas de fragmentación de ADN tienen ventajas y desventajas. La prueba TÚNEL es muy confiable ya que nos permite reconocer sitios de fragmentación de doble cadena o de cadena única, pero al tener un precio elevado se utilizará en este trabajo como confirmación de una técnica más utilizada por su bajo costo: el ensayo COMETA.

Estas técnicas y otras han sido parte de diversos estudios, como en el realizado por Ribas-Maynou y colaboradores en 2013, sobre la fertilidad masculina y el papel que juegan los hábitos alimenticios y la exposición a plastificantes en ella.

## 2. ANTECEDENTES

Diversos estudios han mostrado que los factores que predisponen a la obesidad pueden afectar la calidad espermática.

En un estudio con hombres presentaban sobrepeso u obesidad (IMC>25%), estos no presentaron diferencias significativas en parámetros del análisis espermático como concentración de espermatozoides, morfología y motilidad. Pero se encontró una concentración elevada de estradiol en suero, por el contrario los niveles de testosterona, hormona leutinizante (LH) e inhibina B disminuyeron (Chavarro y cols., 2010). Esto coincide con otro con hombres obesos que reportaron oligozoospermia y niveles elevados de FSH, LH, estradiol, prolactina y leptina. La leptina se correlacionó positivamente con morfología anormal, también afectando negativamente la concentración espermática y motilidad (Hofny y cols., 2010). De igual manera, un grupo de ratas con una dieta alta en grasa tuvieron un aumento de peso y de los niveles de leptina y estradiol y bajos niveles de testosterona (Isidori y cols, 1999).

Otro estudio se encontró que un exceso de producción de leptina, por parte del tejido adiposo, tiene efectos negativos en la producción de espermatozoides e inducía apoptosis en células germinales (Pauli y cols, 2008). Además de estos efectos, también se presentaron afectaciones en la respiración mitocondrial, niveles bajos de ATP y aumento del estrés oxidativo (Ferramosca y cols., 2016).

Se realizó un estudio, donde se mostró que la actividad mitocondrial del espermatozoide era más baja en hombres con obesidad, los cuales también presentaron niveles más altos de ROS y células con fragmentación de ADN. Mostrando que la disfunción mitocondrial también puede ser responsable de una baja calidad espermática en hombres con un índice de masa corporal alto (Yang y cols., 2016), lo que coincide con otros estudios como los de Tunc y cols en 2011 y Kort y cols, en 2006. Aunque en el estudio de Tunc no se relacionó un aumento en ROS con integridad del material genético afectada ni

con motilidad baja. También estudios como el de Chavarro *et al.*, en 2010, y de Dupont *et al.*, en 2013, afirman que la obesidad en hombres se relaciona con un conteo espermático bajo y mayor daño en el ADN que en hombres con peso normal.

La relación de los hábitos alimenticios y un IMC alto con la reproducción es muy estudiada, pero los trabajos sobre el efecto de los disruptores endócrinos como ftalatos y el BPA en la reproducción no son tan comunes. La mayoría hablan sobre la exposición materna en etapas prenatales, por ejemplo, un estudio midió la asociación de ftalatos con el coeficiente intelectual de niños de 7 años. Se encontró que los ftalatos afectaban reduciendo la velocidad de procesamiento, el razonamiento perceptual, la memoria y la comprensión verbal (Factor-Litvak y cols., 2014).

En otro trabajo más enfocado en la infertilidad masculina, se quiso determinar cómo la exposición al BPA puede afectar la capacidad reproductiva. Se concluyó que una exposición a 100 uM de BPA disminuye el porcentaje de motilidad y el porcentaje de producción de ATP en el espermatozoide. Pero no se encontró cambio en la producción de ROS en el espermatozoide expuesto a BPA (Md Saidur y cols, 2014).

No existen muchos trabajos del efecto del polipropileno en la salud, debido a que es considerado un plástico seguro. Sin embargo, se realizó un estudio en *Daphnia magna* donde se comparó la toxicidad de la lixiviados de productos plásticos de polipropileno, polietileno, PVC (policloruro de vinilo), acrilonitrilo-butadieno-estireno y epoxi. Los resultados mostraron que los lixiviados de PVC y epoxi si son tóxicos, pero el polipropileno no mostró toxicidad (Lithner y cols., 2012). Pero los tubos de polipropileno nuevos pueden afectar el crecimiento y reproducción de *D. magna*, ya que los tubos nuevos (no lavados previamente) produjeron un retraso en la maduración y en la reproducción de las larvas (Cuhra y cols, 2017).

Además de conocer el efecto que tienen los factores ambientales en la reproducción masculina, donde se toman en cuenta parámetros del análisis espermático clásico, es necesario considerar el análisis de la fragmentación de ADN que es una herramienta útil para conocer la calidad espermática. Se realizó un meta-análisis del efecto de la fragmentación en las tasas de embarazo después de una técnica de reproducción asistida (TRA) y se encontró que sí hay correlación en la disminución de embarazos y el aumento en los abortos con el alto daño en el ADN. La fecundación *in vitro* afecta directamente a los embarazos y el aumento de la tasa de aborto, mientras la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI) sólo afecta la tasa de aborto (Zhao y cols., 2014).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el estilo de vida de la población mundial está teniendo repercusiones negativas en la salud. La mala alimentación y la exposición a plastificantes está en aumento. De igual manera, la tasa de infertilidad masculina se está incrementando, y cada día hay más estudios que muestran como el factor ambiental está provocando no sólo que disminuya la capacidad de concebir hijos, sino que su desarrollo embrionario llegue a término y sean sanos. Por lo que se hace necesario continuar en la búsqueda del origen del problema y así entender cómo los malos hábitos afectan la descendencia. Lo que nos lleva a preguntar si el sobrepeso y el consumo de plastificantes provocan alteraciones en la calidad espermática y en su integridad genética.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los hábitos alimenticios y el estilo de vida que lleva la población está provocando cambios fisiológicos en el organismo, que conllevan a múltiples patologías, dentro de las cuáles están las de índole endocrinológico. La exposición a ciertas sustancias químicas presentes en los alimentos y utensilios de uso diario también causan problemas en la salud, principalmente provocando daños en el sistema hormonal porque son disruptores endocrinos. Dicho daño hormonal que se ocasiona por estos dos factores tiene consecuencias en el aspecto reproductivo de los humanos ya que la capacidad para concebir disminuye y es más difícil cursar un embarazo a término o bien, los productos pueden presentar problemas de salud posteriores al nacimiento. El problema afecta tanto a mujeres, como a hombres, se describe que del 40 al 50% de los problemas de fertilidad dependen del hombre (Bonet, 2016). Las consecuencias que esta problemática puede tener en la sociedad va más allá de cuestiones emocionales que padecen las familias con esta situación, se trata de un problema que tiene un impacto económico para la familia el costo de una TAR en el sector privado oscila entre 30,000 y 100,000 pesos mexicanos (reproducción-asistida.mx, 2018).

La evaluación de la fragmentación de ADN es importante, porque permite conocer la calidad de la información genética; una tasa alta de fragmentación de ADN espermático se ha relacionado con infertilidad, abortos o enfermedades perinatales principalmente a nivel cognitivo. Por lo que es de suma importancia saber si el sobrepeso y el consumo de plastificantes están afectando la calidad espermática. Esto a través de un estudio que vaya más allá de los parámetros clásicos que indican la capacidad de fecundar a un óvulo. En esta investigación se estudia el daño que representan estos dos factores en el ADN, lo que nos proporciona información del impacto que tienen en la célula espermática. Además evalúa de manera objetiva y cuantitativa la integridad genética de los gametos masculinos, que permite una mayor aproximación a la capacidad que tiene un espermatozoide para culminar en un producto sano.

## 5. HIPÓTESIS

El sobrepeso y el consumo de plastificantes durante 30 días inducen alteraciones en la calidad espermática de ratones de 8 semanas de la cepa CD-1.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

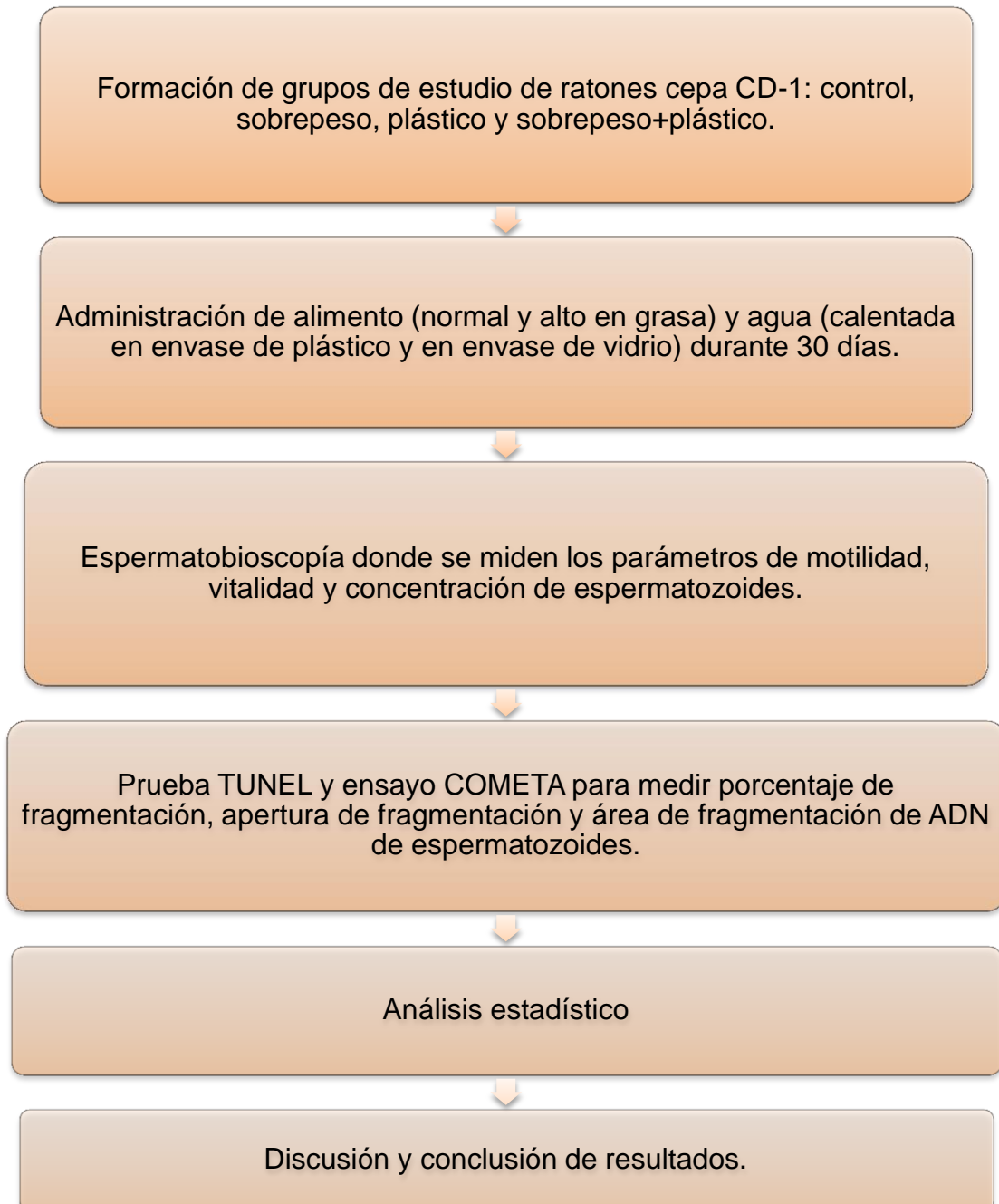
Analizar la calidad espermática de ratones de 8 semanas de edad de la cepa CD-1 que tuvieron una ingesta alta en grasas y consumieron agua con plastificantes durante 30 días.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- \* Evaluar los efectos de la ingesta alta en grasa y el consumo de plastificantes sobre la concentración espermática del ratón.
- \* Evaluar los efectos de la ingesta alta en grasa y el consumo de plastificantes sobre la motilidad en espermatozoides del ratón.
- \* Evaluar los efectos de la ingesta alta en grasa y el consumo de plastificantes sobre la vitalidad espermática del ratón
- \* Evaluar los efectos de la ingesta alta en grasa y el consumo de plastificantes sobre la integridad del ADN espermático en células de ratón de la cepa CD-1.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 DIAGRAMA DE TRABAJO



## 7.2 MODELO ANIMAL

El presente trabajo se realizó en ratones macho de la cepa CD-1, de ocho semanas de edad con un peso inicial promedio de 36.2 g. Seleccionados de manera aleatoria y separados en cajas de plástico en grupos, de 4 a 5 ratones por caja por lo que se ocuparon 20 ratones en total. Los grupos de estudio fueron los siguientes: Sobrepeso (SP), Plástico (P), Sobrepeso y plástico (SP+P) y control, donde se espera un peso normal (C). El peso de un ratón macho de la cepa CD-1 de 8 semanas es de 30-35 g. Y a las 12 semanas de 35-40 g (River C., 2018). El peso de los ratones se midió con una báscula digital.

La disposición de agua y alimento fue libre las 24 horas. El ciclo de luz: oscuridad fue de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

## 7.3 INDUCCIÓN DE SOBREPESO

A los animales del grupo sobrepeso (SP) y sobrepeso+plástico (SP+P) se les administró alimento de tipo croqueta para perro adulto, el cual se escogió por tener un alto porcentaje de grasa y presenta el siguiente análisis bromatológico.

Análisis bromatológico:

Proteína cruda (19%), fibra cruda (5%), cenizas (9%), fósforo (0.8%), grasa cruda (7.5), humedad (12%) y calcio (2%).

El grupo plástico (P) y control consumieron pellets estándar para ratón durante 30 días.

#### 7.4 ADMINISTRACIÓN DE PLASTIFICANTE

El agua con plastificantes se obtuvo a través del calentamiento de agua purificada en recipientes de polipropileno (PP) con una capacidad de 1200 ml dentro de un microondas a 1000 watts de potencia durante 4 minutos donde el agua alcanzó una temperatura de 93° C. Se envasó el agua en frascos de plástico, también de PP. Esta agua se administró a los grupos S+P y P a través de un bebedero para roedores de vidrio.

Por otro lado, a los grupos S y control se les administró agua purificada calentada en el mismo microondas a 1000 watts de potencia por 4 minutos en un recipiente de vidrio y alcanzó una temperatura de 87° C, para su posterior envasado en frascos de vidrio e igualmente administrado a través de bebederos de vidrio para roedores. El tratamiento se llevó a cabo durante 30 días.

Es importante resaltar que el agua utilizada para los 4 grupos provenían del mismo garrafón.

#### 7.5 OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Primero se realizó el sacrificio de los animales, a través de la técnica de dislocación cervical y posterior a eso se realizó una extracción de los epidídimos por disección. Para recuperar las células se realizó una perfusión con una jeringa de insulina a través del conducto deferente en los epidídimos con el medio de cultivo STOREY. El líquido resultante de la perfusión se recolectó en frascos de vidrio de 5 ml de capacidad.

#### 7.6 ANÁLISIS DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

Para analizar la calidad espermática se realizó una espermatobioscopia (motilidad, vitalidad y conteo espermático). Y para un estudio más exhaustivo se realizaron las pruebas de fragmentación de de ADN utilizando las pruebas Cometa y TUNEL.

#### 7.7.1 CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Para obtener este parámetro se llevó a cabo el conteo de espermatozoides en una cámara de Neubauer. Se colocaron en un tubo eppendorf 190  $\mu\text{L}$  de solución contadora de espermatozoides y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se puso en la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de espermatozoides en 5 cuadros medianos aleatoriamente seleccionados para obtener el número de espermatozoides (en millones) por ml de muestra.

#### 7.7.2 MOTILIDAD

Para realizar esta prueba se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra obtenida por perfusión de los epidídimos y se colocaron en un portaobjetos con un cubreobjetos de 22x22 mm para ser observados a través de un microscopio con contraste de fases (Nikon Labophot®) en un objetivo de 20X. Se analizaron 5 campos aleatorios contabilizando células con tres tipos de movimientos: las células con movimiento progresivo (A) que son las que tienen movimiento flagelar y desplazamiento, con movimiento *in situ* (B) que tienen movimiento flagelar sin desplazamiento y por último células inmóviles (C).

Se contaron el número de campos que fueran necesarios para alcanzar un total de 200 células. Por último se calculó el porcentaje de cada tipo de células (A, B o C). Después se calculó el valor de movilidad total con la suma de los porcentajes de las células que presentaron movimiento progresivo más las de *in situ*.

### 7.7.3 VITALIDAD

Para la prueba de vitalidad se utilizó el kit Live/Dead Sperm Viability Kit (Invitrogen®) y siguiendo las instrucciones del fabricante: las alícuotas de espermatozoides (100 µl) fueron teñidos con 10 µl de yoduro de propidio y 10 µl de SYBR 14 e incubados a temperatura ambiente por 7 minutos. Después una alícuota fue colocada en un portaobjetos y visualizada bajo un microscopio de epifluorescencia utilizando los filtros de excitación a 488 y 533 nm. Las células fueron analizadas utilizando un objetivo de 40X y se cuantificaron las células viables (verdes) y no viables (rojas) sumando un total de 200 células, posteriormente se calculó el porcentaje de células viables.

### 7.7.4 PRUEBA COMETA

Se realizó la electroforesis de célula única con geles de agarosa de 4% con punto de fusión normal y 3% con bajo punto de fusión. El primer gel que se puso en el portaobjetos contiene 0.20 g de agarosa de punto normal de fusión, 5 ml de solución de TAE 0.5X (Anexo 12.2) y 1.5 ml de agua desmineralizada. Y se colocaron 200 µL de este gel y se recubrió con un cubreobjetos de 22x40 mm. Se esperó aproximadamente 3 minutos a que el gel se solidificara para poner la segunda capa de gel.

Esta segunda capa consiste en 0.15 g de agarosa de bajo punto de fusión con 5 ml de TAE 0.5X. Se hizo una proporción de 350 µL de muestra por 125 µL de gel, de aquí se toman 200 µL de esta mezcla y se colocan encima de la primera capa. Se dejó reposar 5 minutos en el congelador para una solidificación más rápida. Una vez que los geles se encuentran sólidos se retira el cubreobjetos con cuidado para pasar a la lisis de membrana.

Para la lisis de membrana se preparó al instante una solución con 5 ml de Buffer de lisis (Anexo 12.3), preparado previamente, y 7.7 mg de dithiothreitol (DTT,

marca SIGMA). Se recubrió a los geles con este buffer y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora.

Una vez transcurrida esa hora, se colocaron los portaobjetos en la cámara de electroforesis, se sumergieron en TAE 0.5X y se realizó la electroforesis a 50 V y 300 mA por 20 minutos. Al concluir este tiempo, se realizó un lavado de los portaobjetos con Tris.

Posteriormente, se lleva a cabo una tinción con 100  $\mu$ L de Hoesch 1:5000 y se dejó incubar durante 15 minutos protegiéndolos de la luz. Después se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, se colocaron los cubreobjetos y fueron analizados bajo el microscopio de fluorescencia. Se utilizó un objetivo de 40X, se tomaron en cuenta 3 tipos de células principales: intactas, con dispersión y cometas. Se contaron en total 200 células

Se calculó el porcentaje de cada tipo, para conocer el número de células fragmentadas totales se sumaron los porcentajes de las células dispersas y cometa.

#### 7.7.5 PRUEBA TUNEL

El ensayo COMETA es muy utilizada por su bajo costo, pero el análisis de las imágenes es muy subjetiva. Por lo que se utilizó la prueba TUNEL para confirmar los resultados ya que esta es más precisa y objetiva. El primer paso que se realizó es el frotis, en un portaobjetos previamente limpio, se colocaron 7  $\mu$ L de muestra y se dejó secar en la estufa a 37°C aproximadamente y con flujo de aire.

Una vez seco, se colocó en el Thermomixer comfort (marca eppendorf) y se bañó la muestra con 100  $\mu$ L de paraformaldehido, dejándose incubar durante 15 minutos a 24°C. Posteriormente, se realizó un lavado de 5 minutos con PBS.

Después se agregó 100  $\mu$ L de PBS-tritón durante 20 minutos a 24°C y se lavó con agua desmineralizada 2 veces por 2 minutos cada lavado.

Para realizar las reacciones siguientes se utilizó el kit Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay de la marca Invitrogen®. Se utilizaron los reactivos del kit y se siguió el manual para realizar la reacción TdT. La reacción Click-iT y el teñido de ADN con la solución Hoechst 33342. Finalmente se realizó el análisis de las laminillas. A partir del análisis de las imágenes de la prueba TUNEL se hizo un comparativo de la intensidad de Alexa Fluor, fluorocromo que se une a ADN. Ya que una mayor intensidad de fluorescencia indica mayor fragmentación de ADN espermático.

#### 7.7.5 ANÁLISIS DE LAS FOTOGRAFÍAS

Para la prueba COMETA y TUNEL se tomaron fotografías con el microscopio X, y estas fueron analizadas con el programa ZEN Blue Edition de ZEISS®. En la prueba COMETA se midieron los siguientes parámetros: área de la célula ( $\mu\text{m}^2$ ), intensidad de fluorescencia del área de la célula, área de fragmentación ( $\mu\text{m}^2$ ) y diámetro de fragmentación ( $\mu\text{m}$ ; Fig. 7). Con las mediciones de área de célula (AC) y área de fragmentación (AF) se hizo un cálculo restando la segunda de la primera (AF-AC) para por conocer únicamente el área fragmentada, donde está el ADN disperso. A este parámetro se le llamó fragmentación.

Para la prueba TUNEL sólo se midieron el área de la célula y la intensidad (Fig.8).

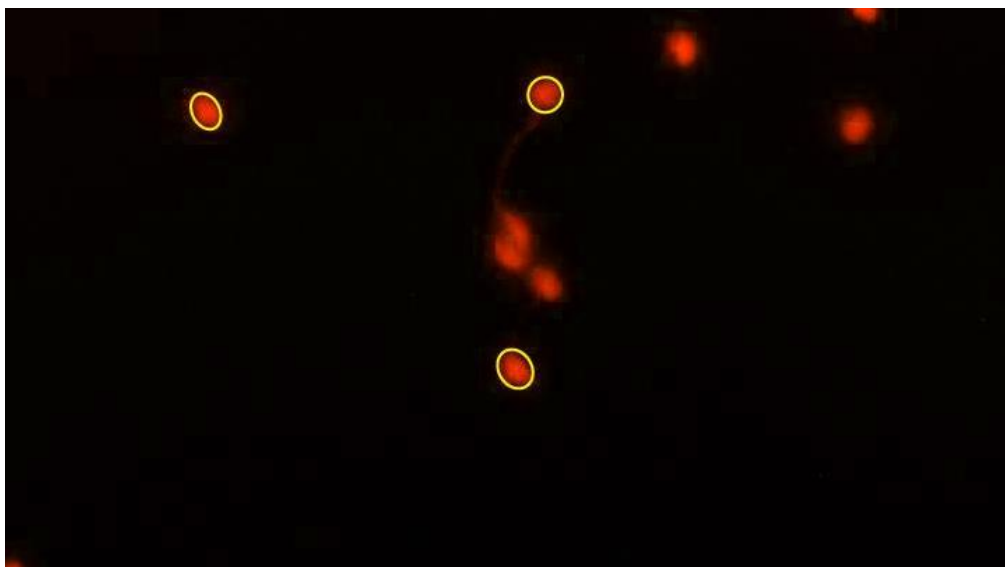


Fig. 7 Prueba COMETA de espermatozoides de grupo plástico. Mediciones con el programa Zen Blue. A) Área celular o nuclear, B) la línea amarilla representa la apertura de fragmentación, C) área de fragmentación. En el programa Zen, al medir el área se cuantificó la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

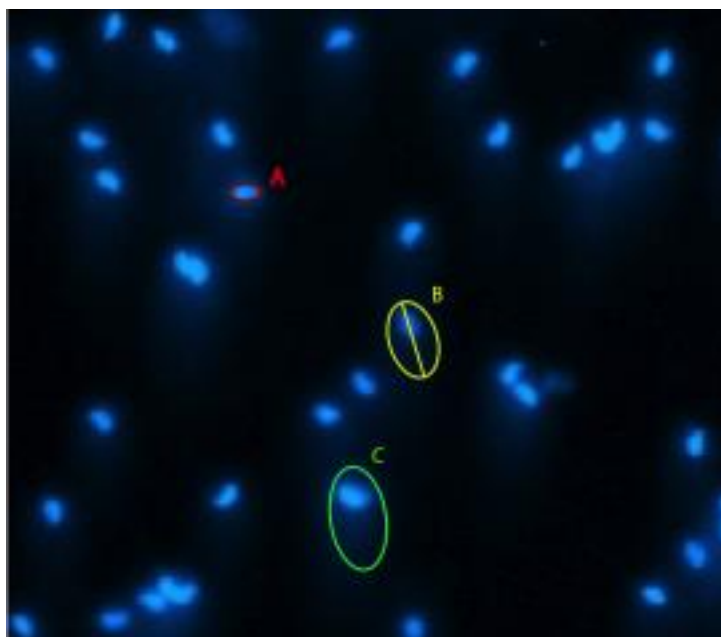


Fig. 8. Prueba Túnel. Medición de la intensidad de fluorescencia con el programa ZEN Blue. Se contorneó manualmente a los espermatozoides y el programa arrojó la intensidad en una tabla.

### 7.7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los parámetros de motilidad, vitalidad, concentración espermática, conteo de células en la prueba TUNEL y COMETA se llevaron a cabo pruebas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) en el programa R, versión 2.5.

Para los resultados obtenidos durante el análisis de las fotografías se realizó una T de Student ( $\alpha=0.05$ ), nuevamente con R

## 8. RESULTADOS

### 8.1 PESO DE RATONES

El peso inicial promedio de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P fue  $30.25 \pm 0.75$ ,  $32.8 \pm 0.80$ ,  $31.5 \pm 1.55$  y  $29.4 \pm 1.17$  g, respectivamente. Y el peso final promedio, en el mismo orden, fue de  $35.25 \pm 1.38$ ,  $37.2 \pm 1.39$ ,  $36.75 \pm 0.48$  y  $35 \pm 0.84$  g. El peso ganado en promedio de los grupos control (5 g.), sobrepeso (4.4 g.), plástico (5.25) y S+P (5.6) se grafica en la fig. 9. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.86$ ), ni al comparar los grupos S, P y S+P con el control ( $p= 0.61$ ,  $p=0.88$ ,  $p=0.90$ , respectivamente), ni al compararlos entre ellos S contra P ( $p=0.32$ ), S contra S+P ( $p=0.80$ ) y P contra SP ( $p=0.90$ ).

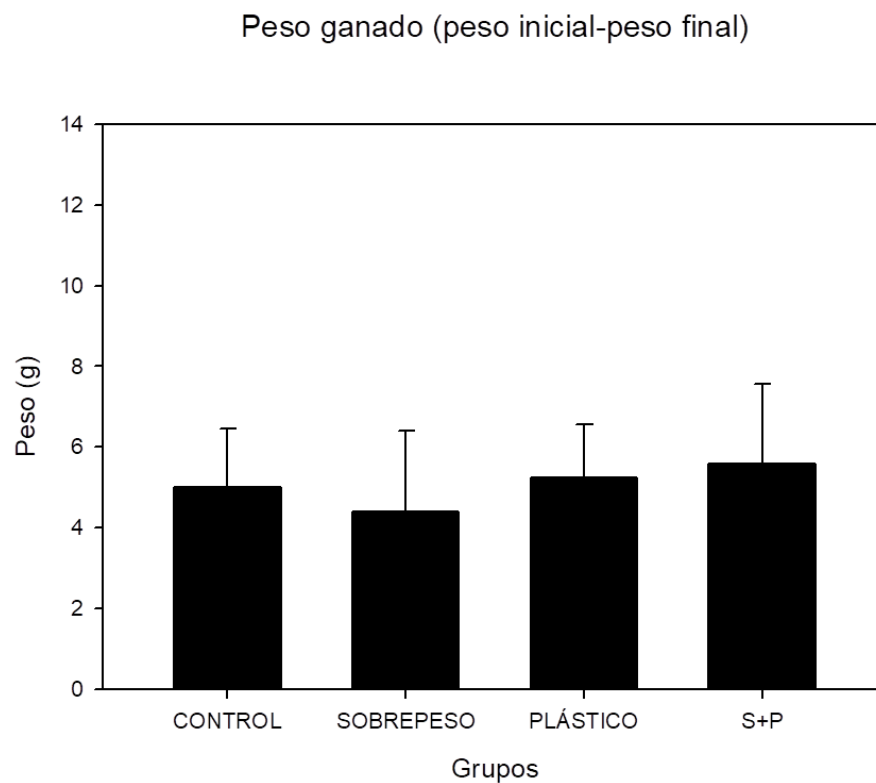


Fig. 9. Comparación del peso ganado promedio por grupo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 8.2 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La concentración espermática indica el número de espermatozoides por mililitro (millones por mililitro).

De acuerdo al conteo, el grupo con una concentración mayor, fue el de S+P en donde su media  $\pm$  error estándar, respectivamente, fue de  $21.7 \pm 1.72$ , por el contrario, el tratamiento que tiene un conteo espermático menor es el de Sobrepeso ( $7.5 \pm 1.72$ ). El grupo control tuvo una media de  $17.62 \pm 1.60$ .

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, sí existen diferencias entre los grupos ( $p=0.02$ ). El grupo de sobrepeso tuvo una diferencia significativa ( $p=0.009$ ) respecto al control, mientras que con los grupos plástico ( $p=0.75$ ) y S+P ( $p=0.32$ ) no hay. Se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo sobrepeso con el grupo plástico ( $p=0.02$ ) pero no con el grupo S+P ( $p=0.46$ ), también existen diferencias significativas entre el grupo sobrepeso y S+P ( $p=0.04$ ) (fig.10).

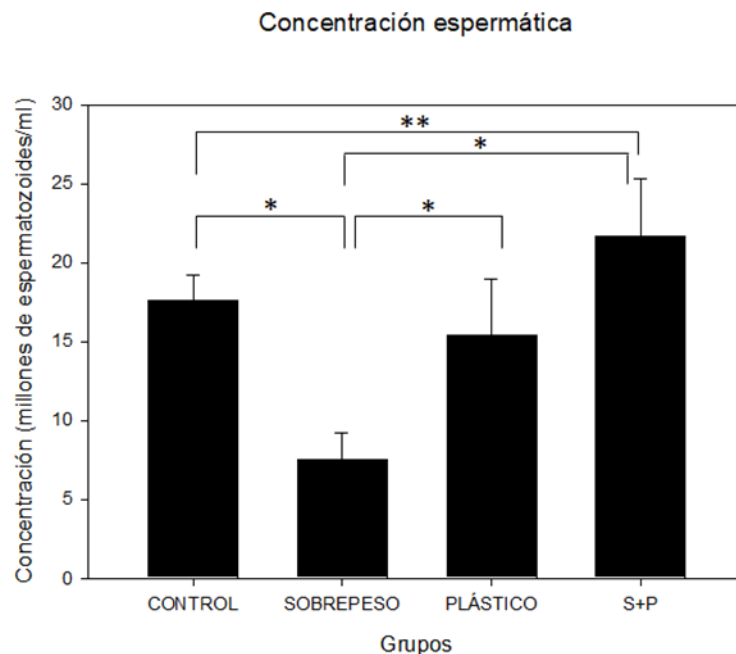


Fig. 10 Comparación del concentración espermático entre los grupos control, sobrepeso, plástico y sobrepeso más plástico. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media de la concentración espermática. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa (\*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$ ).

### 8.3 MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Para la movilidad espermática se tomaron en cuenta tres tipos de movimiento: progresivo, *in situ* e inmóvil. Los resultados muestran que hay una reducción en la capacidad de los espermatozoides para desplazarse en el grupo Sobrepeso con una media  $\pm$  error estándar de  $33.03 \pm 10.36$  células móviles. También se observa una tendencia a disminuir la movilidad de las células en el grupo P ( $43.32 \pm 15$ ). Mientras que el grupo S+P y control tuvieron una media de  $58.16 \pm 3.21$  y  $56.1 \pm 5.73$ , respectivamente. Al realizarse la prueba de Kruskal-Wallis se encontró que hay diferencias significativas ( $p=0.01$ ) entre el grupo control y el sobrepeso. Esto puede estar indicando que el sobrepeso afecta a la movilidad de los espermatozoides (Fig. 11).

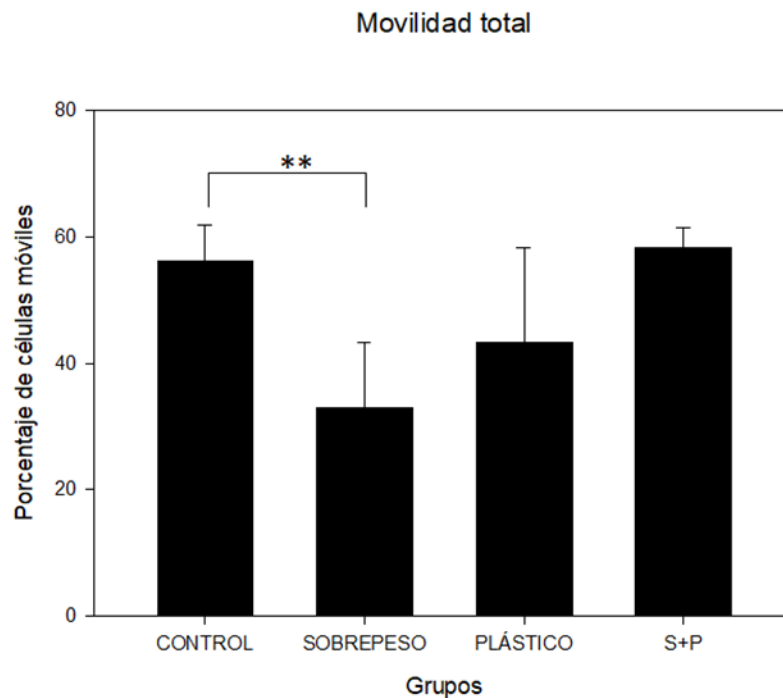


Fig. 11 Comparación de la movilidad total entre los grupos control, sobrepeso, plástico y sobrepeso más plástico. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del porcentaje de células móviles. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa ( $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ ) por estadístico de Kruskal-Wallis.

#### 8.4 VITALIDAD ESPERMÁTICA

Se calculó la media del porcentaje de células vivas y el error estándar de los tratamientos. El grupo que se vio más afectado por los tratamientos fue el del plástico ( $9.25 \pm 4.82$ ). Por otro lado, las medias de los grupos S ( $19.4919 \pm 4.89$ ) y S+P ( $21.2 \pm 2.70$ ). Hay diferencias significativas en la comparación control-plástico ( $p=0.03$ ) y control-S+P ( $p=0.01$ ) y también se encuentran al comparar el grupo plástico contra el S+P ( $p=0.05$ ). Es notable que los tres tratamientos tienen un impacto en la viabilidad, aunque el grupo de sobrepeso no presentó una diferencia significativa ( $p=0.46$ ), pero sí muestra una tendencia a la disminución del porcentaje de células vivas (fig. 12).

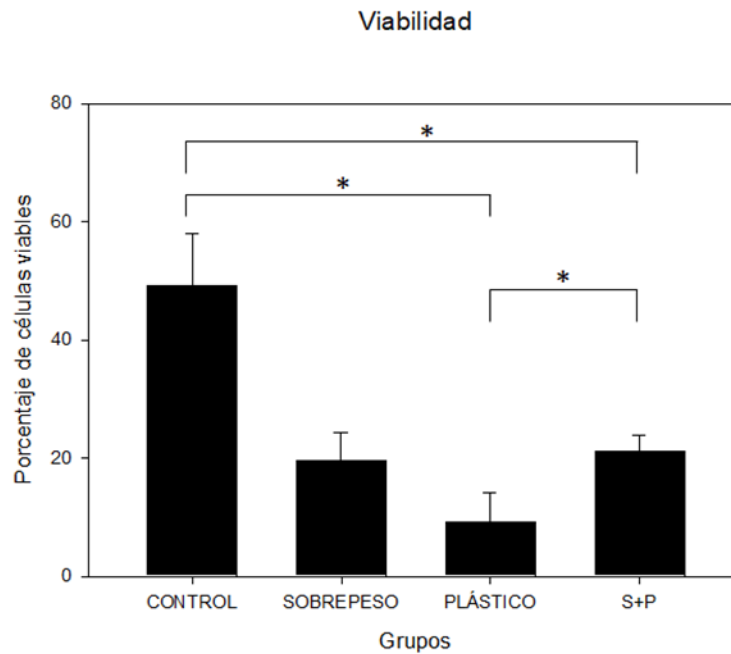


Fig. 12 Comparación del porcentaje de células vivas entre los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del porcentaje. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa ( $*=p<0.05$ ) por estadístico de Kruskal-Wallis.

## 8.5 FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

### 8.5.1 PRUEBA COMETA

Durante el conteo de células se obtuvieron los siguientes resultados (Fig 13):

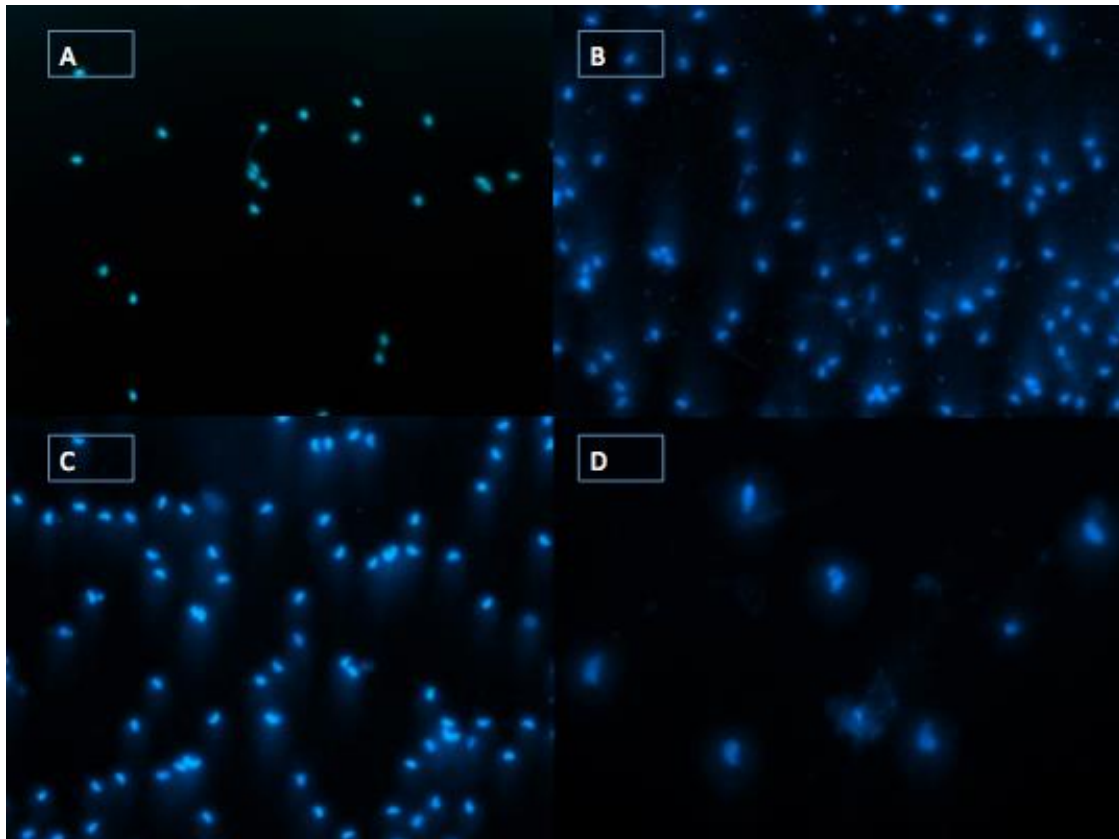


Fig. 13 Resultados de la prueba COMETA por grupos: A) Control, B) Plástico, C) Sobrepeso y D) Sobrepeso+Plástico. En la imagen aA) son células intactas, en la B) y C) hay células cometas y dispersas, por último en la D) son únicamente dispersas.

La media y el error estándar de las células fragmentadas del grupo control fue de  $21.5 \pm 7.78$ . Los demás grupos sobrepeso, plástico y S+P tiene un media aproximadamente 6 veces mayor ( $126.4 \pm 17.87$ ,  $175.33 \pm 23.67$  y  $127.9 \pm 29.78$ ,

respectivamente), eso quiere decir que el sobrepeso y el consumo de plastificantes está fragmentando a las células.

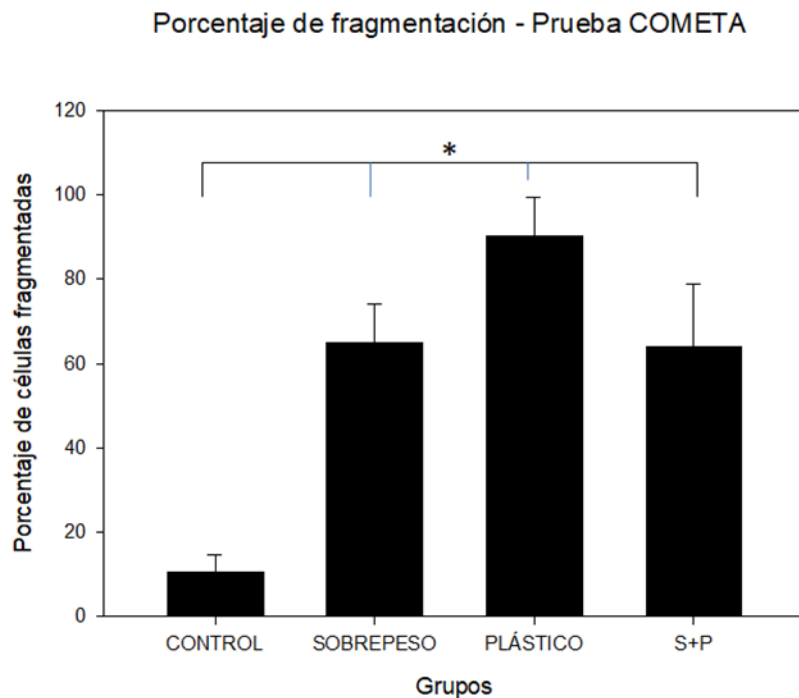
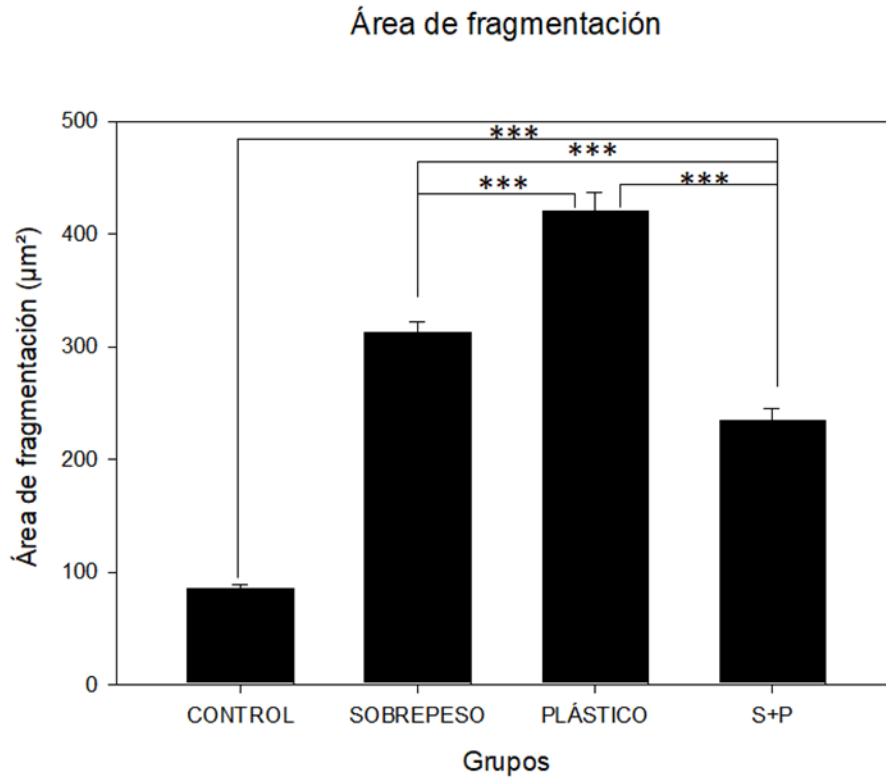


Fig. 14 Comparación de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos expresan la media y el error estándar del porcentaje de células fragmentadas. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa ( $*=p<0.05$ ) entre estos grupos.

Los tres grupos experimentales (S, P y S+P) mostraron diferencias significativas ( $p=0.01$ ,  $p=0.01$  y  $p=0.03$ , respectivamente) respecto al control, se observa una tendencia de los tratamientos a fragmentar las células, en la gráfica el grupo de plástico es el que presenta más fragmentación (fig14).

## 8.5.2 ÁREA DE FRAGMENTACIÓN

Con el cálculo de la media y el error estándar, se pudo observar que el grupo con mayor área de fragmentación fue el del plástico ( $420.51 \pm 16.371$ ), después el grupo de sobrepeso ( $312.16 \pm 9.71$ ), el S+P ( $234.22 \pm 10.46$ ) y por último del grupo control con  $85.75 \pm 3.14$ . Entonces los grupos experimentales tuvieron un área de fragmentación casi tres veces mayor que el grupo control; los tres grupos presentaron diferencias significativas respecto al control ( $p=2.2e^{-16}$ ) y entre los grupos (comparación S-S+P:  $p<0.001$ , S-P:  $p<0.001$ , P-S+P:  $p=0.001$ ; fig. 15).



Fig, 15

Comparación de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos expresan la media y el error estándar del área de fragmentación. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa ( $***p<0.001$ ) entre estos grupos.

### 8.5.3 FRAGMENTACIÓN

De acuerdo al cálculo de la media y el error estándar, el grupo con mayor área de fragmentación fue el Plástico ( $359.46 \pm 16.15199 \mu\text{m}^2$ ), después el grupo de Sobrepeso ( $255.48 \pm 9.41 \mu\text{m}^2$ ) y el S+P ( $177.21 \pm 9.95 \mu\text{m}^2$ ). Los tres grupos experimentales tuvieron una fragmentación 4 veces mayor, aproximadamente respecto al control ( $53.79 \pm 2.99 \mu\text{m}^2$ ).

Los resultados muestran que hay diferencias significativas entre el grupo control con los grupos S, P y S+P ( $p < 2.22e^{-16}$ , para los tres) y entre los grupos (comparación S-S+P:  $p < 0.001$ , S-P:  $p < 0.001$ , P-S+P:  $p < 0.001$ ; fig. 16).

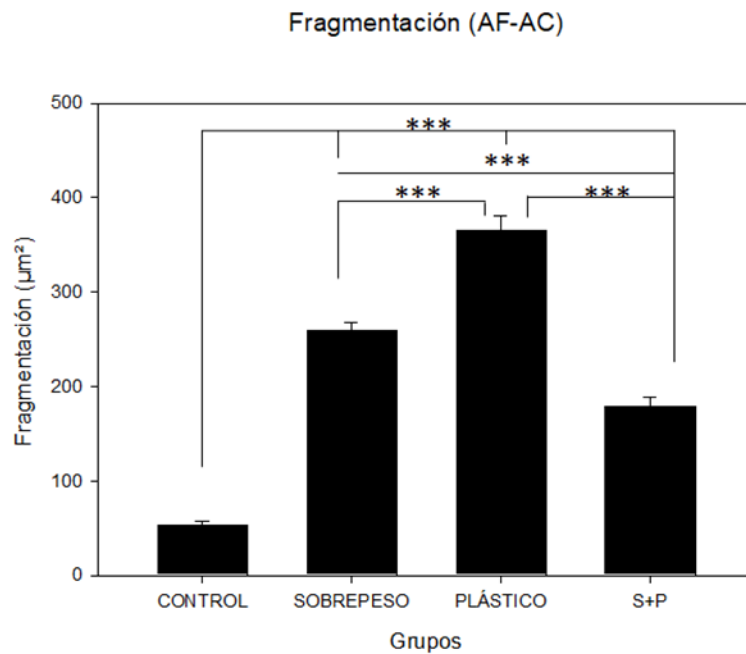


Fig. 16 Comparación de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos expresan la media y el error estándar de la fragmentación (AF-AC) en  $\mu\text{m}^2$ . Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa (\*\*= $p < 0.001$ ) entre estos grupos.

#### 8.5.4 APERTURA DE FRAGMENTACIÓN

Se calculó la media y el error estándar, el grupo control tuvo una apertura media de  $11.75 \pm 0.157$ . Los grupos Sobrepeso, Plástico y S+P tuvieron casi el doble de apertura de fragmentación ( $25.262 \pm 1.44$ ,  $25.29 \pm 0.80$  y  $18.22 \pm 0.33$ , respectivamente). Por lo que el grupo con mayor apertura fue el de Plástico.

Los tres grupos experimentales (S, P y S+P) presentaron diferencias significativas comparados con el control ( $p < 2.2e^{-16}$  para los tres grupos) (y entre sí mismos (comparando S con S+P:  $p < 0.001$ , S con P:  $p = 0.001$ , P con S+P:  $p < 0.001$ )).

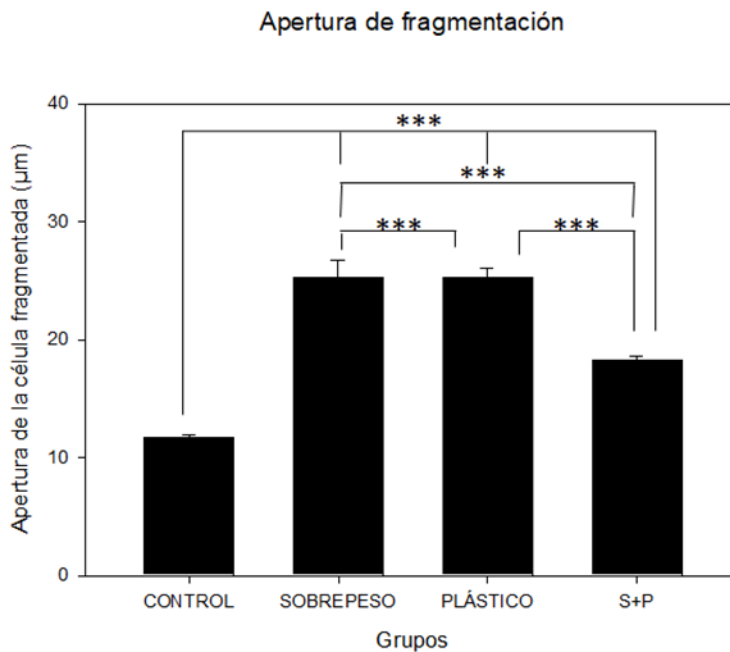


Fig. 17 Comparación de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos expresan la media y el error estándar de la apertura de fragmentación (AF-AC). Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa ( $***=p < 0.001$ ) entre estos grupos.

#### 8.4.5 FRAGMENTACIÓN POR PRUEBA TUNEL

El grupo con mayor intensidad de fluorescencia fue el de S+P con una media y error estándar de  $565.83 \pm 5.61$ , mientras que el grupo de sobrepeso y plástico tuvieron  $367.16 \pm 3.01$  y  $518.25 \pm 8.66$ . el grupo control tuvo una media mayor al sobrepeso de  $464.54 \pm 18.49$ . Se muestra la comparación de estos grupos. No hay diferencias significativas entre el grupo control y sobrepeso, plástico ni S+P ( $p=0.20$ ,  $p=0.39$  y  $p=0.15$ , respectivamente), Pero sí entre los grupos experimentales en la comparación S-S+P ( $p<0.001$ ), S-P ( $p<0.001$ ) y P-S+P ( $p<0.001$ ; fig. 18).

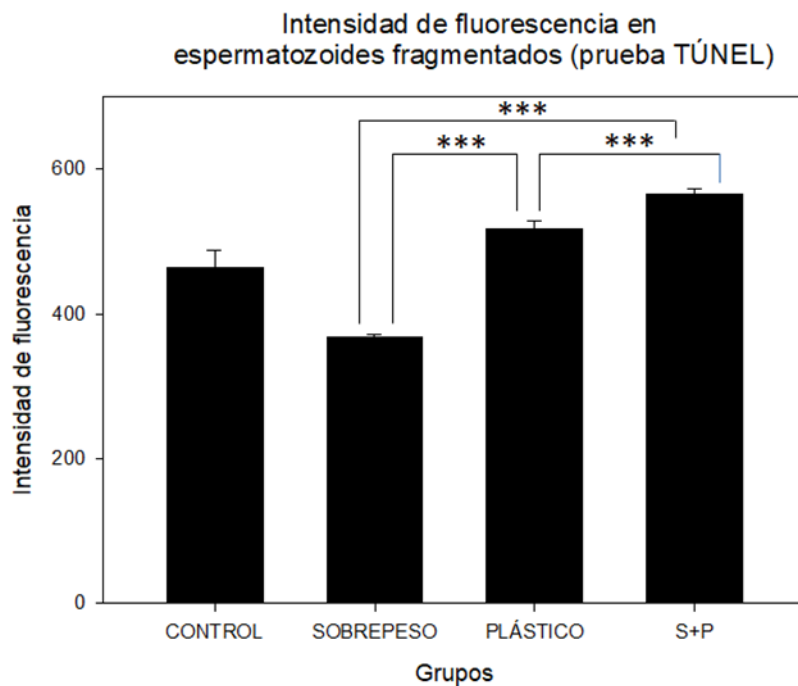


Fig. 18 Comparación de los grupos control, sobrepeso, plástico y S+P. Los datos expresan la media y el error estándar de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides. Letras iguales (a, b, c) indican que hay una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre estos grupos.

## 9. DISCUSIÓN

Los pesos de los ratones no tuvo diferencias significativas entre los grupos, pero la alimentación alta en grasa sí tuvo un efecto negativo en la calidad espermática de los grupos sobrepeso, plástico y S+P.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la concentración espermática se vio afectada significativamente por el sobrepeso y tiene una tendencia a disminuir en presencia de plástico. Para que exista una baja concentración se debe de estar alterando el proceso de espermatogénesis desde etapas tempranas donde se da la producción de espermatogonias. Debido a que la testosterona participa en las fases tempranas, la disminución en la concentración de esta hormona puede alterar la cantidad de espermatozoides por mililitro, como lo fue en el caso del grupo de sobrepeso. Los resultados del grupo de ratones con sobrepeso concuerda con el trabajo de Chavarro en 2010, donde en un grupo de hombres con sobrepeso se encontraron niveles de testosterona disminuidos.

La baja concentración de testosterona causada por un hipogonadismo es consecuencia del desbalance hormonal cuando hay sobrepeso. Este hipogonadismo conlleva la disminución en el tamaño de las gónadas y en la producción de andrógenos, repercutiendo finalmente en el número de espermatozoides.

La leptina es otra hormona que se ve alterada con el sobrepeso, donde aumenta. Existen sobre receptores de leptina que se encontraron en las células de Leydig, que son las encargadas de la producción de testosterona. Por lo que el sobrepeso de los ratones en este trabajo, podría estar afectando indirectamente en las células de Leydig. En el estudio de Pauli (y cols., 2008), un grupo de ratas con alimentación alta en grasa, se presentó un exceso de producción de leptina y disminución de la testosterona. Esto coincide también con el estudio de Hofny, en 2010, donde se presentó oligospermia y niveles elevados de leptina, afectando la

concentración espermática y la motilidad. Esto concuerda con nuestros resultados de baja concentración de ratones con una dieta alta en grasa.

La hormona FSH, que participa en el eje Hipotálamo, Hipófisis, Gónada, también juega un papel importante en etapas tempranas de la producción de espermatozoides, siendo la responsable de iniciarla. La FSH puede estar siendo inhibida por una disminución en la producción de testosterona. La inhibina B se produce por las células de Sertoli y tiene una acción negativa en la producción de FSH, inhibiéndola como su nombre lo indica. Una disminución de testosterona puede llevar a un aumento de inhibina. En el trabajo de Ruiz de 2010, se concluyó que la inhibina B es un marcador de espermatogénesis, debido a que presenta una relación negativa con FSH. La concentración espermática está relacionada con inhibina B, porque es más sensible para predecir concentraciones espermáticas bajas, daño testicular y recuperación espermática. Por lo que el grupo de sobrepeso pudo tener una disminución en testosterona, causando que una mayor concentración de inhibina, inhibiendo a la FSH y retardando o evitando el inicio de la espermatogénesis.

Las indicaciones del envase de plástico que se utilizó para calentar el agua mencionan que no tiene BPA, lamentablemente en la industria de la producción de plásticos se han empezado a utilizar otros plastificantes para reemplazar al BPA como el bisfenol S (BPS) y bisfenol F (BPF). A pesar de no ser tan estudiados como el primero, sí hay trabajos que muestran como estos dos plastificantes también son disruptores endócrinos y tienen las mismas repercusiones mencionadas para el BPA, como baja concentración de testosterona y disminución en los parámetros de calidad espermática (Eladak y cols., 2015). Ya que los tres disruptores se han relacionado con la baja expresión de genes que participan en la biosíntesis de la testosterona y en la formación del receptor de LH/CG (Hormona luteinizante/ Coriogonadotropina). Por lo que la presencia de BPS y BPF en el agua que consumieron los ratones puede provocar una baja en la síntesis de testosterona por disminución en la expresión de sus genes.

El plástico no mostró una diferencia significativa respecto al control, pero sí se observa una tendencia a disminuir la concentración espermática. Esto se puede deber a que un plastificante está actuando como disruptor endócrino, impidiendo la unión del complejo ABH-DHT (Proteína fijadora de andrógenos-dihidrotestosterona) (Cruz, 2013).

La ABH es una proteína que transporta testosterona a los túbulos seminíferos donde se estimula el desarrollo y diferenciación de la línea germinal, de espermátides a espermatozoides; es secretada por las células de Sertoli. El complejo ABP-DHT aumenta el proceso meiótico, estimulando los últimos pasos de la maduración (Cruz, 2013). Por lo que una baja producción de FSH en los ratones que tomaron agua calentada en envase de plástico, repercute en una baja concentración de testosterona, teniendo una repercusión negativa en las espermatogénesis, disminuyendo la concentración.

El grupo S+P no tuvo diferencias con el control, incluso se presentó una concentración promedio mayor al control, lo que indica que las vías de disminución en la testosterona, anteriormente presentadas, no se vieron afectadas por la combinación de estos dos factores. Un posible mecanismo para explicar esta situación es la respuesta agonista que tiene el BPA (en su caso BPS o BPF) sobre el receptor de estrógeno- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ). El BPA presenta anillos aromáticos en su estructura, y esta es una característica que le permite reemplazar a algún ligando con estos anillos, como lo son muchas hormonas incluyendo la testosterona. Esto permite que se siga produciendo testosterona y así no hay un desbalance hormonal que afecte la producción de espermatozoides, ni su calidad para moverse. Por otro lado, el ER- $\beta$  en presencia de BPA tiene una respuesta antagonista, ya que provoca un cambio conformacional en el receptor y esto no permite que se unan los ligando naturales, reduciendo en este caso la producción de testosterona. Por lo que la respuesta depende de qué receptor se vea afectado en presencia de BPA, ocasionando la producción o no de la testosterona.

En cuanto a la movilidad de los espermatozoides el grupo donde se encontró una diferencia significativa respecto al control fue el sobrepeso. El grupo que ingirió

plástico no presenta diferencias pero sí hay una tendencia en la disminución de la motilidad.

Como se mencionó anteriormente, el sobrepeso y la obesidad generan trastornos metabólicos como la baja de producción de testosterona. Esta hormona aparte de tener un papel en la producción de espermatozoides, también lo tiene en su maduración. Una disminución en la testosterona puede estar afectando directa o indirectamente a través de la FSH. Esto puede significar una alteración en las células de Sertoli, las cuales tienen como función principal proporcionar los factores y nutrientes necesarios para su correcto desarrollo.

Otra posible causa para la pérdida de la movilidad es la respiración y actividad mitocondrial. El flagelo es el encargado de dar movimiento a la célula y obtiene la energía en forma de ATP (adenosin trifosfato), esto a través de la respiración que lleva parte de su proceso en la mitocondrial. Ferramosca y cols. en 2016, alimentaron a ratas con una dieta alta en grasas y se redujo la concentración espermática y hubo afectaciones en la respiración celular y niveles bajos de ATP. Así como en el trabajo de Yang (2016) los hombres con obesidad presentaban actividad mitocondrial baja en los espermatozoides.

La vitalidad espermática se traduce como el porcentaje de células vivas, en este caso los grupos que mostraron una diferencia significativa fueron el P y S+P, por lo que el factor plástico está afectando la vitalidad de los espermatozoides. Esto se puede explicar con lo mencionado anteriormente de la respuesta agonista o antagonista de los ER- $\alpha$  y - $\beta$ . El grupo S, no mostró diferencia significativa pero su promedio dista del promedio del grupo control.

Una de las maneras para explicar el descenso de la vitalidad es a través de la apoptosis. Es un mecanismo con una cascada de reacciones que tiene la célula para llegar a la muerte celular programada, por lo que un incremento en la apoptosis se traduce en menor número de células vivas.

La hormona testosterona tiene un papel ya estudiado en la apoptosis. En los estudios de Print y Loveland (2000) y Erkkila y cols (1997) se realizó un cultivo

celular con ausencia de testosterona, el resultado fue un aumento en la apoptosis en los túbulos seminíferos. Como ya se mencionó anteriormente, pueden existir varios mecanismos con los cuales los niveles de testosterona disminuyan en presencia de plástico. Como la competencia en el receptor de leptina por el disruptor endócrino (plastificante), de igual manera, la proteína ABP puede estar siendo bloqueada por este mismo disruptor endócrino, ocasionando que DHT no se pueda unir y la testosterona pierda su concentración, ocasionando mayor apoptosis. El plastificante, que consumieron los ratones del grupo de plástico, también puede estar causando mayor estrés oxidativo en las células germinales, ocasionando apoptosis.

Cuando se analizó la prueba de fragmentación de ADN espermático, el porcentaje de células fragmentadas fue mayor en los tres grupos experimentales (S, P y SP) con diferencia significativa entre ellos y respecto al grupo control.

Es importante recordar que en cualquier etapa de la espermatogénesis se puede generar daño del ADN y que diversos factores pueden provocarlo. La generación de ROS es una de ellas (Juan-García A. y cols., 2015) y de igual manera existen muchos caminos para llegar a la generación de estas especies, algunos mencionados anteriormente en esta discusión.

En el estudio de Yang (2016), los niveles de ROS estaban elevados en personas con obesidad y al mismo tiempo tenían niveles altos de células con fragmentación. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Esto coincide con los resultados tanto el grupo de sobrepeso y de plástico, que presentaron mayor porcentaje de fragmentación de ADN.

El BPA también se ha relacionado con el estrés oxidativo, por lo que aumenta la producción de ROS, además no permite la reparación de escisión de bases de ADN cuando está oxidado. Esto es una explicación a los niveles altos de fragmentación que se presentaron en los grupos de P y S+P.

De igual manera, el proceso de apoptosis que se mencionó anteriormente, provoca daños en el ADN, por lo que cualquier ruta que lleve a la apoptosis puede estar rompiendo el material genético.

Por otro lado el sobrepeso, ocasiona cambios metabólicos importantes en el organismo y estos provocan afectaciones en el material genético. Por ejemplo, Estudios como el de Chavarro *et al.* (2010) sugieren que la obesidad aumenta el daño espermático, en comparación con hombres de peso normal. Esto como se mencionó anteriormente puede estar originado por desbalances en hormonas como la testosterona, concordando con los resultados de mayor fragmentación en ratones con sobrepeso respecto al control.

En cuanto al grupo donde se encuentran estos dos factores (S+P), la fragmentación fue menor que en los ratones de S y P. Lamentablemente, no hay estudios sobre la interacción de estos dos elementos, pero es de interés conocer el mecanismo.

Se sugiere que es una posible competencia de algún receptor como el de leptina o el de la proteína ABP, donde el plástico y las hormonas que hacen que se eleve la fragmentación impidan la unión del otro, ocasionando que la célula no se fragmente. Otra propuesta es que como la célula tiene más de una respuesta ante exógenos, por lo que se pueden estar llevando procesos agonistas y antagonistas en los ER's produciendo que estos no tengan un desbalance hormonal tan grande, y que no se produzca fragmentación en el ADN de manera significativa.

Una de las propuestas que resaltan de este trabajo es la utilización de parámetros cuantitativos en la evaluación de la fragmentación de ADN como lo son el área de fragmentación, la fragmentación total (área fragmentada menos el área celular) y la apertura de fragmentación. Estos nos arrojan valores numéricos que nos permiten evaluar de mejor manera al espermatozoide, ya que además de ofrecer un porcentaje de células dañadas, nos indica el grado de daño que tienen estas células. Lo que es importante porque nos da una estimación para saber si los

espermatozoides que se están analizando son aptos para la fecundación y para crear un producto sano.

## 10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo se puede concluir que la calidad espermática de los ratones que consumieron una dieta alta en grasa y que consumieron agua calentada en plástico tuvieron un efecto negativo en su calidad espermática.

En el caso del grupo que consumió agua calentada en plástico, el efecto fue negativo ya que hubo una disminución en la vitalidad y una mayor fragmentación de ADN espermático.

En el grupo con una dieta alta en grasa la concentración espermática y la movilidad disminuyó y el daño en el ADN fue mayor, respecto al control.

El grupo de ratones con la combinación de dieta alta en grasas y agua calentada en plástico, tuvo un porcentaje menor de células vivas y mayor fragmentación de ADN espermático.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez J. G. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl.* 5(5): 354-63.
2. Argemi F., Cianni N., Porta A. (2005) Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 39: 291-300.
3. Barquera S, Campos-Nonato I., Rojas R., Rivera J. (2016). Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gaceta Médica de México,* 146: 397- 407
4. Barrera-Cruz A., Rodríguez-González A., Molina-Ayala M.A. (2013) Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Mex del Inst Mex del Seg Soc.* 54: 292-299.
5. Barrientos-Pérez M., Flores-Huerta S. (2008). Is obesity an individual social medical problem? Public policies for prevention. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65: 639-651.
6. Bonet MO., Mach N. (2016). Factores nutricionales y no nutricionales pueden afectar la fertilidad masculina mediante mecanismos epigenéticos. *Nutr Hosp.* 33(5): 1236-1244.
7. Brugo-Olmedo S., Chillik C., Susana Kopelman (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Rev Colomb de Obst y Gin.* 54(4): 237-240.
8. Bungum M., Humaldan P., Spano M.m Jepson K., BungumL., Giwercman A. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reprod:* 19: 1401-8.
9. Bustamante P., Lizama B., Olaiz G., Vázquez F. (2001) Ftalatos y efectos en la salud. *Rev Intern de Contam Amb.* 17: 205-215.
10. Carretero M.I., Ciuliano S.M., Casaretto C.I., Gambarotta M.C., Neild D.M. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *In Vet.* 1: 55-63.

11. Cortés-Gutierrez El., Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. (2007). Evaluación del daño en el ADN espermático. Act Uro Españ. 31: 120-131
12. Cruz N. (2013). Síndrome de Déficit de testosterona en varón infértil o subfertil. Archiv Españ de Uro. 6: 675-683.
13. Chavarro J. E., Toth T. L., Wright D. L., Meeker J. D., Hauser R. (2010). Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. Fertility and Sterility; 93: 2222-2231.
14. Cuhra M., Bohn T., Cuhra T. (2017). *In plástico*: laboratory material newness affects growth and reproduction of *Daphnia magna* reared in 50-ml polypropylene tube. Scientific Reports 7: 46442.
15. Chichizola C, Scaglia H., Franconi C., Ludueña B., Mastandrea C., Ghione-Pelayo A (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo. Rev Bioquím y Pat clín 73: 9-23
16. Ding R., Jin Y., Liu X., Ye H., Zhu Z., Zhang Y., Wang T., Xu Y. (2017). Dose- and time- effect responses of DNA methylation and histone H3K9 acetylation changes induced by traffic-related air pollution. Scientific Reports; 7: 43737.
17. Erkkila K., Henriksén K., Hirvonen V., Rannikko S., Salo J., Parvinen M. & Dunkei L. (1997). Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules. J Clin Endocrinol Metab. 82: 2314-21.
18. Eladak S., Grisin T., Moison D., Guerquin M., N'Tumba-Byn T., Pozzi-Gaudin S., Benachi A., Livera G., Rouiller-Fabre V., Habert R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fert and Sterli; 103: 11-21.
19. Factor-Litvak P., Insel V., Calafat A. M., Liu X., Perera F., Rauh V. A., Whyatt R. M. (2014). Persistent Associations between Maternal Prenatal Exposure to Phthalates on Child IQ at age 7 years. PLOS ONE; 1-15.
20. Ferramosca A., Conte A., Moscatelli N., Zara V. (2016). A high-fat diet negatively affects rat sperm mitochondrial respiration. Andrology: 520-525.

21. Flegal K.L., Kit B.K. y Orpana H. (2013). Association of All-Cause Mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories. *Journ of Amer Med Assoc*; 309: 71-82.
22. Juan-García A., Gallego C., Font G. (2015) Toxicidad del bisfenol A: Revisión. *Rev. Toxicol*; 32:144-160.
23. Hernández M., Rivera J., Shamah T., Cuevas L., Gómez L. M., Gaona E. B., Romero M., Gómez-Humarán I., Saturno P., Villalpando S., Gutiérrez J. P., Ávila M. A., Mauricio E. R., Martínez J. & García D. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Informe de Resultados. 46-64.
24. Hofny E. R., Ali M. E., Abdel-Hafez H. Z., Kamal Eel D., Mohamed E. E., Abd El-Azeem H. G., Mostafa T. (2010). Semen parameters and hormonal profile in obese fértiles and infértiles males. *Fertility and Sterility*. 581-684.
25. Isidorir A. M., Caprio M., Strollo F., Moretti C., Frajese G., Isidori A., Fabbri A. (199). Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *Journ of Clin Endoc and Metab*: 3673-3680.
26. Jeng H. (2014). Exposure to endocrine disrupting Chemicals and male reproductive health. *Frontiers in Pub Health*. 2:1-12.
27. Jubiz W., Cruz E. A. (2007). Hipogonadismo masculino: Causas, genética, diagnóstico y tratamiento. *Colomb Méd*. 38: 84-91.
28. Kodama H., Yamaguchi R., Fakuda J., Kasai H., Tanaka T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infértiles male patients. *Fertility and Sterility*; 519-524.
29. Kort H. I., Massey J. B., Elsner C. W., Mitchell-Leef D., Shapiro D.B. Witt M. A., Roudebush W. E. (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journ of And-:*450-452.
30. Lithner D., Nordensvan I., Dave G. (2012). Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res*; 19: 1763-1772.

31. Martínez de Paz JP., Ozáez I. (2012). Ecotoxicología I: Cuando no podemos escapar de los tóxicos. Revista 100cias@uned. 5: 58-65
32. Mathieu-Denoncourt J., Wallace S. J., de Solla S. R., Langlois V. S.. (2014). Plasticizer endocrine disruption: highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mamalian aquatic species. Gen and Comp Endoc; 219: 75-88.
33. Md Saidur R., Woo-Sung K., June-Sub L., Sung-Jae Y., Buom-Yong R., Myung-Geol P. (2015). Bisphenol-A affects Male Fertility via Fertility-related proteins in spermatozoa. Scientific Reports; 5: 9169.
34. Moore K.L., Pesaud T.V.N., Torchia M.G. (2016) Emb Clín. ELSEVIER. 10ma edición. 11-17.
35. Quintero-Vásquez G.A., Bermúdez-Cruz R.M. y Castillo-Cadena J. (2015) Infertilidad Masculina y fragmentación del ADN espermático, un problema actual. Rev Esp en Cienc Quím Biol; 18: 144-151.
36. Morales R., Lledó B., Ortíz JA. Rodríguez-Arnedo D., Fabregat A., Bernabeu R. (2007). Fragmentación de ADN espermático y su implicación en la fertilidad. Rev Iber de Fert 24: 305- 313.
37. Organización Mundial de la Salud (2017). Obesidad y sobrepeso. Recuperado el 10 de abril de 2018 de: <http://www.who.int/es>
38. Pasquali R. (2006). Obesity and androgens: Facuss and perspectives. Fertil Steril; 85: 1319-40.
39. Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselam AR, Dodson WC, Lee PA. (2008) Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. Fertil Steril; 90: 346-51.
40. Print C. & Loveland K. L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis Turing spermatogenesis. BioEssays. 22: 423-430.
41. Reproducción Asistida ORG (2018) recuperado de: <https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>
42. Reproducción-asistida.mx. Recuperado de: <https://reproduccion-asistida.mx/>

43. Ribas-Maynou J., García-Peiró A., Fernández-Encinas A., Abad C., Amengual M., Prada E., Navarro J., Benet J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*; 1: 715-722.
44. Ruiz X., Burgués J. P., Ozanas M. & Pizá P. (2010). Utilidad de la inhibina B en el manejo del varón infértil. *Actas Urol. Esp.* 34: 781-787.
45. Sánchez EM., Olaéx JR., Ávila A., López L., Sánchez-Rodríguez SH. (2014). Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad. *iMedPub Journ.* 10: 1-17
46. Sánchez-Ramírez B, Gillen- Brenes C, Sánchez-González CM, Espino-y Sosa S, Echavarría- Sánchez MG.(2013) Efecto del sobrepeso y la obesidad en el perfil hormonal de pacientes masculinos con infertilidad. *Rev Mex Reprod*; 5:171-177.
47. Sikka S.C., Wang R. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Andol*; 10(1): 134-145.
48. Tejero ME. (2008) Genética de la obesidad. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65: 441- 449.
49. Tunc O., Bakos H. W., Tremellen K. (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrología*: 121-128.
50. Venereo-Gutierrez J. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidante. *Rev Cub Med Mil.* 31: 126-33.
51. Vom Saal F. S., Hughes C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows need for a new risk assessment. *Env Health Persp*; 113: 926-933.
52. Wang X., Sharma R. K., Gupta A., George V., Thomas A. J., Falcone T., Agarwal A. (2003). Alterations in mitochondria membrane potencial and oxidative stress in infértiles men: a prospective observational study. *Fert and Steril*; 8: 844-850.

53. Yang Q., Zhao F., Hu L., Bai R., Zhang N., Yao G., Sun Y. (2016). Effect of paternal overnight or obesity on IVF treatment outcomes and the possible mechanisms involved. *Scientific Reports*: 29787.
54. Zhao J., Zhang Q., Wang Y., Li Y. (2014). Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage alter in Vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis; 102: 998-1005.

## 12. ANEXOS

### 12.1 SOLUCIÓN DE KEYHANI Y STOREY

Reactivos para preparar medio litro de la solución Storey pH 7.4

Reactivo	Concentración	1 L (gramos)
KCl	113 mM	4.2125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.5 mM	0.8505
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2.5 mM	0.285
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3 mM	0.3045
Tris	20 mM	1.211
Penicilina	200 ug/ml	0.600
Estreptomina	200 ug/ml	0.600

Primero disolver el MgCl<sub>2</sub>, después KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, Tris, KCl y por último se agregan los antibióticos. Ajustar pH a 7.4 y aforar a medio litro.

### 12.2 TAE 10X

Reactivos para preparar 1 litro de TAE 10X

Reactivo	Concentración	1 L
Tris	40 mM	48.4 g
Ácido Acético	-	11.42 ml
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2 mM	7.44 g
dH <sub>2</sub> O	-	cbp 1L

### 12.3 BUFFER DE LISIS

Reactivos para preparar un litro de Buffer de Lisis

Reactivo	Concentración	1 L
NaCl	2.5 M	146.1 g
EDTA	100 mM	38.02 g
Tris HCl	10 mM	1.576 g
DMSO	10%	100 mL
DTT	10 mM	-
Tritón X-100	1%	10 mL

Disolver en agua desmineralidad, ajustar a pH 10 y aforar. Guardar en refrigeración. El DTT se agrega antes de comenzar la lisis.

### 12.4 BUFFER TRIS

Reactivo	Concentración	1 L
Tris HCl	0.4 M	74.04 g

Disolver en agua desmineralizada, ajustar a pH 7.5 y aforar.