



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UBIMED

Efecto de los ácidos grasos omega - 3 (ω -3) y linoléico conjugado (CLA) sobre la histología de los testículos y morfología de los espermatozoides en diferentes estados fisiológicos de ratas con Diabetes Mellitus 2 (DM2).

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EMMANUEL HERNÁNDEZ RIVERA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NORMA LAURA DELGADO BUENOSTRO



TLALNEPANTLA ESTADO DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El Presente trabajo se realizo gracias al apoyo que me brindo el laboratorio 7 de la unidad de Biomedicina, a cargo del Dr. Rafael Villalobos Molina y bajo la tutoría de la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro, ambos profesores de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Para la realización de este trabajo se contó con apoyo del proyecto PAPIIT No. IN223506-3 UNAM, otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. Así mismo, hubo apoyo parcial por parte del proyecto PAPCA 2006 - 2007 otorgado al Dr. Rafael Villalobos y Ricardo Mejía.

DEDICATORIAS

El presente trabajo de tesis, ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y su directora de tesis. De antemano sabemos que no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, quiero dar gracias a Dios, creador del universo y dueño de mi vida que me permite construir otros mundos mentales posibles. Gracias dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres, Flavia Rivera Barrón y Juan Raúl Hernández Soto, a quienes agradezco de todo corazón su amor, cariño y comprensión, por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de la carrera y por estar conmigo en todo momento. Por permitirme soñar y crecer con su imaginación, por enseñarme que no hay límites y que lo que me proponga lo puedo lograr. Quiero que sepan que les estoy agradecido hoy y siempre. Gracias mamá y papá por enseñarme, educarme y confiar en mí. Además de darme la fortaleza necesaria para seguir adelante. Los ¡AMO! con todo mi ser.

A mis hermanos Juan Raúl, Antonio de Jesús y Ricardo Hernández Rivera por su cariño y apoyo incondicional en muchos de los procesos que aquí tuvieron lugar. Gracias por escucharme y aconsejarme siempre. "Sé que con ustedes podré contar siempre."

A mi Tío Candelario Rivera Barrón por manifestarme todo su apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad. Gracias por ser mi tío a quien más quiero.

A mis abuelitos. "Tino y Encha", "José Guadalupe y Socorro" por su gran cariño y apoyo en lo largo de mi vida. En especial a mi abuelita Encha quien aunque ya no está con nosotros físicamente, siempre la llevamos en la mente y sobretodo dentro de nuestro ser. Abuelita sabemos que tú estarías muy orgullosa de tu familia, como nosotros lo estamos de ti. Gracias abuelita por tus enseñanzas, por tu gran cariño, amor y comprensión, te queremos mucho abuelita.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

A la directora de tesis, mi doctora linda. Norma Laura Delgado Buenrostro, Quien con su ejemplo me enseñó a crecer y enfrentarme al mundo y sobre todo a enfrentar y solucionar problemas dentro de la comunidad científica. Gracias por su amistad, apoyo y colaboración para la realización de esta investigación. Gracias por los momentos en los que más que un profesor se comportó como una verdadera amiga.

A Rita Isabel Orozco Tapia, Quien compartió con migo momentos tan especiales. Una niña quien me apoyo en cada momento, brindándome invariablemente lo mejor de ella.

Al Doctor Ricardo Mejía Zepeda, por su participación activa en el trabajo de investigación. Quien supo ser un gran maestro y sobretodo un amigo que me brindo su amistad y apoyo, durante este periodo "GRACIAS".

A mi mejor amigo Aldo Javier Vigueras Morado, una persona que desde el primer momento me brindo su apoyo y cariño sin ningún interés, dicha persona por la cual hoy por hoy puedo afirmar que, existe un gran cariño entre amigos. "Gracias amigo".

A mis amigos Carmen y Fernando, que por medio de las discusiones y preguntas, me hacen crecer en conocimiento. Así mismo les agradezco su ánimo, su cariño y su disposición en muchos momentos tanto alegres como tristes. Gracias por formar parte de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio Jaime, Martha, Vicky, Ismael, Yesica, con los que compartí las mismas experiencias. Agradezco el haber formado un equipo de trabajo y hecho tan amena labor.

De igual manera mi más sincero agradecimiento al: DR. Rafael Villalobos Molina, DR. Maximiliano Ibarra Barajas, Dra. Rita del Castillo y a la M en C. Martha Salcedo Álvarez

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL	PAG.
LISTA DE ABREVIATURAS	(12)
RESUMEN	(13)
 I.- INTRODUCCIÓN	
I.1.- Diabetes Mellitus	(15)
I.2.- Etimología	(15)
I.3.- Clasificación de la Diabetes Mellitus	(15)
I.4.- Causas de la DM2	(17)
I.5 Epidemiología	(18)
I.6.- Síntomas	(18)
I.7.- Complicaciones crónicas	(19)
I.7.1.- Complicaciones microvasculares	(19)
I.7.2.- Complicaciones Macrovasculares	(20)
I.8.- Páncreas y Diabetes	(20)
I.9.- Insulina	(21)
I.9.1.- Estructura	(21)
I.9.2.- Síntesis de insulina	(22)
I.9.3.- Secreción de insulina	(23)
I.10.- Resistencia a la insulina	(24)
I.11.- Alteraciones en el metabolismo de lípidos en la DM2	(24)
I.12.- Diabetes experimental	(25)
I.12.1.- inducción de la diabetes	(25)
I.12.2.- Inducción química	(25)
I.12.2.1.-Aloxana	(25)
I.12.2.2.- Estreptozotocina (STZ)	(26)
I.12.2.3. Muerte celular por STZ	(27)
I.13.1.- Espermatogénesis	(28)
I.13.2.- Espermatozoide	(29)
I.13.3.- Capacitación y Reacción Acrosomal (RA)	(29)
I.13.4.- Diabetes inducida y su relación con la reproducción	(31)
I.14.- DM2 y su relación con los ácidos grasos poliinsaturados	(31)
 II.- OBJETIVOS	(33)
 III.- MATERIALES Y MÉTODOS	(34)
III. 1.- Inducción de la diabetes	(34)
III. 2.- Modelo experimental (Dietas administradas)	(34)
III. 3.- Obtención de los testículos y conductos deferentes	(36)
III. 4.- Obtención de la muestra espermática	(36)
III. 5.- Capacitación y Reacción acrosomal	(37)
III. 6.- Histología	(38)
III .7.- Extracción y determinación lipídica de los testículos	(40)
III.8.- Análisis Estadístico	(41)

IV.- RESULTADOS	(42)
IV. 1.- Ácidos grasos omega-3 (ω 3)	
IV.1.1.- Glucosa	(42)
IV.1.2.- Peso corporal	(43)
IV.1.3.- Espermatozoides anormales	(44)
IV.1.4.- Espermatozoides con RA	(45)
IV.1.5.- Peso relativo de los testículos	(46)
IV.1.6.- Composición de ácidos grasos de testículo	(47)
IV.1.7.- Índice de fluidez membranal	(48)
IV.1.8.- Asociaciones celulares	(49)
IV.1.9.- Histología de testículo	(51)
IV. 2.- Ácido linoléico conjugado (CLA)	
IV.2.1.- Glucosa	(52)
IV.2.2.- Peso corporal	(53)
IV.2.3.- Espermatozoides anormales	(54)
IV.2.4.- Espermatozoides con RA	(55)
IV.2.5.- Peso relativo de los testículos	(56)
IV.2.6.- Composición de ácidos grasos de testículo	(57)
IV.2.7.- Índice de fluidez membranal	(58)
IV.2.8.- Asociaciones celulares	(59)
IV.2.9.- Histología de testículo	(60)
IV. 3.- Dieta hipercalórica (DHC)	
IV.3.1.- Glucosa	(61)
IV.3.2.- Peso corporal	(62)
IV.3.3.- Espermatozoides anormales	(63)
IV.3.4.- Espermatozoides con RA	(64)
IV.3.5.- Peso relativo de los testículos	(65)
IV.3.6.- Composición de ácidos grasos de testículo	(66)
IV.3.7.- Índice de fluidez membranal	(67)
IV.3.8.- Asociaciones celulares	(68)
IV.3.9.- Histología de testículo	(69)
IV. 4.- STZ-DHC- ω 3	
IV.4.1.- Glucosa	(70)
IV.4.2.- Peso corporal	(71)
IV.4.3.- Espermatozoides anormales	(72)
IV.4.4.- Espermatozoides con RA	(73)
IV.4.5.- Peso relativo de los testículos	(74)
IV.4.6.- Composición de ácidos grasos de testículo	(75)
IV.4.7.- Índice de fluidez membranal	(76)
IV.4.8.- Asociaciones celulares	(77)
IV.4.9.- Histología de testículo	(78)

IV. 5.- STZ-DHC-CLA	
IV.5.1.- Glucosa	(79)
IV.5.2.- Peso corporal	(80)
IV.5.3.- Espermatozoides anormales	(81)
IV.5.4.- Espermatozoides con RA	(82)
IV.5.5.- Peso relativo de los testículos	(83)
IV.5.6.- Composición de ácidos grasos de testículo	(84)
IV.5.7.- Índice de fluidez membranal	(85)
IV.5.8.- Asociaciones celulares	(86)
IV.5.9.- Histología de testículo	(87)
V.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	(88)
VI.- CONCLUSIONES	(99)
VII.- GLOSARIO	(100)
VIII.- RESULTADO	(101)

RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica degenerativa, considerada como un problema de salud pública mundial, la cual genera alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina. Para prevenir este tipo de alteraciones se ha propuesto el suministro de ciertas dietas, con suplemento de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's), ya que este tipo de lípidos pueden mejorar la sensibilidad a la insulina, por medio de cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática (MP), (Pérez y Guerrero, 2006).

Se han observado, en ratas diabéticas, alteraciones en el sistema reproductor masculino, mostrando cambios funcionales en las células de Leydig y una baja concentración de testosterona intratesticular, y se ha propuesto que la deficiencia de AGPI's pueden alterar la composición de las células de Sertoli, promover la degeneración de los testículos y disminuir la producción y motilidad espermática (Hassan y Hassouna, 1993).

Se sabe que la MP del espermatozoide juega un papel muy importante para adquirir su capacidad fertilizante, ya que ésta regula la entrada de ciertos iones involucrados en la reacción acrosomal (RA). También se ha propuesto que la fluidez membranal es proporcionada por los AGPI's, contribuyendo a una mayor flexibilidad y capacidad de la MP para condicionar ciertas expresiones y la acción de varios receptores (Claire y col., 2007).

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos omega-3 (ω -3) sobre la histología de los testículos y morfología de los espermatozoides en diferentes estados fisiológicos de ratas *Wistar* con DM 2, se indujo la enfermedad con una dosis única de estreptozotocina (STZ) 100 mg/Kg vía intraperitoneal en neonatos de 48 hrs de vida. El incremento en la concentración de glucosa en sangre durante 4 meses fue una prueba indicativa del desarrollo de la enfermedad. Mediante conteo celular por microscopía óptica, en espermatozoides completos y en diferentes estados fisiológicos (no capacitados y capacitados) de ratas diabéticas, se demostró de manera significativa una disminución en el porcentaje de estas células comparadas con el grupo control. Histológicamente se observó la degeneración de los túbulos seminíferos con posible infiltración glucoproteica, dicho fenómeno, probablemente se originó por acumulación de compuestos amiloides en membranas basales del tejido. Además, por cromatografía de gases se analizó la composición de ácidos grasos en los testículos de las ratas. La diabetes indujo un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados en los testículos de las ratas,

mientras la adición de ω -3 o CLA a ratas diabéticas incrementó el contenido de AGPI's como el eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) y disminuyó la proporción de ácidos grasos saturados como el esteárico y el araquídico.

Los datos obtenidos mostraron que la diabetes provoca una modificación en la composición de los ácidos grasos en el testículo, disminuyendo la proporción de AGPI's. Paralelamente, existe una disminución en la producción de espermatozoides completos y un abatimiento en el proceso de RA. Sin embargo la administración del suplemento de ácidos grasos ω -3 o CLA a ratas diabéticas, tiende a restituir los niveles de ácidos grasos insaturados, así como la producción de espermatozoides completos. Así mismo, los ácidos grasos ω -3 mejoraron el porcentaje de RA en aquellas células que fueron capacitadas.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el que actúan los ácidos grasos ω -3, sin embargo es posible que parte de su acción sea a través de modificaciones en la fluidez membranal, por un aumento en los AGPI's, o bien a través del efecto protector que dichos lípidos tienen sobre la membrana atrapando algunos radicales libres que pudieran provocar toxicidad celular.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa, se manifiesta por trastornos en el metabolismo. Generalmente se presenta hiperglucemia, esto puede ocurrir cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando se ve alterado el efecto biológico de esta hormona para controlar apropiadamente la concentración de glucosa en la sangre (Armstrong C. 2006).

1.2.- Etimología

El término diabetes mellitus deriva del griego que consta de dos términos: Diabetes: cuyo significado es evacuar gran cantidad de líquido y Mellitus: que quiere decir miel. Es decir, indica la expulsión de gran cantidad de líquido (orina) con un exceso de glucosa presente en ella (Díaz y col., 1993).

1.3.- Clasificación de la DM

La clasificación previa agrupaba bajo el término diabetes, alteraciones que difieren marcadamente en su patogénesis, evolución natural, respuesta terapéutica y prevención. A esto se agregan distintos factores genéticos y del medio ambiente que conducen a formas de diabetes que parecen fenotípicamente similares pero que pueden tener etiologías distintas (Islas y Revilla, 2002).

Actualmente existen dos clasificaciones principales, la Organización mundial de la salud (OMS), y la propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), (Dianes, 1990). Sin embargo, en Junio de 1997, tras un acuerdo formulado por un Comité de la ADA y de la OMS, se propone una nueva clasificación de la diabetes (ver Tabla.1), eliminando los términos de insulino -dependiente y no-insulinodependiente y se introducen los términos de DM1 y DM2 respectivamente.

Tabla. 1.- Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus

<p>I. Diabetes Tipo 1 (DM1)</p> <p>A. Inmunomediada</p> <p>B. Idiopática</p> <p>II. Diabetes Tipo 2 (DM2)</p> <p>III. Otros tipos específicos</p> <p>A. Defectos genéticos en la función de la célula β.</p> <p>B. Defectos genéticos en la función de la insulina</p> <p>C. Enfermedades del páncreas exócrino</p> <p>D. Endocrinopatías</p> <p>E. Inducida por tóxicos o agentes químicos</p> <p>F. Infecciones</p> <p>G. Formas no comunes de diabetes inmunomediata</p> <p>H. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes</p> <p>IV. Diabetes Mellitus Gestacional</p>

La tabla 1 fue tomada de Islas y Revilla, 2002.

I- DM 1

Es la destrucción de células β que lleva habitualmente al déficit absoluto de insulina y se clasifica en:

A. Diabetes inmunomediada (antes diabetes insulino dependiente, diabetes tipo 1 o diabetes de comienzo juvenil). Responde a la destrucción autoinmune (inmunidad celular) de las células β del páncreas, donde la secreción de insulina termina siendo mínima o inexistente. Se caracteriza por una predisposición genética. Además, se relaciona con factores ambientales aún no bien definidos.

B. Diabetes idiopática - Se refiere a las formas de etiología desconocida de mínima prevalencia; en algunos casos la insulinopenia es persistente y hay tendencia a la cetoacidosis, sin evidencias de enfermedad autoinmune. Tiene una importante carga hereditaria y carece de evidencias inmunológicas para autoinmunidad celular.

II- DM 2

(Antes diabetes no insulino dependiente, diabetes tipo II o diabetes de inicio en la edad adulta). Se caracteriza por insulinoresistencia. Generalmente estos pacientes no requieren tratamiento con insulina. La obesidad y la falta de actividad física provocan cierto grado de insulinoresistencia y el riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad. La secreción de insulina es defectuosa e insuficiente para compensar la insulinoresistencia, esto último puede mejorar con la reducción de peso y con tratamiento farmacológico para la hiperglucemia, aunque rara vez vuelve a la normalidad. La hiperglucemia gradual y su forma clínica oligosintomática retrasan el diagnóstico. Sin embargo, estos pacientes tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares (Katsumori y col., 1999).

III- Otros tipos de diabetes

- A. Defectos genéticos en la función de las células β
- B. Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- C. Enfermedades del páncreas exócrino.
- D. Endocrinopatías.
- E. Diabetes inducida por drogas ó agentes químicos.
- F. Infecciones.

IV- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

Se define como una intolerancia a los hidratos de carbono, de severidad variable, que comienza o se diagnostica en el embarazo. Dentro de los factores de riesgo para desarrollar la DMG se encuentran: la obesidad materna; la edad mayor de 30 años y antecedentes familiares de diabetes; entre otros. (Mancillas y col., 2002)

1.4.- Causas de la Diabetes Mellitus

1.4.1.- Diabetes tipo 2 (DM2)

Actualmente se piensa que los factores más importantes en la aparición de DM2 son: posible resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, el exceso de peso, triglicéridos elevados en sangre y la falta de ejercicio. Sin embargo, se sabe que la obesidad puede ser uno de los factores determinantes, que conlleva a la incidencia de hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, o disminución de los valores de lipoproteínas de baja densidad (Le Roith y col., 2003).

Además, se considera que la obesidad por si sola antecede a la aparición de la DM2, debido a que puede afectar la acción de la insulina (Pérez y Guerrero, 2006).

1.4.2.- Diabetes tipo 1 (DM1)

Para la generación de este tipo de diabetes, se considera fundamentalmente, la herencia genética o bien, alguna patología que influya en el funcionamiento del páncreas (Le Roith y col., 2003).

1.5.- Epidemiología

La diabetes mellitus es uno de los problemas de salud pública más importantes. Su frecuencia ha aumentado de forma alarmante en el mundo entero. Mientras que en la década de los 80' hubo 30 000,000 de personas que la padecían, en los 90' aumentó a 135 000, 000 y la proyección para el año 2025 se estima que más de 300, 000 000 personas estarán padeciendo la enfermedad (Goday y Serrano, 2000).

En la actualidad, en México existen alrededor de 4.8 000, 000 de personas con diabetes, de las cuales más de un millón de personas desconoce que la tiene debido a que se trata de una enfermedad asintomática en sus primeras etapas (Velázquez y col., 2000).

En el 2002 se registraron más del 58.2% del total de fallecimientos. Las principales causas de mortalidad de la población adulta han sido enfermedades del corazón, diabetes mellitus, tumores malignos y padecimientos cerebro vasculares. Sin embargo, cada año hay cerca de 180 mil nuevos casos, donde la DM2 es la que más predomina dentro de la sociedad mexicana (Hernández y Olaíz, 2002).

1.13.4.- Diabetes inducida y su relación con la reproducción.

La incidencia de la diabetes mellitus se ha incrementado significativamente en los últimos años y con ello se han podido observar un gran número de trastornos, dentro de los cuales se encuentran aquellos que afectan al sistema reproductor masculino. Esta enfermedad es una de las causas más comunes de disfunción eréctil. Cerca del 28% de los hombres que padecen DM tiene problemas de esta índole (Rehman y col., 2001).

Se ha propuesto que la inducción de la diabetes con STZ en ratas proporciona un modelo muy útil para el estudio de la disfunción reproductiva y entender el efecto de dicha enfermedad en la estructura y desarrollo gonadal durante el periodo crítico de maduración sexual en ratas (Soudamani y col., 2005).

Experimentos realizados sugieren que la inducción de diabetes con STZ a altas dosis en ratas macho, provoca una baja producción de testosterona en testículo (Sanguinetti y col., 1995). Esto puede ser resultado de una disminución del número total de las células de Leydig y el ritmo de biosíntesis de andrógenos (Ballester y col., 2001). Además, la fertilidad masculina es críticamente dependiente de la concentración intratesticular normal de testosterona, ya que es el soporte cualitativo y cuantitativo de la espermatogénesis (Murray, 1994). La diabetes también puede ocasionar modificaciones del eje hipotálamo – hipófisis – gónada, esto implica alteraciones en la función testicular (Zarate y col., 1989).

Así como en la disminución de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La (FSH) regula la espermatogénesis, mientras que la (LH) controla las funciones de las células de Leydig (Khan y col., 1992). La disminución hormonal causa la disfunción sexual, la impotencia, infertilidad y eyaculación retrograda que ha sido descrita en hombres y en modelos de ratas diabéticas (Jonathan, 2003). Otras investigaciones han mostrado en ratas con diabetes una baja producción y casi nula motilidad en espermatozoides, así como la pérdida de fluidos seminales y la disminución del peso de los órganos reproductores (Hassan, y Hassouna, 1993).

1.14.- DM2 y su relación con los ácidos grasos poliinsaturados.

Para corregir algunos trastornos como la hipertensión y la resistencia a la insulina, causados por la diabetes se ha propuesto la restricción o uso de ciertas dietas.

Saibal y Ranjan (2005), mencionan que dentro de las dietas existen ácidos grasos que pueden contribuir en la reducción de los efectos secundarios causados por la diabetes. Así mismo una dieta basada en ácidos grasos poliinsaturados puede ser usada para ayudar a

una mejor sensibilidad a la insulina, debido a que estos ácidos influyen en la composición de la membrana, sustituyendo a los ácidos grasos saturados (Pérez y Guerrero, 2006). Además, la DM2 ocasiona problemas en el metabolismo de los lípidos, ya que una deficiencia de ácidos grasos esenciales, trae como consecuencia alteraciones a nivel de testículos y una reducción en la cantidad y calidad de células germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos (Alvarez y col., 2001).

Por otro lado; se ha propuesto que los ácidos grasos poliinsaturados como el omega -3 (ω -3) y el ácido linoleico conjugado (CLA) pueden tener un efecto benéfico sobre el control de la diabetes. Además, se ha observado que la deficiencia de estos ácidos puede alterar la composición de las células de Sertoli, así como la degeneración de testículo afectando la fertilidad del semental a largo plazo (Marzouki y col., 1982; MacLean, 2005).

Otras investigaciones han manifestado que una dieta correcta y suplementos altos de omega -3 pueden ayudar a mejorar la motilidad espermática. Se sabe que la composición bioquímica de la MP del espermatozoide es importante para la fertilización. Así mismo, se han hecho análisis donde se describe la existencia de grandes cantidades de ácido linoleico en espermatozoides maduros (Lenzi y col., 1996).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) pueden influir en los procesos reproductivos a través de una variedad de mecanismos, ya que proporcionan los precursores de la síntesis de prostaglandinas y pueden modular la expresión de muchos patrones de las enzimas clave involucradas en el metabolismo de las prostaglandinas y esteroides. Ellos son componentes esenciales de todas las membranas celulares. Las proporciones de AGPI en diferentes tejidos del tracto reproductivo se refleja en el consumo de la dieta (Claire y col., 2007). El metabolismo de los lípidos en células espermáticas es importante para la producción de energía y para la estructura de la célula. Se sabe que la composición de fosfolípidos de membrana, es rica en AGPI's. Gulaya y colaboradores (2007) describen que en espermatozoides de hombres infértiles existe una pérdida drástica de AGPI's, modificando de esa manera la composición de ácidos grasos de estos gametos. Los niveles de ω -3 (ácidos grasos eicosopentaenóico y docosahexaenóico) y ω -6 ácidos grasos poliinsaturados (linolénico y docosatetraenoico) se encuentran reducidos drásticamente. Así mismo, se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el ácido docosahexaenóico y la motilidad espermática. La Infertilidad en machos con niveles normales y calidad del semen puede provenir de la alteración de los espermatozoides en el metabolismo de los lípidos.

1.6.- Síntomas comunes

- a) - Hiper glucemia: La concentración de glucosa en sangre normal en los seres humanos suele ser entre 70 y 100 mg/dl. Cuando se rebasan los 100 mg/dl, hay un exceso de glucosa en la sangre.
- b) Polifagia: Las células, al no absorber la glucosa, quedan desnutridas y esto produce en el sujeto hambre continua, llamada “hambre tisular”.
- c) Poliuria: El organismo intenta deshacerse del exceso de glucosa, a través de la eliminación de orina (Exceso de orina).
- d) Polidipsia: Debido a la poliuria el cuerpo pierde muchos líquidos. Por ello aparece una sed intensa y gran consumo de agua.
- e) Astenia: Es debido a la mala utilización de la glucosa en los músculos lo cual provoca un cansancio excesivo.
- f) Adelgazamiento: Pérdida de peso
- g) Prurito: Es un picor localizado en la piel dado a la acumulación de glucosa sobre la misma.

1.7.- Complicaciones crónicas

La diabetes es un padecimiento crónico degenerativo caracterizado por la elevación de la glucosa en la sangre y que con el tiempo provoca graves complicaciones a la salud que afectan notablemente la calidad de vida del enfermo (LeRoith y col., 2003).

De acuerdo a la OMS, se calcula que durante el presente año, los mexicanos que presentan diabetes desarrollarán algún tipo de complicación vascular distribuyéndose de la siguiente forma:

1.7.1.- Complicaciones microvasculares

Nefropatía diabética: La hiperglucemia altera el aparato renal ya que las elevadas cargas de glucosa trastornan el intercambio normal de líquidos ocasionando insuficiencia renal. Este problema se da con más frecuencia en pacientes con DM2, mientras que en pacientes con DMI sólo se presenta en el 10% de los casos (ver Fig. 1).

Retinopatía diabética: La elevada concentración de glucosa en la sangre daña los capilares que irrigan los ojos, ocasionando desde visión borrosa hasta ceguera permanente. Se estima en un 45% la prevalencia de retinopatía diabética en México (Roger y Michael 1997).

1.7.2.- Complicaciones Macrovasculares

Son las principales causas de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con DMI. Dentro de las cuales destacan: la cardiopatía diabética, enfermedades isquémicas, enfermedades cerebro vasculares y el pie diabético, entre otras (ver Fig. 1), (Katsumori y col., 1995).

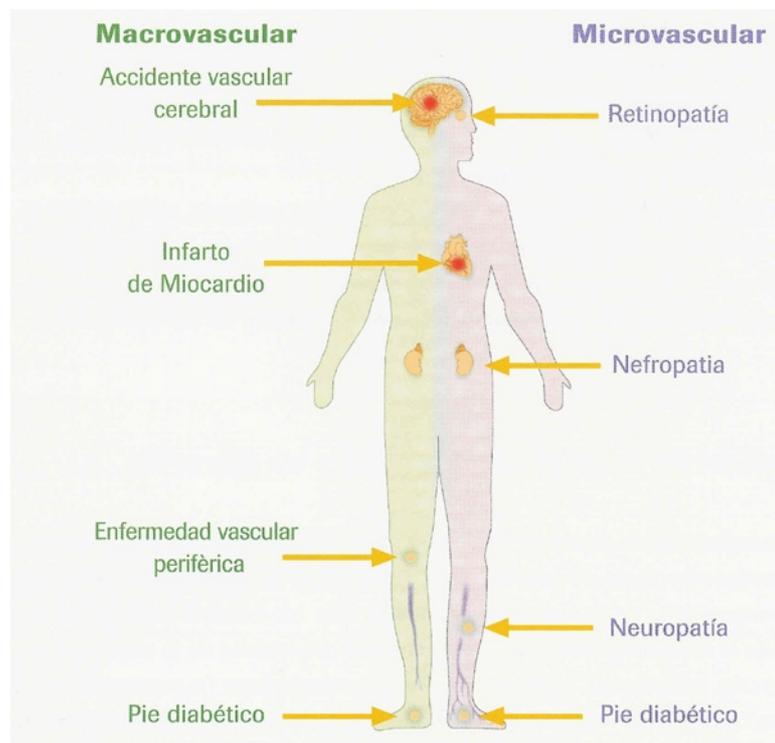


Figura 1.- Problemas macrovasculares y microvasculares.

Se muestra un esquema representativo del lugar donde se localizan algunos problemas macrovasculares y microvasculares en individuos con diabetes (García, 1999).

1.8.- Páncreas y Diabetes.

El páncreas es una glándula anexa al tubo digestivo y de secreción mixta, está ubicado en el abdomen por detrás y hacia la izquierda del estómago, adherido al intestino delgado y al bazo. Este órgano está compuesto por dos tipos principales de tejidos: **1)** los acinos, que secretan jugos digestivos y **2)** los islotes de Langerhans que secretan Insulina, glucagón y somatostatina directamente a la sangre.

El páncreas en el ser humano tiene de uno a dos millones de islotes de Langerhans, compuestos por tres tipos principales de células, α , β y δ . Las células β constituyen el 60 % y son las que producen y secretan insulina, la cual regula la concentración de glucosa sanguínea, manteniéndolos en un rango normal de 70 a 100 mg/dL al favorecer la entrada de glucosa a las células del organismo (Lipshutz, 2007).

1.9.- Insulina

Es una proteína dimérica unida por puentes disulfuro. Es sintetizada como un precursor de cadena simple, que primero pierde el péptido señal y un segmento conocido como péptido C, antes de ser hormona madura. La insulina madura es almacenada en gránulos secretorios cuya liberación es controlada por la concentración de glucosa en sangre. Los efectos de la insulina sobre los tejidos blancos, a nivel metabólico, es promover la captación de glucosa e inducir la mitosis (Slack, 1995).

1.9.1.- Estructura

La insulina es una hormona de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 6000 daltones (ver Fig. 2). Está formada por dos cadenas polipeptídicas. La cadena A formada por 21 aminoácidos (aa) y la cadena B constituida por 30 aa, estas cadenas están conectadas por 2 enlaces disulfuro intermoleculares entre el aminoácido 7 de cada una de las cadenas y el 20 de la cadena A con el 19 de la cadena B y un enlace intramolecular en la cadena A, entre los aa 6 y 11. Dicha hormona es sintetizada, modificada y secretada en las células β de los islotes pancreáticos (Fleming y col., 2001).

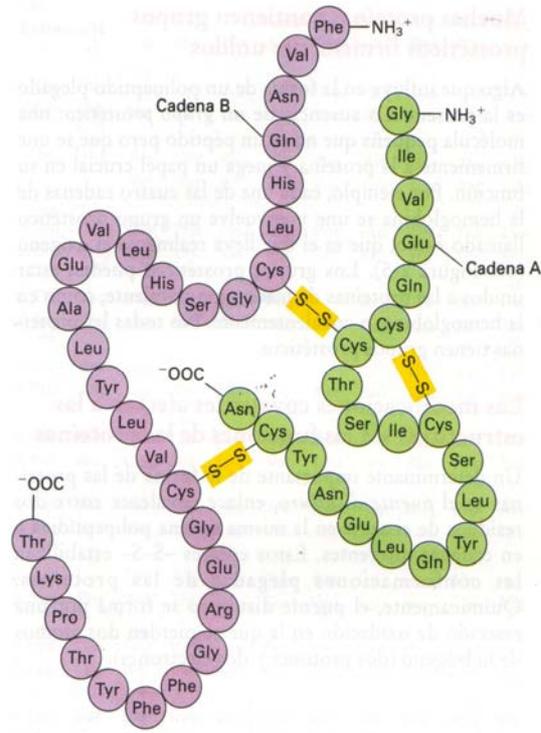


Figura 2.- Estructura de la insulina humana y la secuencia de aminoácidos.

La insulina, es una proteína dimérica unida por puentes disulfuro, la cual consta de una cadena A (21aa) y una cadena B (30aa) - (Tsalikian 2000).

1.9.2.- Síntesis de insulina

Se sintetiza como preproinsulina en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. Una peptidasa remueve el péptido señal (péptido C), convirtiendo la preproinsulina en proinsulina. Esta última se mueve a través de la formación de vesículas, desde el RE hasta el aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos secretores localizados cerca de la membrana de la célula. Se convierte así en dos cadenas polipeptídicas, una de 21 aminoácidos y otra de 30, unidas por dos puentes disulfuro.

La conversión de insulina y péptido C, tiene lugar en el complejo de Golgi por efecto de dos endopeptidasas. El péptido C es co-secretado con la insulina (ver Fig. 3). El proceso de secreción de insulina involucra la fusión de los gránulos secretores con la membrana de la célula β y la exocitosis de insulina, péptido C y trazas de pro insulina (Mcculloch, 2000).

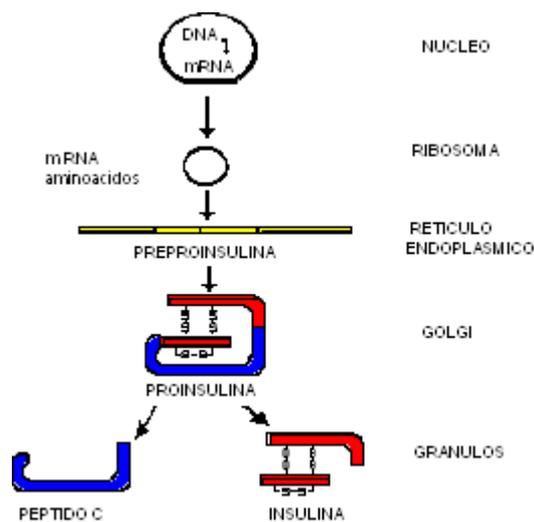


Figura 3.- Diferentes etapas de procesamiento de la insulina en la célula beta pancreática.

La transcripción y el “Splicing” remueven los intrones y producen un mensajero de 600 nucleótidos cuya traducción da lugar a la preproinsulina que se descarga al retículo endoplásmico rugoso, donde enzimas proteolíticas inmediatamente segmentan la preproinsulina en proinsulina, removiendo el péptido señal (White y col., 1997).

1.9.3.- Secreción de insulina

La glucosa y otros nutrientes energéticos como los aa, estimulan la secreción de insulina, por su metabolismo para aumentar la proporción intracelular de ATP/ADP. Los incrementos en la razón ATP/ADP activan una proteína de membrana plasmática, el receptor de sulfonilurea (SUR), para que cierre los canales de potasio (Canales K-ATP). Esto a su vez ocasiona despolarización de la membrana, penetración del calcio extracelular y liberación de insulina desde los gránulos de almacenamiento, (ver Fig. 4) (Hussain y col., 2003).

En células β normales la insulina es liberada por un proceso de exocitosis en el que los gránulos se desplazan hacia la membrana celular. La membrana del gránulo y la membrana de la célula se fusionan, liberándose así la insulina (Edlund, 1998).

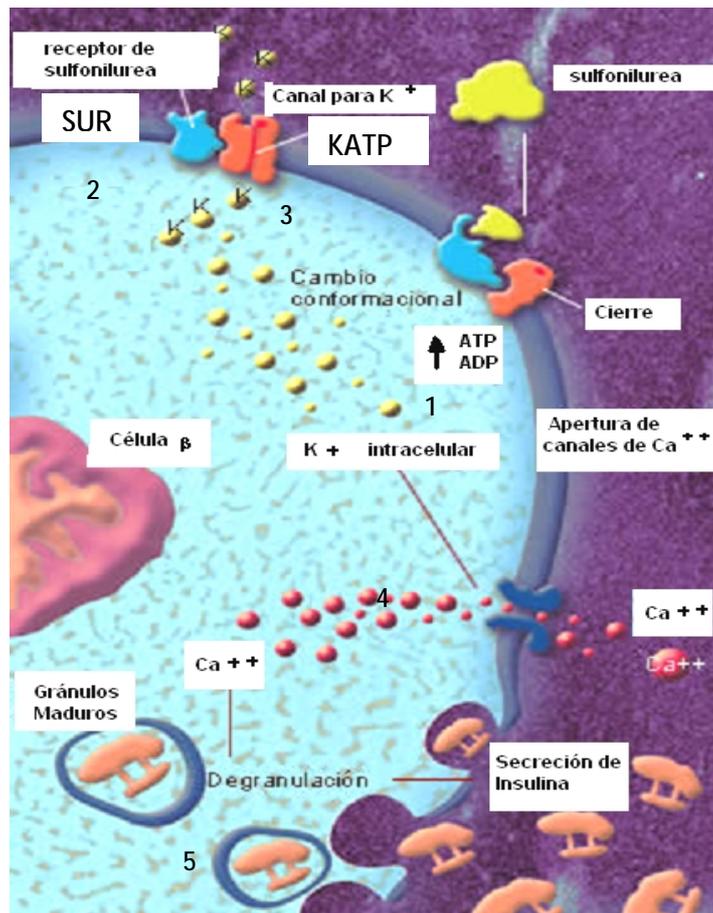


Figura 4. Regulación de la secreción de insulina en la célula β pancreática. Tras la oxidación intracelular de glucosa, aumenta el ATP dentro de la célula que se une al receptor de sulfonilurea (SUR), cambia la conformación del canal de potasio, cerrándose y aumentando el K^+ intracelular con depolarización de la membrana celular. Se activan los canales de calcio dependientes de voltaje, entra calcio (Ca^{2+}) a la célula y se movilizan las vesículas con insulina, liberando insulina al espacio extracelular (Espinha y col., 2007).

1.10.- Resistencia a la insulina

Es un estado patológico que se define como la incapacidad del organismo de responder normalmente a las acciones de la insulina. Está íntimamente ligado a la obesidad, al estilo sedentario de vida y es responsable en gran medida de la aparición de la DM2. Aunque tradicionalmente el estudio de esta patología se había centrado en el metabolismo de los carbohidratos, en las últimas décadas, se ha producido un cambio hacia el estudio del metabolismo de ácidos grasos como principal promotor de esta enfermedad. De este modo, se ha demostrado una correlación entre la acumulación de lípidos en tejidos periféricos como el hígado y la aparición de resistencia a la insulina.

Numerosos estudios han descrito que la acumulación de especies derivadas de ácidos grasos, debido a un aporte excesivo de lípidos o a un fallo en su oxidación, conducen a una resistencia a la insulina, (Arteaga y col., 1997; Galgani, y Díaz, 2000).

1.11.- Alteraciones en el metabolismo de lípidos en la DM2

La resistencia a la insulina está asociada con el desequilibrio de lípidos en la sangre, causante de un estado de hiperlipidemia, lo que contribuye al desarrollo de otras complicaciones como el mal funcionamiento del páncreas, aterosclerosis (estrechamiento de las arterias), entre otros (Anders, 2000). La alteración más común es la hipertrigliceridemia [valores normales o discretamente elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y nivel bajo de lipoproteínas de alta densidad (HDL)] (Islas y Revilla, 2002). En la DM2 se estimula la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado, debido a las concentraciones elevadas de glucosa, insulina y ácidos grasos libres (FFA). Además, la resistencia hepática a la insulina puede aumentar la secreción de lipoproteínas e incrementar el recambio de las partículas de VLDL plasmáticas. La consecuencia de todo lo anterior puede ser un incremento de las concentraciones de tales partículas en el plasma y la disminución de las concentraciones de HDL, un perfil de lipoproteínas aterogénicas que tal vez contribuyan a la mayor mortalidad en las enfermedades cardiovasculares de obesos diabéticos (Howard, y col., 1987).

1.12.- Diabetes experimental

1.12.1.- inducción de la diabetes

La diabetes puede producirse experimentalmente a través de una cirugía (pancreatectomía parcial), de una infección viral (destrucción de células β por efecto citolítico propio del virus o una respuesta autoinmune) o por la administración de hormonas o de agentes químicos (Pickup y Goseth, 1997).

Por otra parte, hormonas como la epinefrina, el glucagón, los glucocorticoides y la hormona del crecimiento tienen un efecto antagonista al de la insulina. La epinefrina y el glucagón administrados en altas dosis a los animales, producen una hiperglucemia (Mordes y Rossini, 1991).

1.12.2.- Inducción química

1.12.2.1.-Aloxana (AL)

La AL fue el primer agente químico diabetogénico descubierto por Duna y Mc Letchie en estudios de nefrotoxicidad. Es una potente toxina selectiva para las células β del páncreas en ratas y ratones cuando se administra intravenosamente en una dosis única, (Szkudelski, 2001).

La aloxana es un análogo de la urea, extremadamente inestable en soluciones acuosas a pH neutro, su $t_{1/2}$ es de 2.8 min. en dosis de 50 o 100 mg/Kg y son efectivas para producir una hiperglicemia crónica (Jacobs, 1983). El efecto diabetogénico de la aloxana es rápido, produciendo hiperglucemia. Este fármaco ocasiona un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), afectando así la permeabilidad de la membrana celular (ver Fig. 5) y consecuentemente nos conduce a la necrosis de las células β a 1 hr. post-administración (Batlle, y col., 1999).

La AL tiene mayor afinidad por células que contienen compuestos Sulfidril (SH), formando radicales Aloxana (HA) y reduciendo glutatión (GSH). Estos radicales inhiben la glucoquinasas (GK), responsables de la secreción de insulina por glucosa. Posteriormente existe una re-oxidación lo que da paso a la generación de nuevas especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales superóxido y iones férricos (FE^{3+}), trayendo como consecuencia la fragmentación del DNA.

Por otro lado las ERO también generan disturbios en la homeostasis de calcio intracelular. Se despolariza la membrana, lo que ocasiona que incremente el calcio intracelular, permitiendo la liberación de insulina junto con ERO y reduciendo significativamente la glucosa en sangre (hipoglucemia), seguido de alteraciones en la sensibilidad a la insulina (Szkudelski, 2001).

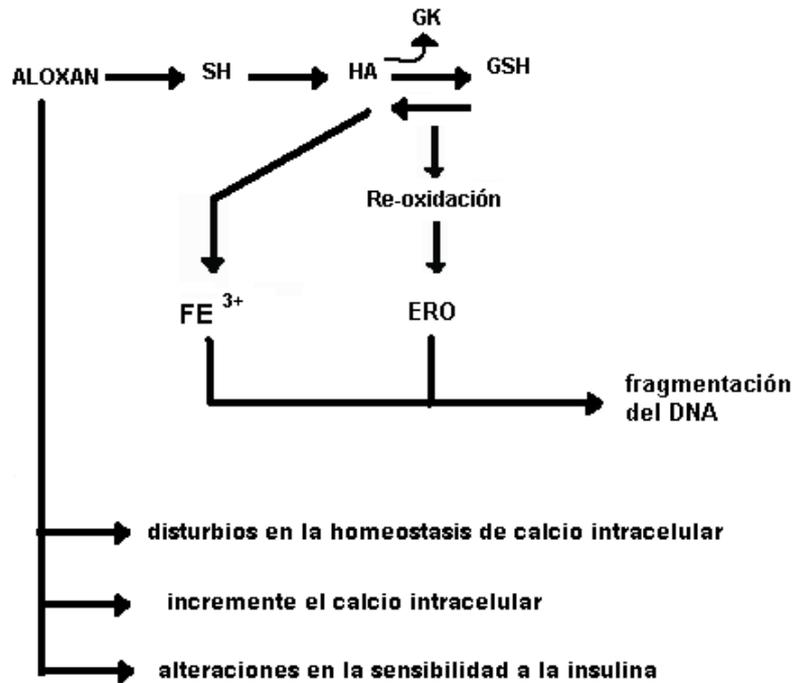


Figura 5.- Mecanismo de acción de la aloxana.

El esquema muestra la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células β del páncreas, generando radicales aloxana (HA). También se activa e inactiva la glucoquinasa (GK) y las concentraciones de calcio intracelular se incrementan (Szkudelski, 2001).

1.12.2.2.- Estreptozotocina (STZ)

Es un antibiótico de amplio espectro, antitumoral del grupo de las nitrosoureas. Es utilizado en investigación básica, donde produce diabetes mellitus en los animales por destrucción de las células que producen insulina. Este antibiótico es producido a partir de la fermentación de *Streptomyces achromogenes* (Casis, 1997). En su estructura química la STZ contiene una molécula de glucosa con una alta reactividad de la cadena de nitrosurea que es suficiente para iniciar la acción citotóxica. La movilidad de la glucosa lleva este agente hacia las células β del páncreas, donde se une al receptor de membrana para generar un daño estructural (ver Fig.6), (Islas y Revilla, 2002).

1.12.2.3.- Muerte celular por STZ.

La STZ induce la muerte a las células β a través de los siguientes eventos:

1.- Metilación: La STZ genera radicales metilo (CH_3); estos radicales causan la fragmentación del DNA por alquilación de las bases en varias posiciones y esto resulta en la activación de la poli-ADP-ribosa sintetasa como parte del mecanismo de reparación celular (Sybulsky y Maughan, 1971).

2.- Radicales libres: El peróxido de hidrógeno es producido por las células como respuesta a la exposición a STZ; sin embargo, como la superóxido dismutasa es un detector de radicales libres, puede proteger contra las propiedades diabetogénicas, estos datos indican que el estrés oxidativo podría participar en la determinación de la toxicidad por STZ (Ebelt y col., 2000).

3.- Oxido nítrico (ON): Se ha observado que los macrófagos activados, producto de la reacción inflamatoria promueven la producción de ON mediando la destrucción autoinmune de las células β (Elsner y col., 2000).

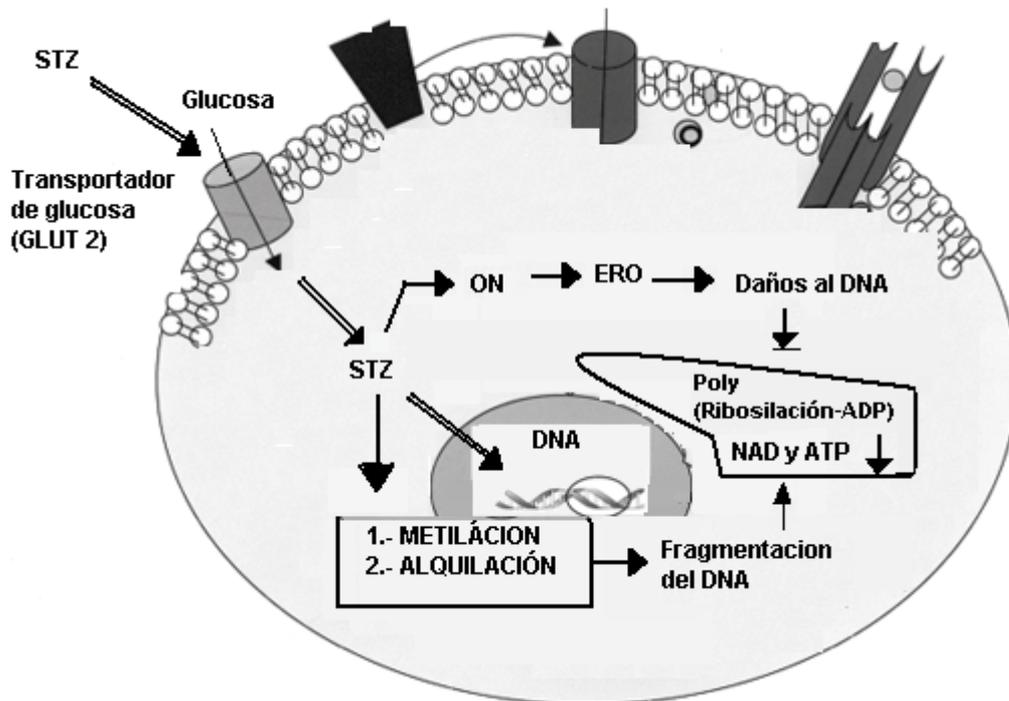


Figura 6.- Mecanismo de acción de la estreptozotocina (STZ). El fármaco ingresa a las células β mediante el transportador de glucosa (GLUT 2), formando oxido nítrico y especies reactivas de oxígeno los cuales son responsables de la fragmentación del DNA y de la toxicidad en las células β del páncreas (Szkudelski, 2001).

1.13.1.- Espermatogénesis

La espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos, como consecuencia del estímulo producido por las hormonas gonadotrópicas de la hipófisis anterior. Algunos otros factores que intervienen en este proceso son: factores de crecimiento, temperatura e interacción con las células de Sertoli. Estos túbulos contienen gran número de células pequeñas y medianas denominadas espermatogonias, las cuales están situadas en dos o tres capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular. Una parte de ellas prolifera y se diferencia siguiendo las etapas del desarrollo para formar espermatozoides. Durante la primera etapa de la espermatogénesis, las espermatogonias tipo A, se localizan junto a la membrana basal del epitelio, se dividen y originan células un poco más diferenciadas (espermatogonias tipo B). Después de varias divisiones adicionales estas células se convierten en espermatocitos primarios de gran tamaño, los que a su vez se dividen para formar 2 espermatocitos secundarios. Finalmente estos generan cuatro espermátides. Cada una de ellas se diferencian gradualmente hasta convertirse en un espermatozoide. La diferenciación espermática involucra la pérdida de su citoplasma, la reorganización del material cromatínico del núcleo, la formación de una cabeza compacta, la acumulación del citoplasma residual y de la membrana celular en un extremo de la célula para formar la cola (Gilbert, 2005).

1.13.2.- Espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide altamente diferenciada. Consta de una cabeza y flagelo y a su vez este se divide en segmentos más específicos (Fig. 7)

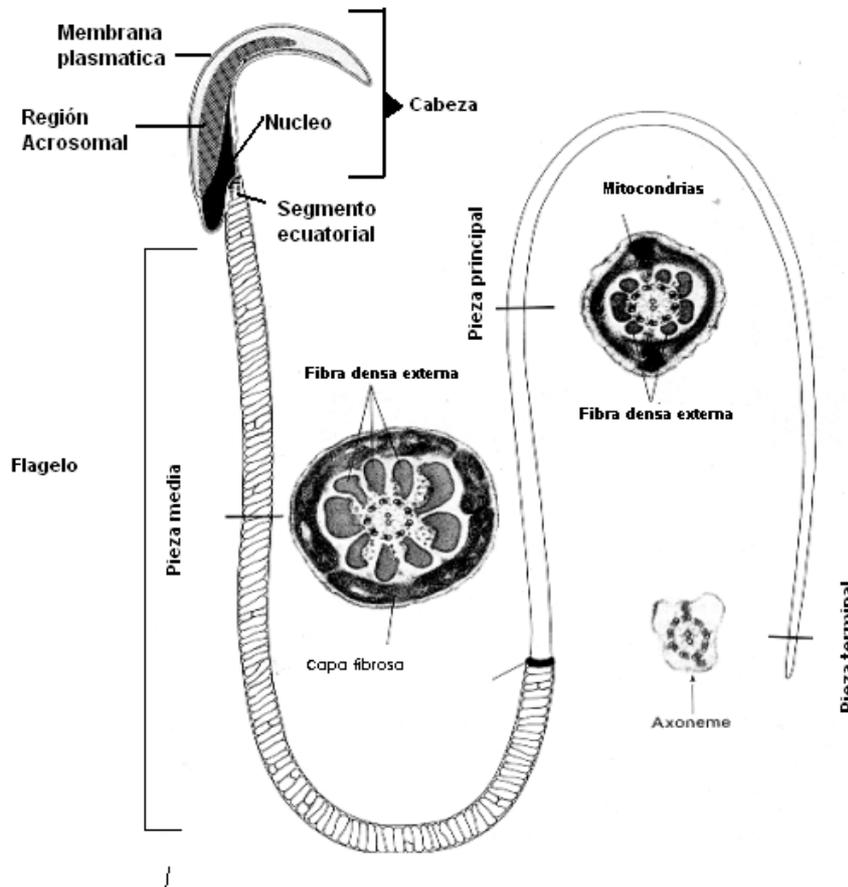


Figura 7.- Espermatozoide de rata. Se muestra un esquema general de las partes que conforman a un gameto masculino de Rata (Kierszenbaum, 1994).

1.13.3.- Capacitación y Reacción Acrosomal (RA)

La capacitación y la RA son procesos consecutivos, que preparan al espermatozoide para adquirir la habilidad fertilizante. Se conoce como capacitación al conjunto de cambios que le ocurren al espermatozoide, durante su viaje por el tracto genital de la hembra y que determinan que pueda llevar a cabo la RA. Algunos cambios referentes a la capacitación son modificaciones de la MP, en su permeabilidad, en la fluidez y ocurre un rearrreglo o alteración de proteínas de la superficie espermática.

También hay un aumento en la movilidad de los espermatozoides y un mayor flujo de iones calcio y HCO_3 (Baldí y col., 2000). La secuela de la capacitación es el evento conocido como la RA. Este es un proceso de exocitosis regulada que depende de calcio extracelular. Consiste en la fusión de membranas externa del acrosoma (el gránulo de secreción) con la membrana plasmática (MP) que la cubre (Yanagimachi y Usui, 1974). En la RA se libera el contenido acrosomal (Fig. 8), constituido principalmente de enzimas hidrolíticas, que le ayudan al espermatozoide a atravesar las envolturas del óvulo (la capa de la granulosa y la zona pelúcida). Adicionalmente, la RA genera en el espermatozoide un nuevo dominio en la MP del óvulo y se fusionan entre sí produciéndose la fertilización (Yanagimachi, 1994).

Por otro lado, la MP de los espermatozoides está estructuralmente organizada en regiones o dominios que difieren en su composición y puede actuar de manera independiente o coordinada a lo largo de tiempo de vida de la célula (Peterson y Russell, 1985). Los dominios morfológicos convencionales de la superficie de la cabeza del espermatozoide son las regiones apical, principal y ecuatorial del acrosoma y la región postacrosomal (Olson y col., 1987; Hedí, 1989). Se ha comunicado que la distribución inicial de los componentes de la MP del espermatozoide cambia cuando la célula pasa por los procesos de capacitación y RA. Aguas y Pinto da Silva (1989) estudiaron la dinámica de las glucoproteínas transmembranales de la superficie del espermatozoide de cerdo y observaron, que momentos antes de que se lleve a cabo la RA, existe una reorganización de dichas glucoproteínas de la región principal del acrosoma hacia la región apical y ecuatorial del acrosoma así como a la región postacrosomal.

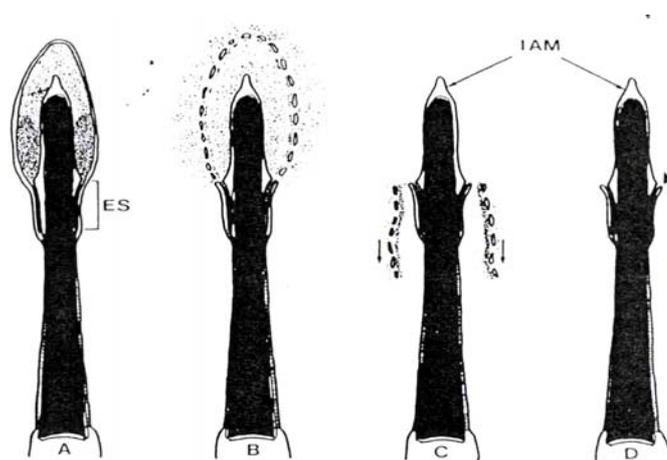


Figura 8.- Principales cambios en membrana durante el proceso de RA en espermatozoides.

A) muestra un espermatozoide antes de la RA; **B)** las membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa, formando vesículas y permitiendo la salida de enzimas hidrolíticas ; **C)** queda expuesto el núcleo; **D)** Se forman nuevos dominios de reconocimiento (Abraham y Kierszenbaum, 2000).

II.- OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los ácidos grasos omega – 3 (ω -3) y ácido linoleico conjugado (CLA) como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* macho con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sobre la histología del testículo y en los gametos con reacción acrosomal (RA) valorados por microscopía óptica y cromatografía de gases.

Objetivo Particulares

- Generar un modelo de DM2 en ratas *Wistar* neonatas a través de una dosis única de 100 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal y corroborar el desarrollo de la hiperglucemia semanalmente durante 4 meses.
- Estandarizar la técnica de capacitación espermática de ratas *Wistar* y evaluar el efecto de los ácidos grasos ω -3 y CLA sobre la RA de los espermatozoides de individuos con DM2.
- Valorar los diferentes estadios celulares en túbulos seminíferos y la morfología de los espermatozoides obtenidos de conducto deferente de ratas con DM2, tratadas con ácidos grasos poliinsaturados.
- Analizar el contenido de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2, tratadas previamente con diferentes dietas (ω -3, CLA y dieta hipercalórica), valorados por cromatografía de gases.
- Valorar los posibles cambios histológicos en testículo de ratas con DM2
- Valorar el efecto de los ácidos grasos sobre la RA de los espermatozoides de rata con DM2.

II.- OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los ácidos grasos omega – 3 (ω -3) y ácido linoleico conjugado (CLA) como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* macho con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sobre la histología del testículo y en los gametos con reacción acrosomal (RA) valorados por microscopía óptica y cromatografía de gases.

Objetivo Particulares

- Generar un modelo de DM2 en ratas *Wistar* neonatas a través de una dosis única de 100 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal y corroborar el desarrollo de la hiperglucemia semanalmente durante 4 meses.
- Estandarizar la técnica de capacitación espermática de ratas *Wistar* y evaluar el efecto de los ácidos grasos ω -3 y CLA sobre la RA de los espermatozoides de individuos con DM2.
- Valorar los diferentes estadios celulares en túbulos seminíferos y la morfología de los espermatozoides obtenidos de conducto deferente de ratas con DM2, tratadas con ácidos grasos poliinsaturados.
- Analizar el contenido de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2, tratadas previamente con diferentes dietas (ω -3, CLA y dieta hipercalórica), valorados por cromatografía de gases.
- Valorar los posibles cambios histológicos en testículo de ratas con DM2
- Valorar el efecto de los ácidos grasos sobre la RA de los espermatozoides de rata con DM2.

III.- Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico, excepto el hexano que fue de grado HPLC. La estreptozotocina, Triton X-100, Cloruro de Amonio (NH_4Cl), Trifloruro de Boro (BF_3), ácido pírúvico, ácido láctico, albúmina sérica de bovino (BSA), Benzoato de metilo, Glicerina, alcohol absoluto, Alcohol etílico y la gelatina Knox, fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO). Dextrosa, Acetona, Cloroformo, Xilol, Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), Cloruro de calcio (CaCl_2), Sulfato de magnesio (MgSO_4), Carbonato de sodio (NaHCO_3), Sulfato de Cromo y Potasio ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$), Hexano y Metanol fueron obtenidos de J.T. Baker. El Formaldehído y el paraformaldehído, se compraron a MP Biomedicals, Ing. El fosfato de potasio mono básico (KH_2PO_4), Hematoxilina de Harris, Eosina amarillenta, parafina para inclusión, Entellan, se compraron a Merck KgaA (Darmstadt, Germany).

III.1.- Inducción de la diabetes

Para generar el modelo de diabetes no insulino dependiente (DM2) en ratas Wistar, se ocuparon machos neonatos de 48 hrs. de vida, a los cuales se les administró una dosis única de 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en amortiguador de citratos (pH 4.5) vía intraperitoneal, como lo describen Areas y col. (2003). Para valorar la concentración de glucosa en sangre se utilizó un glucómetro marca Digiview y tiras reactivas. Las determinaciones de glucosa en sangre fueron realizadas 1 vez por semana durante 4 meses.

III.2.- Modelo experimental (Dietas administradas)

Las ratas fueron destetadas a las tres semanas de edad y distribuidas en 10 lotes de cinco individuos cada uno (ver tabla 2), posteriormente se les administró una dieta diferente a cada grupo. Cada lote fue alojado en cajas de acrílico en el bioterio de la FES-I mantenidas bajo las mismas condiciones, a una temperatura de 22° C, 12 h luz y 12 h oscuridad durante 4 meses.

Tabla 2.- Patrones de dietas administradas a ratas *Wistar* durante 4 meses.

DIETAS					
DIETAS	A) Estreptozotocina (STZ) 100 mg/kg y Agua ad libitum	B) Omega 3. (ω -3). eicosapentaenico (EPA) 360 mg/kg docosahexaenico (DHA) 240 mg/kg Agua ad libitum	C) Ácido linoleico conjugado (CLA) 1.04 g/kg y Agua ad libitum	D) Dieta Hipercalorica (DHC) 13% grasas saturadas (manteca en pellets) y 10% de sacarosa en Agua ad libitum	E) Dieta normal (pellets) 18% de proteína, 5% de grasa y 5% de Fibra Agua ad libitum
LOTES					
1.-control					X
2.- STZ	X				X
3.- ω -3		X			X
4.- CLA			X		X
5.- DHC				X	
6.-STZ- ω -3	X	X			X
7.-STZ-CLA	X		X		X
8.- STZ-DHC	X			X	
9.- STZ-DHC - ω -3	X	X		X	
10-STZ-DHC - CLA	X		X	X	

Las ratas fueron destetadas a las 3 semanas de edad y se les comenzó a administrar un suplemento alimenticio 4 veces por semana, mediante canulación: **A)** Estreptozotocina **B)** dieta de omega-3 (EPA + DHA), **C)** dieta de ácido linoleico conjugado (CLA), **D)** Dieta hipercalorica (sacarosa 10% en agua, 13% manteca en pellets), y **E)** Dieta normal.

Nota: todos los lotes consumieron agua ad libitum. Lotes- **(1)** control, **(2)** STZ, **(3)** ω -3, **(4)** CLA, **(5)** DHC, **(6)** STZ- ω -3, **(7)** STZ – CLA, **(8)** STZ- DHC, **(9)** STZ- DHC- ω -3, **(10)** STZ - DHC-CLA.

III.3.- Obtención de los testículos y conductos deferentes

Para extraer las gónadas masculinas de la rata, se anesteció y sacrificó el animal por medio de pentobarbital 1 ml/ 2.5 Kg de peso corporal. Enseguida se colocó en una posición decúbiteo dorsal, extendiendo las extremidades en una base metálica mediante cinta adhesiva. Se realizó una incisión ventral sobre la línea media de la piel a la altura de los genitales teniendo cuidado de no cortar o lesionar órganos. La piel se separó con los músculos subcutáneos para dejar al descubierto la mayor parte del tejido conectivo subcutáneo y estriado esquelético. Enseguida fue localizado el conducto deferente y ligado con hilo de la región superior para evitar perder la muestra espermática. El testículo, junto con el conducto deferente fueron extraídos y lavados mediante centrifugación/ resuspensión con solución salina fisiológica al 0.154 M a 37°C. Los conductos deferentes fueron aislados, retirando arterias, venas y exceso de grasa para evitar contaminar las muestras con células sanguíneas y de esa manera obtener la muestra espermática. Por otro lado, los testículos fueron pesados en una balanza analítica y uno de ellos fue fijado con paraformaldehído 4% en ácido pícrico para su posterior estudio histológico. El otro fue congelado y homogeneizado para la extracción de lípidos mediante el método de Folch y colaboradores (1957) para analizar la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.

III.4.- Obtención de la muestra espermática

Los espermatozoides fueron obtenidos del conducto deferente y lavados dos veces mediante centrifugación/ resuspensión a 3000 rpm durante 3 min. en NaCl 0.154 M. Enseguida se fijaron durante 1 h. con formaldehído al 3% en PBS (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.4). Al término de la fijación, las muestras fueron neutralizadas en NH_4Cl -PBS 50mM por 10 min. Finalmente las muestras se lavaron en PBS y luego dos veces con H_2O bidestilada para ser montadas en portaobjetos limpios.

III.5.- Capacitación y Reacción acrosomal.

Los espermatozoides obtenidos del conducto deferente fueron lavados dos veces mediante centrifugación/ resuspensión en NaCl 0.154 M y se ajustó la concentración a 1×10^6 espermatozoides/ml como lo describen Trejo y Mújica, (1990). Para su capacitación, las células se incubaron a 37°C durante 3 h., en un medio mínimo de cultivo suplementado con: NaCl, 119.4 mM; KCL, 4.8 mM; CaCl₂, 1.0mM; MgSO₄, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2mM; NaHCO₃, 25mM; dextrosa 5mM; ácido láctico, 21 mM; ácido pirúvico, 0.25 mM; pH 7.4. Las muestras alícuotas fueron valoradas al microscopio por intervalos de 15 min. para observar la motilidad hiperactivada (Indicador de capacitación).

Al término del tiempo de incubación correspondiente, las muestras alícuotas fueron fijadas en formaldehído al 3% en PBS por 1 h. Las células capacitadas y no capacitadas, se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación/ resuspensión. Enseguida se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de NH₄Cl (50 mM en PBS) durante 10 min. Posteriormente fueron lavados nuevamente por centrifugación / resuspensión en PBS y por último con agua bidestilada. Con esta última suspensión se prepararon frotis de las diferentes muestras. Las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente para valorar el porcentaje de espermatozoides que tuvieron reacción acrosomal (RA) o que perdieron el acrosoma, fueron teñidos con azul de Coomassie y observados al microscopio (Bendahmane, 2002).

III.6.- Histología

III.6.1.- Procesamiento de la muestra para el estudio histológico:

a) Inclusión en parafina:

Los testículos lavados con NaCl al 0.9% fueron fijados en una solución de paraformaldehído pícrico durante 72 hrs. Enseguida fueron colocados en alcohol al 70% por 24 hrs. y con agua de grifo durante 30 min. para eliminar residuos del paraformaldehído. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con alcohol a diferentes concentraciones en intervalos de 30 min. c/uno (40, 50, 60, 70, 80, 90,96 y 100%) Seguidos de una solución de xilol-etanol (1:1) durante 30 min. y con Xilol al 100% por 15 min. Los órganos fueron infiltrados con parafina I durante 24 hrs. a una temperatura de 58- 60°C. e inmediatamente colocados en parafina II (nueva) por 1 hr. Finalmente, fueron incluidos con su respectiva identificación. Los bloques solidificados fueron conservados en un lugar a 4° C hasta su corte. Se realizaron cortes del tejido testicular con un grosor de 3 - 5 μ m y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados.

b) Preparación de portaobjetos para el montaje de muestras

Los portaobjetos previamente lavados y desengrasados se colocaron durante 15 min. en una solución de grenetina knox, (0.4g $\text{Crk}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 4.0g gelatina Knox y 800 ml H_2O bidestilada). Transcurrido ese tiempo se dejaron escurrir por 2 hrs. repitiendo el mismo procedimiento 2 veces más. Finalmente se dejaron secar toda la noche.

c) Montaje de los cortes y tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E).

Los cortes fueron realizados en el microtomo marca Leica modelo (RM2125RT), con un grosor de 3 - 5 μ . y colocados en los portaobjetos previamente gelatinizados y secados en una parrilla a 40°C. Enseguida las muestras se colocaron en una canastilla y en un horno (Felisa) a 60°C durante 60 min. para retirar residuos de parafina.

Finalmente los cortes fueron teñidos con Hematoxilina- Eosina (H-E), como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3 .- Metodología utilizada para tinción con H-E en testículo.

Reactivo	Tiempo (min.)
Xilol I	5
Xilol II	5
Alcohol-Xilol	3
OH 100%	3
OH 90%	2
OH 80%	2
OH 70%	1
Agua Corriente	3
Hematoxilina de Harris	6
Agua Corriente (Lavado)	
Alcohol Ácido	15 segundos
Agua Corriente	1
Eosina	4
Agua Corriente (Lavado)	
OH 70%	1
OH 90%	1
OH 100%	2
OH 100%	3
Xilol I	5
Xilol II	5

En la tabla 3 se muestra el procedimiento por la cual fueron teñidos los cortes histológicos. La tinción realizada fue por la técnica de Hematoxilina – Eosina.

III.7.- Extracción de lípidos totales de los testículos.

III.7. I.- Fundamento

Se aplicó el método de Folch y colaboradores (1957). La mezcla cloroformo: metanol 2:1 extrae el total de lípidos. La extracción de los lípidos del tejido animal se desarrolló en dos operaciones: 1) Extracción de lípidos con mezcla cloroformo: metanol 2:1 del tejido previamente homogeneizado 2) para eliminar las sustancias no lipídicas localizadas en el filtrado se adicionó un volumen de 20% agua bidestilada. Un sistema bifásico fue obtenido, donde se pudo separar la fase polar de la no polar. La fase superior fue desechada, la fase inferior contenía esencialmente el total de lípidos de los tejidos.

III.7. 2.- Procedimiento

III.7. 2. I.- Extracción de los lípidos

Se tomó 1 g de tejido (testículo) y fue homogeneizado con 19 ml de mezcla solvente cloroformo-metanol 2:1, durante 5 min. a 4°C.

III.7. 2.2.- Lavado del extracto

El volumen del extracto total fue medido y se adicionó 20% de agua bidestilada. Se mezcló y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min. para obtener 2 fases. La fase superior fue retirada y la inferior fue lavada (3 veces), con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (3:48:49). Finalmente se colectó la fase lipídica en viales de vidrio y se evaporó el solvente con nitrógeno, almacenando los lípidos a -20°C para su posterior transesterificación.

III.7. 2.3.-Transesterificación

Se utilizó el trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol según el método de Morrison y Smith (1964). Para resuspender los lípidos se les adicionó 1ml de cloroformo y se tomaron 30 μl de esta solución en viales de 4 ml. Se evaporaron los solventes con gas nitrógeno. Posteriormente se le agregó 500 μl de Trifloruro de Boro (BF_3) al 14% en Metanol. Los viales fueron colocados en baño maría a 92° C (punto de ebullición en la Cd. De México), durante 30min. Después de este tiempo, se agregó 1ml de Hexano HPLC y 500 μl de agua bidestilada, se agitó fuertemente y se colectó la fase superior que contenía los lípidos. Finalmente se evaporó el hexano que contenía los metil-ésteres con la ayuda de nitrógeno y se almacenó en viales protegiendo de la luz a -20°C.

III.7. 2.4.- Determinación de lípidos por Cromatografía de gases

Se resuspendieron los metil ésteres de los ácidos grasos con 100 μl de Hexano HPLC y se inyectó 1 μl de la muestra en el cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora. El programa utilizado fue diseñado de la siguiente manera: inició a 180° C por 5 min., posteriormente una rampa de 5° C / min. hasta 220° C manteniéndose ahí por 18 min. más, el flujo de nitrógeno para la columna fue de 14 ml/min y el tiempo total en el cromatógrafo fue de 35min por muestra.

La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación con los tiempos de retención de metil ésteres estándares. Se calculó el contenido de cada ácido graso por las áreas totales de cada pico en el cromatograma.

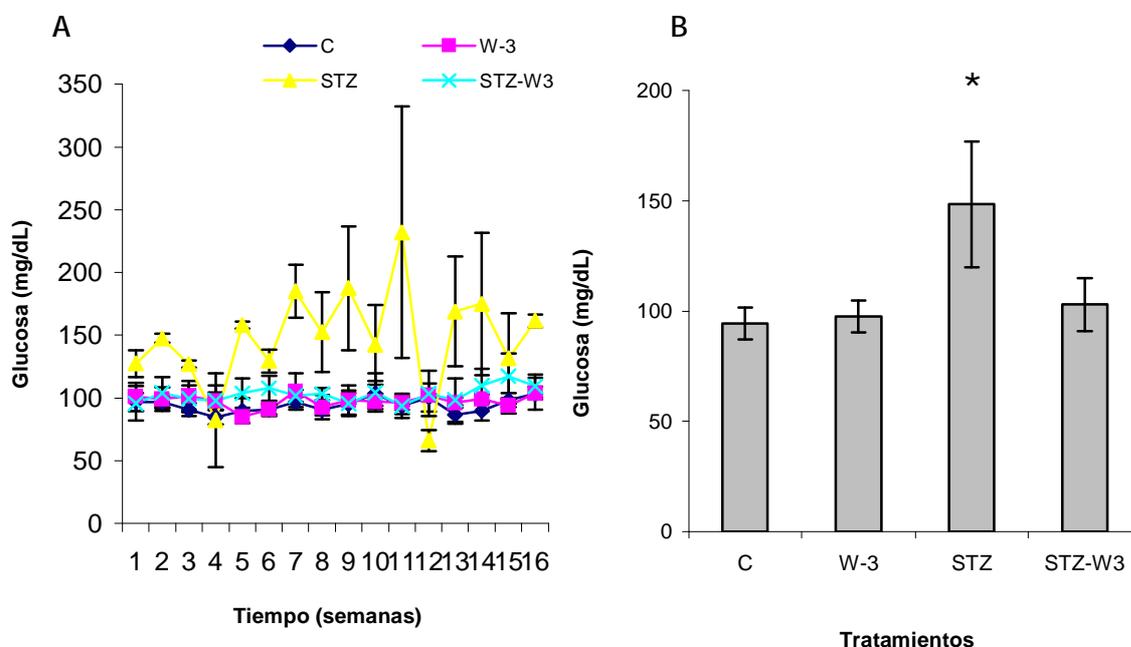
III.8.- Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados con la prueba de ANOVA simple ($n=5 \pm P < 0.05$) seguida por la prueba de Fisher.

IV.- RESULTADOS

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Se observó que los grupos Controles (C y ω -3), no presentaron cambios significativos entre sí. Sin embargo la inyección intraperitoneal de STZ - (100 mg/kg) en ratas neonatas, generó un modelo de DM2 (Gráfica 1A y 1B), ya que presentaron concentraciones de glucosa irregulares hasta de 150 mg/dL, existiendo diferencias significativas al compararlo con el grupo control. Cabe mencionar que las ratas diabéticas tratadas con un suplemento de omega 3 (ω -3) mostraron una disminución significativa con respecto al grupo tratado con STZ (Gráfica 1B).



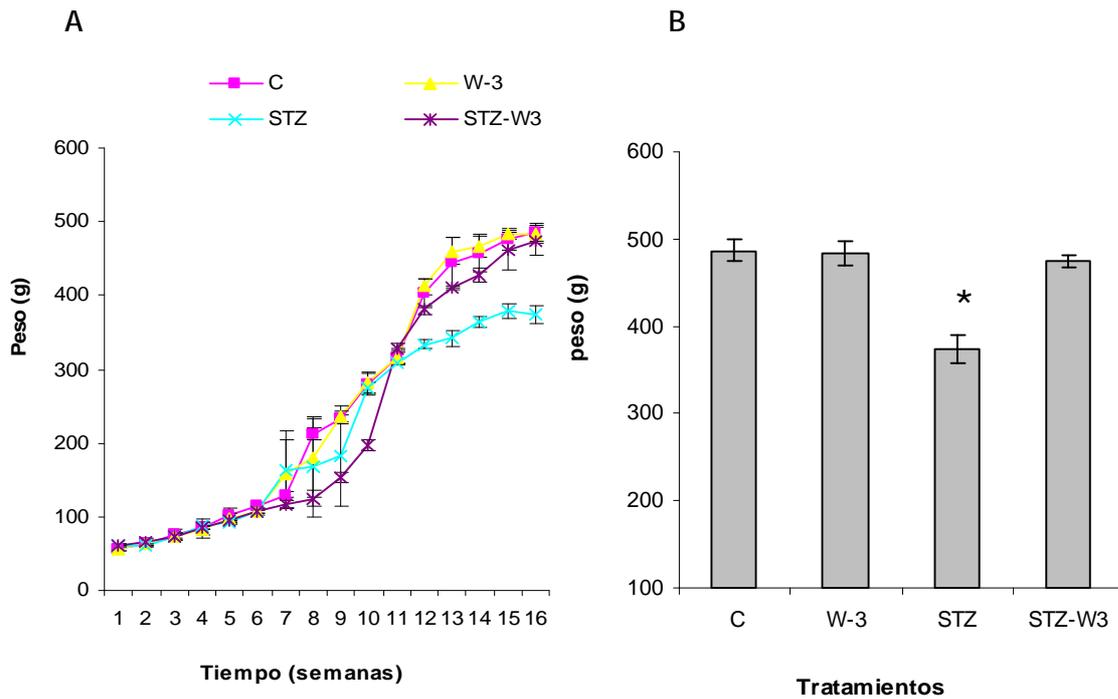
Gráfica 1.- Efecto del ω 3 en ratas con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre. Seguimiento de las concentraciones de glucosa durante 16 semanas a ratas tratadas con STZ. Se generó un modelo de diabetes no insulino dependiente (DM2) en ratas *Wistar* machos neonatos de 48 hrs. de vida, a los cuales se les administró una dosis única de 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en amortiguador de citratos (pH 4.5) vía intraperitoneal. Para valorar la concentración de glucosa en sangre se utilizó un glucómetro marca Digiview y tiras reactivas. Las determinaciones fueron realizadas 1 vez por semana durante 4 meses.

Las gráficas muestran: **A)** Seguimiento de los niveles de glucosa durante 16 semanas de tratamiento con diferentes dietas: STZ, C, ω 3 y STZ- ω 3. **B)** Gráfica de barras de los niveles de glucosa al final del tratamiento en ratas tratadas con diferentes dietas.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5 *p< 0.05 STZ vs C, ω 3, STZ- ω 3.

Efecto de los ácidos grasos omega 3 (ω -3), como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso corporal.

Se pudo observar que los grupos Controles: (C), (ω -3) y (STZ- ω 3) no presentaron cambios significativos entre sí (Gráfica 2A y 2B). Sin embargo, el lote tratado sólo con estreptozotocina (STZ) mostró significativamente una disminución en el peso de los animales con respecto a los controles (C y ω 3) a partir de la semana 12 y hasta la 16.



Gráfica 2.- Efecto del ω 3 en ratas con DM2 sobre el peso corporal.

Las ratas fueron destetadas a la tercera semana de edad, posteriormente se les administró omega 3 (ω 3) mediante canulación (EPA 360 mg/Kg – DHA 240 mg/Kg) y se pesaron 1 vez por semana durante 4 meses.

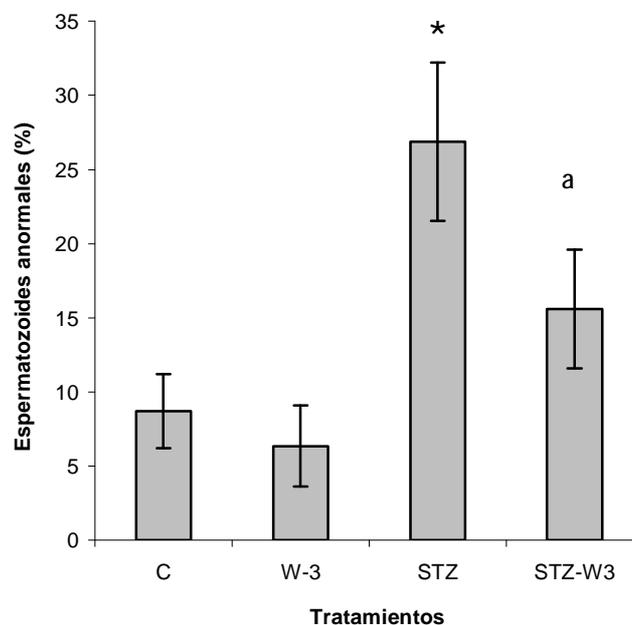
Las gráficas muestran: **A)** Seguimiento del peso durante 16 semanas de tratamiento con diferentes dietas: ratas diabéticas (STZ), control (C), omega 3 (ω 3) y STZ- omega 3 (STZ- ω 3). **B)** Peso corporal de las ratas al final del tratamiento.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. * $p < 0.05$ STZ vs C, ω 3, STZ- ω 3.

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Se consideraron como espermatozoides anormales a aquellas células obtenidas del conducto deferente, las cuales se encontraron sin flagelo (Oyeyemi y col., 2005).

Los grupos Controles (C y ω -3), no mostraron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, el lote tratado con STZ mostró estadísticamente un incremento significativo con respecto a los grupos controles (Gráfica 3). El lote de ratas STZ- ω 3 presentó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides anormales, comparándolo con el grupo de ratas tratadas con STZ.



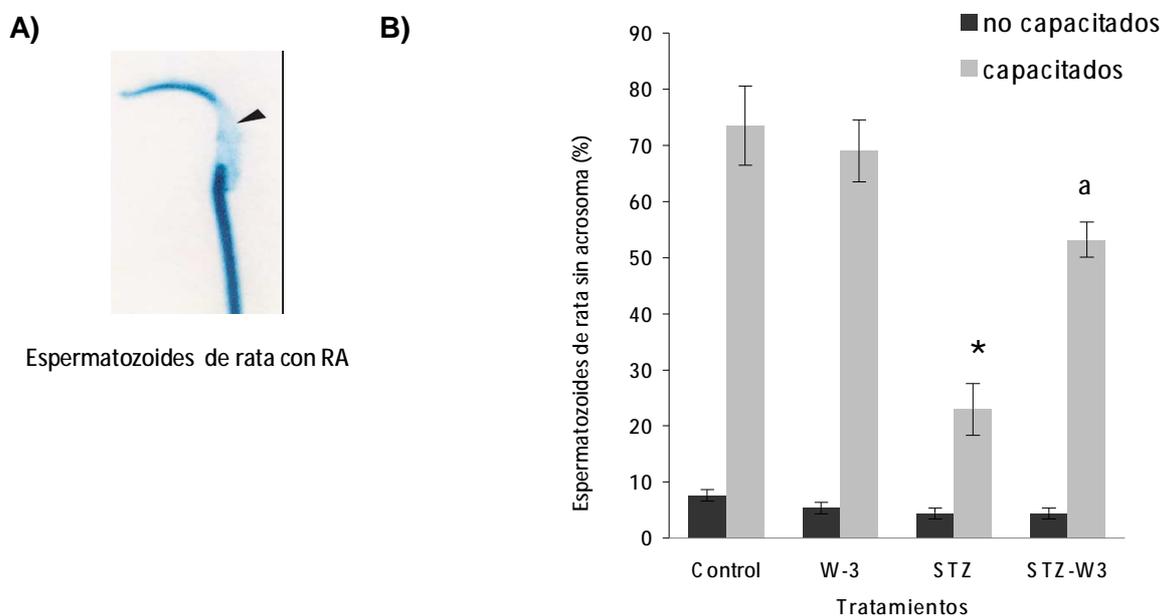
Gráfica 3.- Efecto del ω 3 en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Los espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes fueron lavados mediante centrifugación/resuspensión con NaCl 0.9% y montados en portaobjetos para su conteo.

Los valores mostrados corresponden al porcentaje de espermatozoides sin flagelo de los diferentes lotes de ratas tratadas con distintas dietas: (STZ, C, ω 3 y STZ- ω 3) y son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células. *p< 0.05 STZ vs C, ω 3. ^ap< 0.05 STZ- ω 3 vs C, ω 3, STZ.

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma.

Los espermatozoides fueron capacitados en un medio mínimo (ver Materiales y Métodos) durante 3 hrs. (Bendahmane y Zeng, 2002). Los espermatozoides capacitados, mostraron diferentes patrones de tinción con azul de coomassie, dependiendo del estado de capacitación en el que se encontraban. El grupo Control (C) y ω -3, no presentaron cambios significativos entre sí, ambos grupos sufrieron RA hasta en un 70% después de ser incubados en el medio capacitante. Sin embargo, el lote tratado con STZ mostró una disminución significativa con respecto a los grupos controles. Cabe mencionar que el lote de ratas STZ- ω 3 tuvo un incremento significativo, comparado con el grupo de ratas tratadas sólo con STZ (Gráfica 4).



Gráfica 4.- Efecto del ω 3 en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma.

Muestra un experimento representativo de 5 realizados. Las muestras capacitadas durante 3 hrs. fueron fijadas con formaldehído al 4%, neutralizados con NH_4Cl , lavadas, montadas en portaobjetos y teñidas con azul de coomassie, para ser observadas al microscopio óptico mediante el cual se valoró la pérdida de acrosoma por RA.

A) Patrón de tinción observado en los espermatozoides capacitados y con RA.

B) Porcentaje de espermatozoides que perdieron el acrosoma por RA.

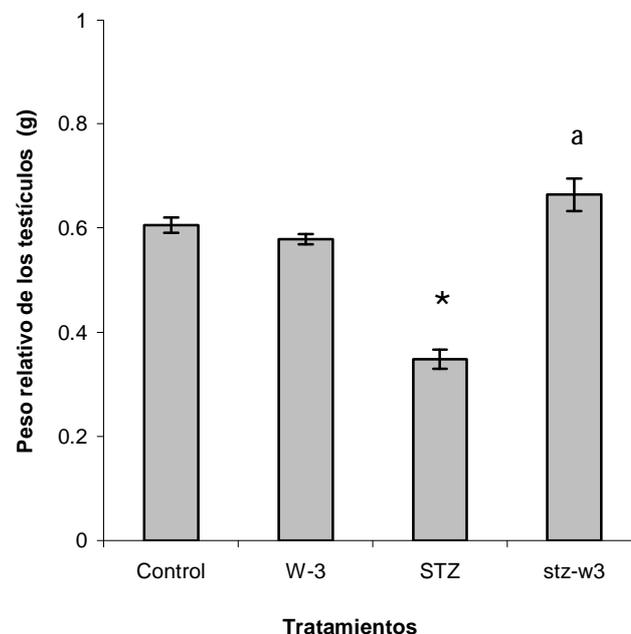
Los datos mostrados son la media \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

* $p < 0.05$ STZ vs C, ω 3, STZ- ω 3. ^a $p < 0.05$ STZ- ω 3 vs C, ω 3, STZ.

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso relativo de los testículos.

Para identificar algún cambio físico a nivel reproductivo en las ratas tratadas con las distintas dietas, se valoró el peso relativo de los testículos. El peso relativo se calculó usando la ecuación descrita por Tresierra y Culquichicón (1993), el cual consiste en el peso de la gónada / Peso del animal X 100.

Se pudo observar que los grupos C y ω -3, no presentaron cambios significativos entre si. Sin embargo, el lote tratado con STZ disminuyó significativamente con respecto a los grupos controles (Gráfica 5), el lote de ratas tratadas con STZ- ω 3 incrementó estadísticamente el peso del testículo, comparado con el grupo tratado con STZ.



Gráfica 5.- Efecto del ω 3 en ratas con DM2 sobre el peso relativo de los testículos.

Las ratas al ser destetadas, se les administró como suplemento alimenticio omega 3 (ω 3) mediante canulación (EPA 360 mg/Kg – DHA 240 mg/Kg) durante 4 meses, enseguida fueron sacrificadas y los testículos fueron obtenidos, lavados con NaCl 0.15 M y finalmente pesados.

Las gráficas muestran: El peso relativo de los testículos de ratas tratadas con las diferentes dietas y son la media \pm d.s n=5. *p< 0.05 STZ vs C, ω 3, STZ- ω 3. ^ap< 0.05 STZ- ω 3 vs C, ω 3, STZ.

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la composición de ácidos grasos en testículo.

Los testículos fueron procesados para la extracción lipídica por el método de Folch y colaboradores (1957) y se analizó la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases. Las ratas tratadas con STZ mostraron un decremento significativo en la concentración de ácido docosahexaenóico (DHA) y eicosapentaenóico (EPA), comparado con los grupos que fueron tratados con ω 3 y STZ- ω 3. Además, se pudo observar que el ácido linoleico se encuentra en grandes concentraciones en testículo, disminuyendo significativamente en ratas diabéticas. Sin embargo, la administración de ω 3 como suplemento alimenticio en el lote de ratas con STZ (STZ- ω 3), ayudó de manera parcial a restituir el contenido de ácido linoleico (Tabla 4).

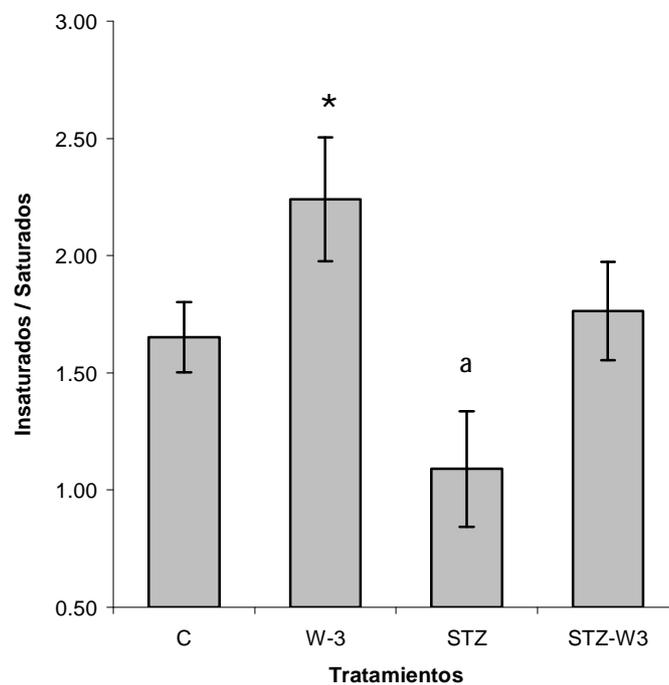
Tabla 4.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratadas con ω 3.

Nombre de M.E.	Control	ω -3	STZ	STZ- ω -3
Laúrico	0.1% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.7% \pm 1.7	0.0% \pm 0.0
Mirístico	0.9% \pm 0.2	0.9% \pm 0.2	0.9% \pm 0.3	1.1% \pm 0.3
Miristoleico	0.1% \pm 0.2	0.2% \pm 0.0	0.2% \pm 0.0	0.2% \pm 0.1
Palmítico	27.7% \pm 4.9	25% \pm 2.1	27.9% \pm 7.1	27.3% \pm 4.1
palmitoleico	3.7% \pm 0.8	4.9% \pm 1.1	3.2% \pm 1.8	5.0% \pm 1.4
Esteárico	6.6% \pm 2.0	4.2% \pm 0.9	6.0% \pm 2.6	4.7% \pm 0.4
Oleico	20.8% \pm 7.3	24.9% \pm 3.5	21.8% \pm 9	26.7% \pm 8.2
Linoleico	20.1% \pm 5.1	19.8% \pm 4.5	12.8% \pm 3.1	15.8% \pm 2.5
g linoleico	0.4% \pm 0.2	0.1% \pm 0.0	0.1% \pm 0.0	0.2% \pm 0.1
Linolénico	1.1% \pm 0.4	1.1% \pm 0.3	0.8% \pm 0.1	0.8% \pm 0.1
CLA1	0.5% \pm 0.1	0.3% \pm 0.1	0.4% \pm 0.1	0.6% \pm 0.0
araquidato	0.2% \pm 0.1	0.1% \pm 0.0	0.8% \pm 0.2	0.2% \pm 0.0
eicosanoato	1.0% \pm 0.3	0.7% \pm 0.2	7.9% \pm 0.5	3.0% \pm 1.2
Araquidónico	6.2% \pm 2.6	7.6% \pm 2.9	5.4% \pm 1.1	3.8% \pm 0.2
EPA	0.3% \pm 0.3	2.0% \pm 0.1	0.2% \pm 0.0	3.7% \pm 0.4
Erucato	2.5% \pm 1.9	2.9% \pm 1.4	1.9% \pm 0.5	1.5% \pm 0.3
DHA	0.5% \pm 0.3	3.8% \pm 0.4	0.2% \pm 0.1	1.7% \pm 0.4
Compuestos de 20:3	3.1% \pm 1.3	1.3% \pm 0.2	4.4% \pm 1.6	2.5% \pm 0.1
A. Grasos no identificados	3.8% \pm 2.4	1.1% \pm 0.4	4.2% \pm 1.3	1.3% \pm 0.2

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

El lote tratado con ω -3 incrementó significativamente el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) comparado con el grupo control (C). Sin embargo la diabetes indujo un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados en los testículos de las ratas tratadas con STZ (Gráfica 6), mientras la adición de un suplemento basado en ω -3 a ratas diabéticas incrementó significativamente el contenido de AGPI's, comparado con el lote que fue tratado con STZ.



Gráfica 6.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2 mediante cromatografía de gases.

El gráfico muestra el grado de fluidez membranal mediante un cociente de insaturación (porcentaje de ácidos grasos insaturados/ saturados) obtenidos en testículo de ratas *Wistar* tratadas con distintas dietas: C, ω 3, STZ- ω 3. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

*p< 0.05 ω 3 vs C, STZ, STZ- ω 3. ^ap< 0.05 STZ vs C, ω 3, STZ- ω 3

Efecto de los ácidos grasos (ω -3), como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el tipo de asociaciones celulares en testículo.

La espermatogénesis en ratas muestra diferentes etapas de desarrollo celular, las cuales son conocidas como asociaciones celulares y destacan en esta 19 tipo celulares y 14 asociaciones. Para valorar los posibles cambios en el desarrollo espermático, se contaron diferentes tipos de asociaciones celulares, de las cuales la asociación IX representa etapas de células inmaduras y la asociación VIII a una etapa de células maduras (Fig.9 A y 9 B).

Los grupos Controles (C y ω -3), no mostraron cambios significativos entre sí, ya que ambos grupos presentaron la asociación VIII (Fig.9A y 9B). Sin embargo, el grupo tratado con STZ mostró un aumento significativo, hasta en un 25% de células pertenecientes a la asociación número IX, donde las espermátidas aún son inmaduras (Fig. 9 B3) comparado con el grupo control. Por otro lado, se observó que al administrar un suplemento de ω -3 a ratas diabéticas se encuentra una relación similar de los dos estadios (VIII y IX) del desarrollo espermático, ya que no existen diferencias significativas. Sin embargo predomina la abundancia de la asociación VIII (Fig. 9 B4).

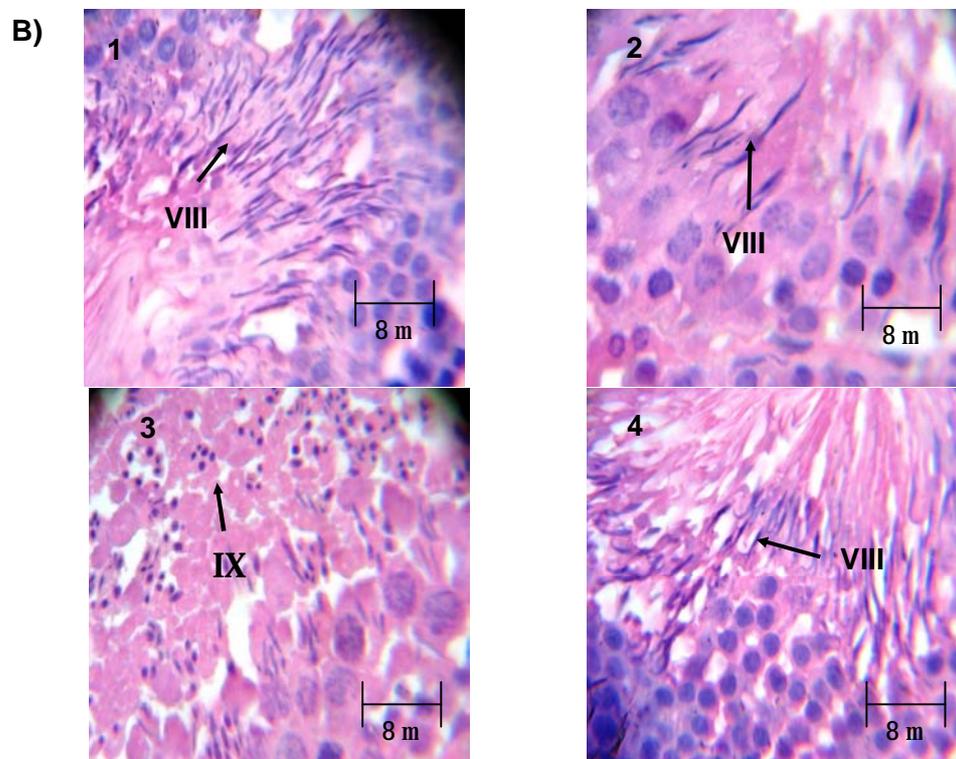
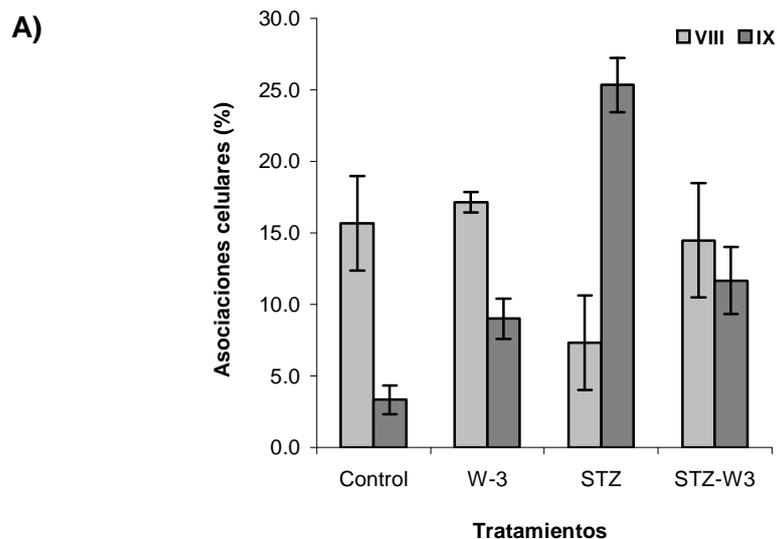


Figura 9.- Efecto del ω 3 en ratas *Wistar* con DM2 sobre el tipo de asociaciones celulares de testículo

A) Se muestra el porcentaje de asociaciones celulares presentes en el testículo de ratas tratadas con diferentes dietas: STZ, C, ω 3 y STZ- ω 3. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 20 túbulos seminíferos.

B) Se observan los cortes histológicos de los testículos de ratas tratadas con: 1); C, 2); ω 3, 3); STZ, 4); STZ - ω 3. Posteriormente se realizaron conteos de 20 túbulos seminíferos por laminilla, para valorar las asociaciones presentes. La etapa **VIII.-** representa espermátidas maduras, las cuales se caracterizan por tener un núcleo oscuro y flagelos alargados; la etapa **IX.-** se refiere a las espermátidas redondas las cuales son consideradas como inmaduras. **Tinción H - E 100X.**

Efecto de los ácidos grasos ω -3, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología del testículo.

Los testículos de las ratas diabéticas mostraron una degeneración de túbulos seminíferos: (proceso degenerativo y de necrosis observada, caracterizada por un aumento en el volumen celular cuyo citoplasma es grumoso y turbio “de vidrio esmerilado”, el núcleo conserva sus características morfológicas y tintoriales). La necrosis se observó como núcleos en picnosis, criorrhexis y cariolisis, con disminución en el tamaño y número de células que conforman las diversas capas del túbulo seminífero. Del mismo modo se ve afectada, la cantidad y morfología de las espermátidas. Este tipo de lesión indica una alteración temprana de la homeostasis celular causando estragos en el funcionamiento metabólico, en la mitosis y en el desarrollo celular. Los grupos controles: C y ω 3, no presentaron cambios patológicos aparentes (Fig. 10A y 10B). Sin embargo, el lote con STZ mostró una posible acumulación de compuestos amiloides en membranas basales y degradación de túbulos seminíferos con respecto a los lotes control (Fig. 10C). El lote STZ - ω 3 sólo presentó una degradación de túbulos seminíferos difusa moderada, comparada con el lote tratado con STZ (Fig. 10 D).

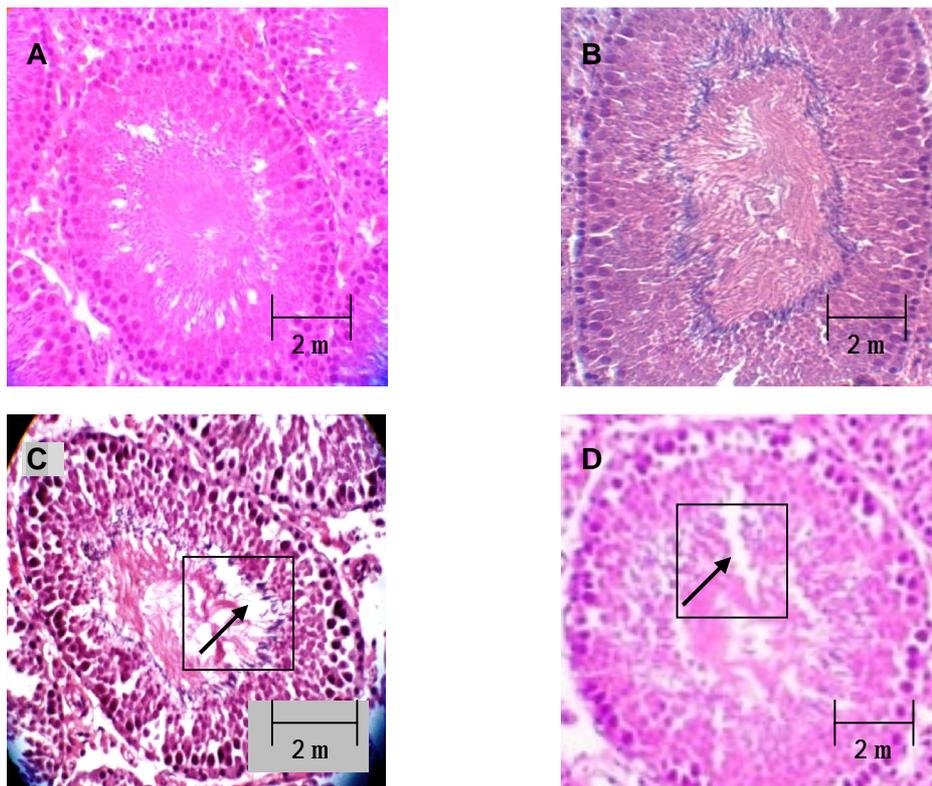
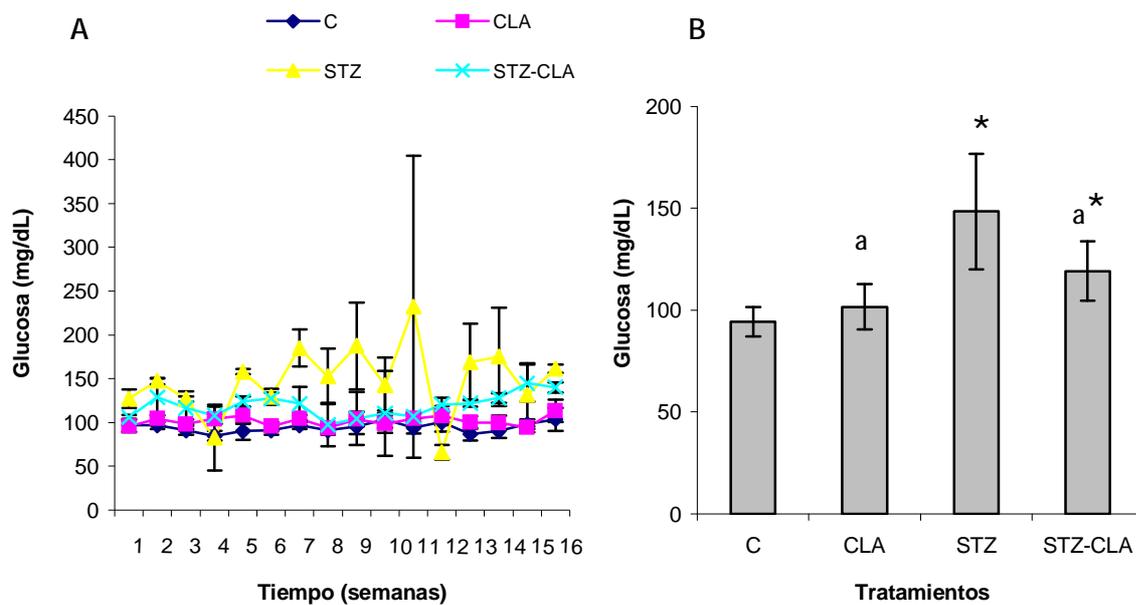


Figura 10.- Corte transversal histológico de testículos de ratas *Wistar* con DM2, tratadas con ω 3.

Las ratas fueron tratadas con distintas dietas: A); C.- sin cambio patológico aparente, B); ω 3.- sin cambio patológico aparente, C); STZ .- degradación de túbulos seminíferos, D); STZ - ω 3 degradación de túbulos seminíferos difusa moderada. **Tinción H-E 40X.**

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Los grupos Controles (C) y (CLA), no presentaron cambios significativos entre si. Específicamente se dio un incremento de glucosa en sangre hasta 150 mg/dL, en el grupo STZ existiendo diferencias significativas con respecto al grupo control (gráfica 7 A y 7 B). Por otro lado, las ratas diabéticas tratadas con el suplemento de CLA mostraron una disminución en los niveles de glicemia, aunque no significativa con respecto al grupo de ratas diabéticas.



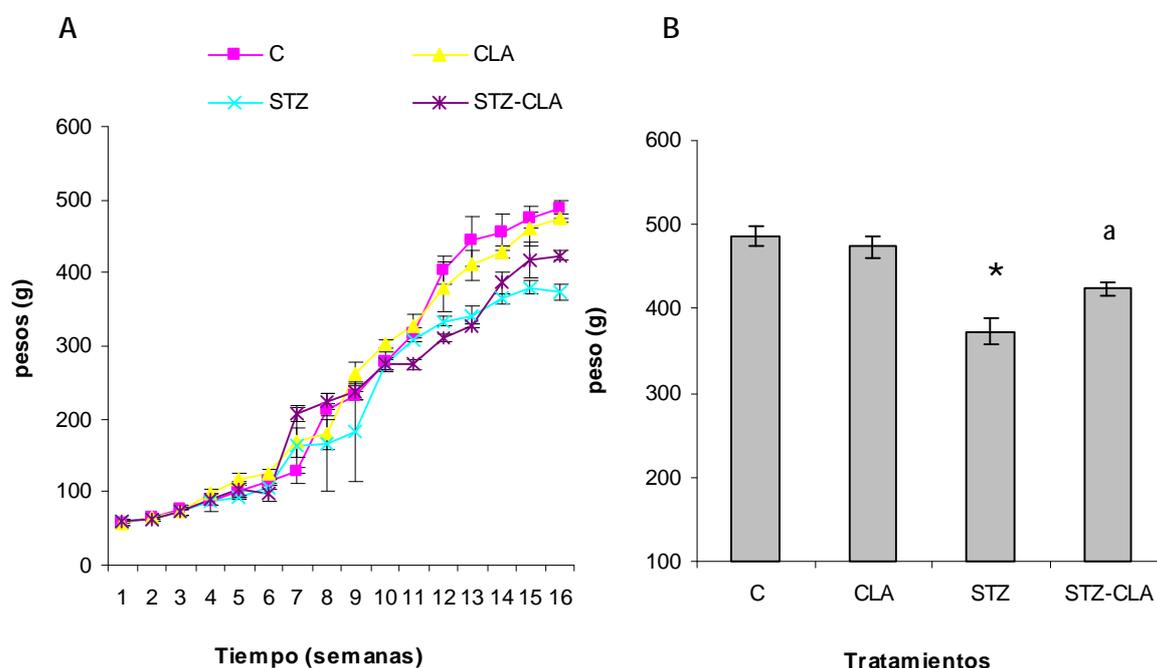
Gráfica 7.- Efecto del CLA en ratas *Wistar* con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre.

Las determinaciones glucométricas fueron realizadas 1 vez por semana durante 4 meses. Las gráficas muestran: **A)** Seguimiento de los niveles de glucosa durante 16 semanas de tratamiento con diferentes dietas: STZ, C, ácido linoleico conjugado (CLA) y STZ-CLA. **B)** la gráfica representa los niveles de glucosa al final del tratamiento de los diferentes lotes de ratas.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. * $p < 0.05$ STZ vs C, .^a $p < 0.05$ CLA vs STZ.

Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA), como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso corporal.

Las ratas fueron destetadas a la tercera semana de edad, posteriormente se les administró diariamente y durante 4 meses ácido linoleico conjugado (CLA) mediante canulación 1.04 g/Kg. Se pudo observar que los grupos Controles (C) y (CLA) fueron estadísticamente iguales. Por otro lado, el lote tratado sólo con STZ disminuyó significativamente el peso de los animales, comparado con sus respectivos controles (gráficas 8A y 8B). Así mismo el grupo de ratas diabéticas al que se le administró una dieta de CLA aumentó significativamente el peso de los animales comparado con el lote tratado sólo con STZ.



Gráfica 8.- Efecto del CLA en ratas *Wistar* con DM2 sobre el peso corporal.

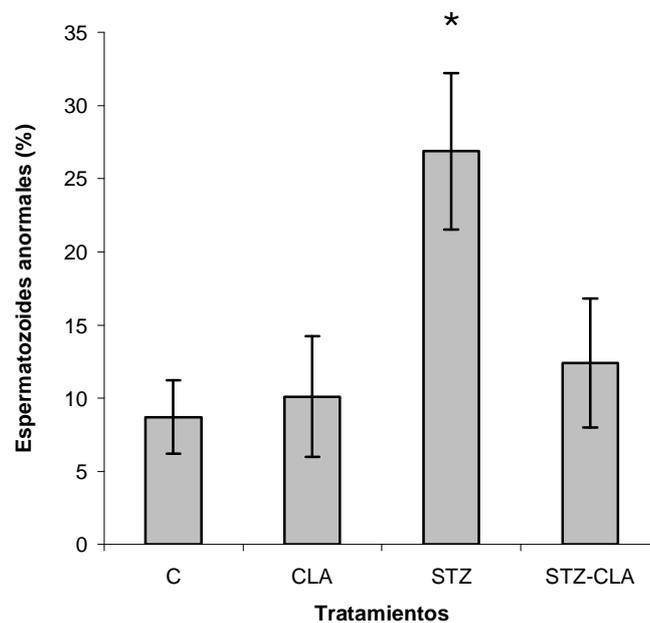
A) Seguimiento del peso durante 16 semanas de tratamiento en los distintos lotes: STZ, C, CLA y STZ- CLA.

B) peso corporal de las ratas al final del tratamiento. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

* $p < 0.05$ STZ vs C, CLA. ^a $p < 0.05$ STZ- CLA vs C, CLA, STZ.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Los lotes C y CLA no presentaron diferencias significativas entre si. En cambio el lote tratado con STZ incrementó significativamente el porcentaje de espermatozoides anormales comparado con sus respectivos controles (Gráfica 9). Sin embargo, el grupo de ratas diabéticas al que se le administró una dieta con CLA redujo el porcentaje de gametos anormales comparado con el grupo tratado únicamente con STZ.



Gráfica 9.-. Porcentaje de espermatozoides anormales en ratas con DM2 tratadas con CLA.

Los espermatozoides fueron extraídos del conducto deferente, lavados mediante centrifugación/ resuspensión y montados en portaobjetos para su conteo.

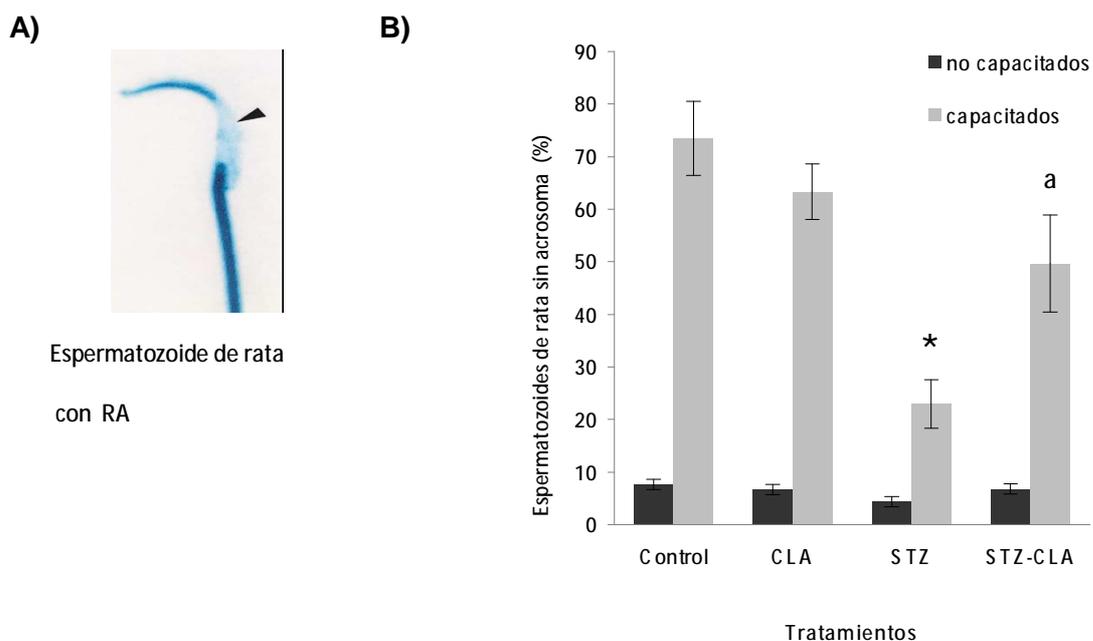
Los valores mostrados corresponden al porcentaje de espermatozoides sin flagelo de los diferentes lotes: STZ, C, CLA y STZ- CLA y son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

*p< 0.05 STZ vs C, CLA, STZ- CLA.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma.

Los espermatozoides extraídos de conducto deferente, fueron capacitados durante 3 hrs. en un medio suplementado con glucosa, ác. pirúvico y ác. láctico. Posteriormente fueron montados en portaobjetos y teñidos con azul de Coomassie para valorar la RA.

Los lotes C y CLA, después de ser incubados en el medio capacitante perdieron el acrosoma hasta un 70%, pero no mostraron diferencias significativas entre si. Sin embargo, en las ratas tratadas con STZ decrece significativamente el porcentaje de reacción acrosomal con respecto a los grupos controles (Gráfica 10). Cabe destacar que en las ratas diabéticas tratadas con CLA se incrementan significativamente el porcentaje de espermatozoides con RA comparado con el grupo tratado sólo con stz.



Gráfica 10.- Porcentaje de espermatozoides con RA, de las ratas tratadas con CLA.

A) Patrón de tinción observada en espermatozoides capacitados y con RA.

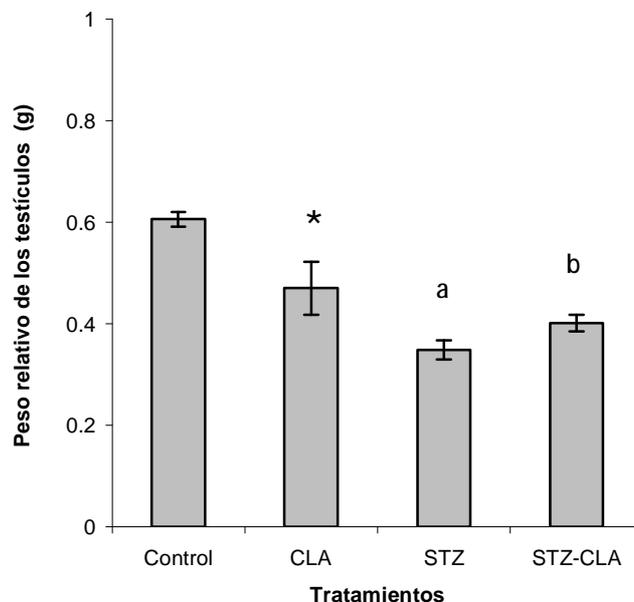
B) Porcentaje de espermatozoides con RA

Los datos mostrados son la media \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

* $p < 0.05$ STZ vs C, CLA, STZ- CLA. ^a $p < 0.05$ STZ- CLA vs C, CLA.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso relativo de los testículos.

Los testículos de cada lote fueron pesados en una balanza analítica. Las ratas que recibieron durante 4 meses el CLA (104 mg/Kg), presentaron una disminución en el peso gonadal con respecto al grupo control (C). Sin embargo, el lote de ratas que recibió una dosis de 100 mg/Kg. de STZ redujeron significativamente el peso relativo del testículo comparándolo con los grupos controles C y CLA. Cabe señalar que el lote de ratas diabéticas a las que se les administró CLA, incrementó significativamente el peso del testículo, comparado con el grupo de STZ. (Gráfica 11)



Gráfica 11.- Efecto del CLA en ratas *Wistar* con DM2 sobre el peso relativo de los testículos.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

* $p < 0.05$ CLA vs C, STZ. ^a $p < 0.05$ STZ vs C, CLA. ^b $p < 0.05$ STZ-CLA vs C, CLA, STZ.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la composición de ácidos grasos en testículo.

El grupo de ratas al que se les administró CLA mostró un incremento de los ácidos: palmitoléico, oléico, linoleico, linolénico, EPA y DHA, lo que podría favorecer a una mayor fluidez membranal (Ver tabla 5). Sin embargo en ratas diabéticas disminuyen dichos ácidos.

Tabla 5.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2 tratadas con CLA.

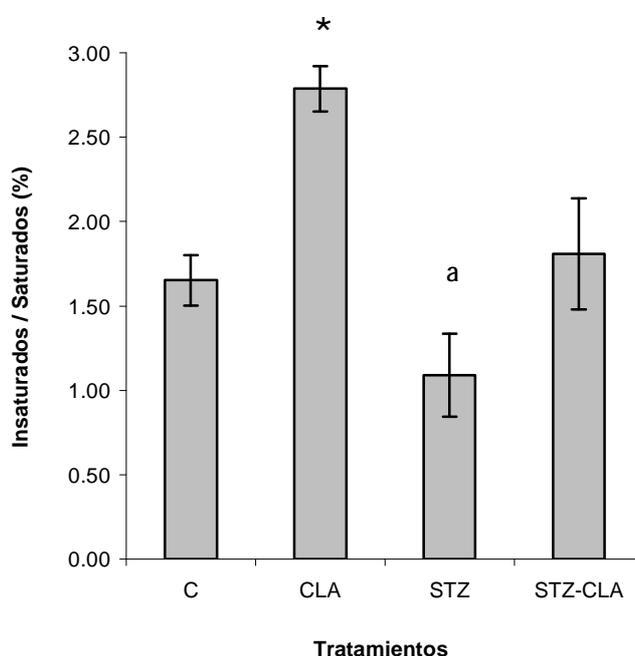
Nombre de M.E.	Control	CLA	STZ	STZ-CLA
Laúrico	0.1% ± 0.1	0.1% ± 0.0	0.7% ± 1.7	0.0% ± 0.0
Mirístico	0.9% ± 0.2	1.0% ± 0.1	0.9% ± 0.3	1.9% ± 0.3
Miristoleico	0.1% ± 0.2	0.0% ± 0.0	0.2% ± 0.0	0.0% ± 0.0
Palmitico	27.7% ± 4.9	18.2% ± 4.1	27.9% ± 7.1	24.3% ± 2.8
palmitoleico	3.7% ± 0.8	4.7% ± 1.1	3.2% ± 1.8	3.7% ± 1.1
Esteárico	6.6% ± 2.0	6.2% ± 4.7	6.0% ± 2.6	5.9% ± 2.3
Oleico	20.8% ± 7.3	33.5% ± 6.5	21.8% ± 9	27.5% ± 4.7
Linoleico	20.1% ± 5.1	22.6% ± 3.5	12.8% ± 3.1	19.4% ± 6.1
g linoleico	0.4% ± 0.2	0.2% ± 0.0	0.1% ± 0.0	0.0% ± 0.0
Linolénico	1.1% ± 0.4	1.5% ± 0.2	0.8% ± 0.1	1.5% ± 0.2
CLA1	0.5% ± 0.1	5.7% ± 0.1	0.4% ± 0.1	0.7% ± 0.5
araquidato	0.2% ± 0.1	0.1% ± 0.0	0.8% ± 0.2	0.4% ± 0.2
eicosanoato	1.0% ± 0.3	0.3% ± 0.1	7.9% ± 0.5	2.4% ± 1.9
Araquidónico	6.2% ± 2.6	1.5% ± 0.2	5.4% ± 1.1	3.9% ± 0.2
EPA	0.3% ± 0.2	0.3% ± 0.2	0.2% ± 0.1	0.9% ± 0.5
Erucato	2.5% ± 1.9	0.0% ± 0.0	1.9% ± 0.5	0.4% ± 0.3
DHA	0.5% ± 0.3	0.9% ± 0.5	0.2% ± 0.1	0.6% ± 0.4
Compuestos de 20:3	3.1% ± 1.3	1.2% ± 0.3	4.4% ± 1.6	2.7% ± 1.8
A. Grasos no identificados	3.8% ± 2.4	1.9% ± 0.6	4.2% ± 1.3	2.4% ± 1.2

La concentración porcentual de ácidos grasos presentes en testículos fue valorada por cromatografía de gases. Los datos mostrados son la media aritmética ± d.s n=5.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

Se realizó un cociente de ácidos grasos insaturados / saturados. El grupo tratado con ácido linoleico conjugado CLA presenta un incremento significativo en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's), comparado con el grupo control C.

Así mismo se observó que el grupo de ratas tratadas con STZ disminuye la proporción de AGPI's. Al administrar un suplemento basado en CLA en ratas diabéticas incrementa significativamente el contenido de AGPI's, comparado con el lote STZ (Gráfica 12).



Gráfica 12.- Efecto del CLA en ratas *Wistar* con DM2 sobre el cociente de saturación de ácidos grasos en testículo. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

* $p < 0.05$ CLA vs C, STZ, STZ- CLA. ^a $p < 0.05$ STZ vs C, CLA, STZ-CLA.

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología testicular de diferentes asociaciones celulares.

Las asociaciones celulares en testículo de las ratas tratadas con las distintas dietas fueron valoradas mediante histología, cada asociación fue localizada en los túbulos seminíferos y contadas para la determinación de posibles anomalías en el desarrollo espermático.

El grupo C (ver Fig. 9A y 9B) y el lote tratado CLA mostraron mayor predominio de la asociación VIII y no presentaron cambios significativos entre sí (Fig. 11A). Sin embargo, el grupo tratado sólo con STZ (ver Fig. 9 B3) incrementaron estadísticamente la asociación número IX comparado con sus respectivos controles. Al administrar CLA a ratas con STZ no se observó diferencias significativas entre los dos estadios (VIII y IX) del desarrollo espermático, pero si respecto al lote tratado con STZ (Fig. 11A y 11B).

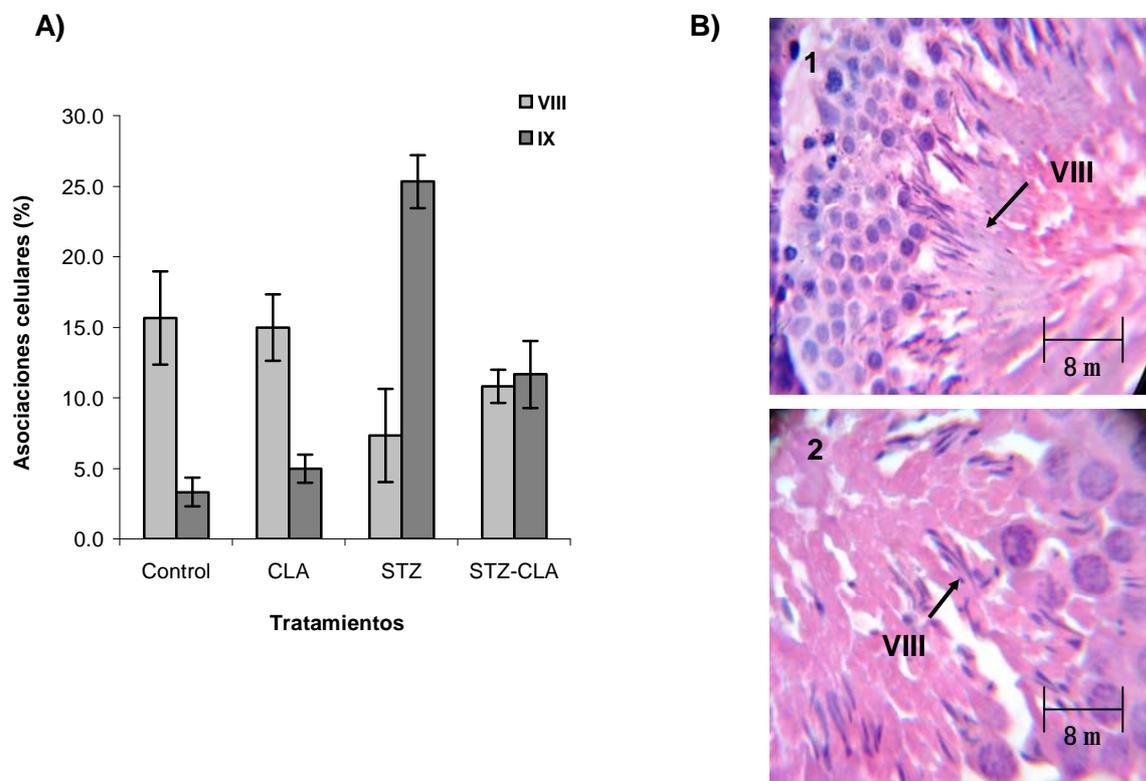


Figura 11.- Análisis histológico de asociaciones celulares presentes en testículos de ratas con DM2 y tratadas con CLA. **A)** Porcentaje de asociaciones celulares presentes en el testículo de ratas tratadas con STZ y CLA.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 20 túbulos seminíferos.

B) Las imágenes corresponden a los lotes: 1); **CLA** 2); **STZ – CLA**, revelaron una elevada población de espermátidas en etapa **VIII** donde las espermátidas ya son maduras. **Tinción H-E 100X.**

Efecto del CLA, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología del testículo.

El estudio histológico muestra que el grupo Control no presentó cambios patológicos aparentes (Fig. 12A). Sin embargo, el lote tratado sólo con CLA presentó una degeneración de túbulos seminíferos de leve a moderada (Fig. 12B).

En el caso de ratas con STZ se presentó una posible amiloidosis en membranas basales, así como una degradación de túbulos seminíferos con respecto al grupo control (Fig. 12C). Por otro lado, en el lote de ratas con STZ y que se les administró CLA sólo presentó una degradación de túbulos seminíferos difusa-leve-moderada (Fig. 12D).

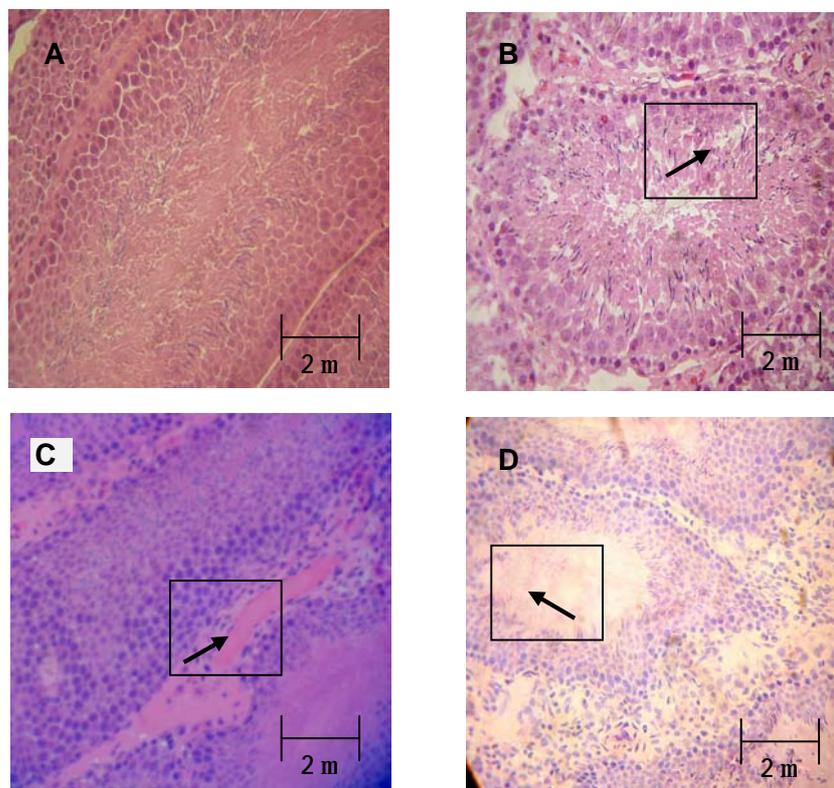


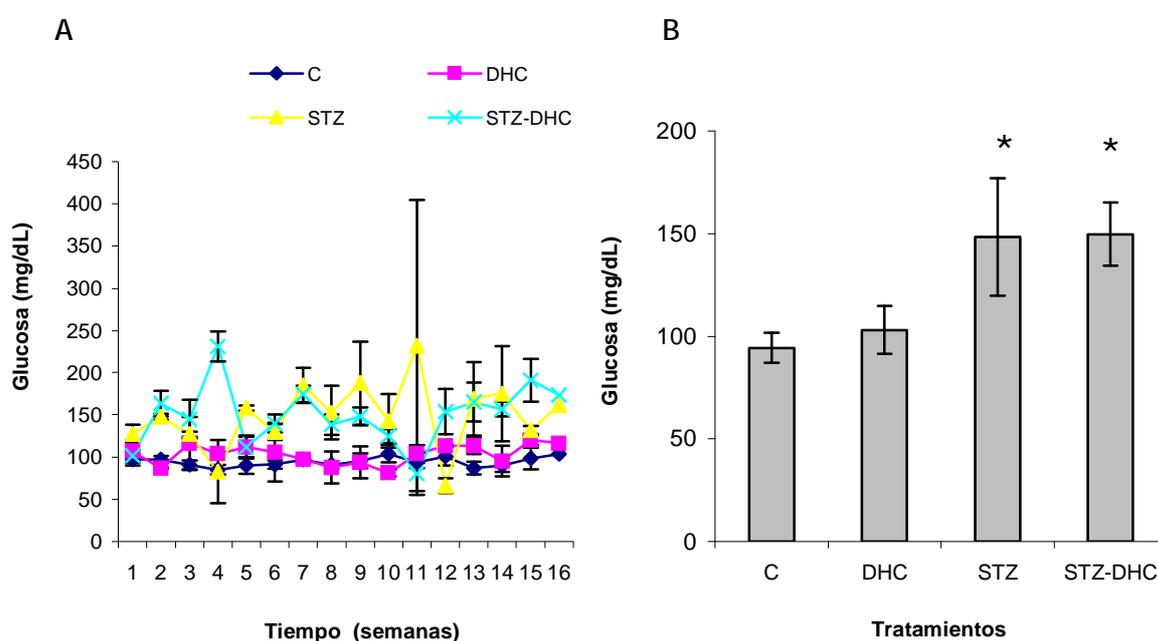
Figura 12.- Histología de los testículos de ratas *Wistar* con DM2 tratadas con CLA.

Corte transversal de testículo de ratas *Wistar* tratadas con distintas dietas: A); C.- sin cambio patológico aparente, B); CLA.- degeneración de túbulos seminíferos leve moderada, C); STZ.- degradación de túbulos seminíferos, con posible amiloidosis, D); STZ – CLA degradación de túbulos seminíferos difusa leve moderada
Tinción H-E 40X.

Efecto de la DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Los grupos C y DHC, mantuvieron sus niveles de glicemia dentro de los rangos normales (normoglicemia), sin cambios significativos entre sí. Sin embargo, las ratas tratadas con STZ, incrementaron la concentración de glucosa hasta 150 mg/dL. Esto nos muestra variaciones significativas con respecto al control.

Es necesario destacar que el grupo STZ - DHC no mostró cambios significativos con respecto al grupo de ratas con STZ. Sin embargo, ambos lotes incrementan de la misma manera y son estadísticamente diferentes con respecto al control (Gráficas 13A y 13B).



Gráfica 13.- Concentración de glucosa en sangre de ratas con DM2 tratadas con DHC.

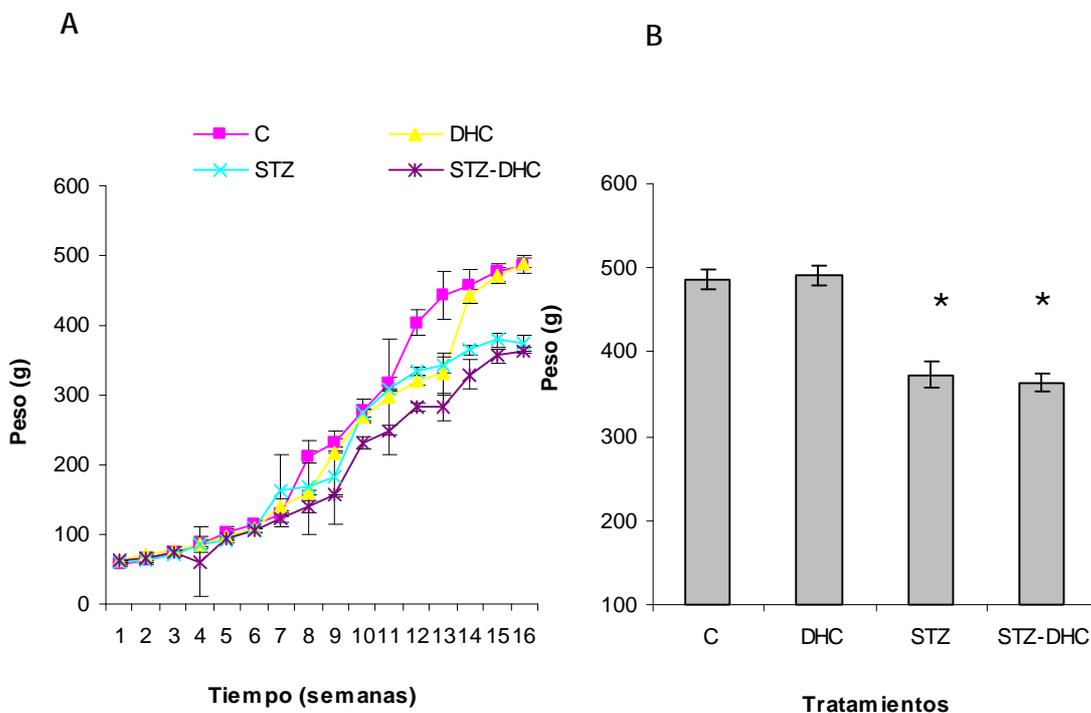
Las ratas al ser destetadas se les proporcionó una dieta hipercalórica que consistía en 13% grasa saturada en el alimento y 10% de sacarosa en el agua. Posteriormente fue valorada la concentración de glucosa en sangre una vez por semana durante 4 meses.

Las gráficas muestran: **A)** Seguimiento de la glucosa durante 16 semanas de ratas tratadas con STZ, C, DHC y STZ- DHC. **B)** Niveles de glucosa al final del tratamiento. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p< 0.05 STZ vs C, DHC. *p< 0.05 STZ - DHC vs C, DHC.

Efecto de una DHC, como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso corporal.

Las ratas fueron destetadas a la tercera semana de edad. A partir de ese momento se les proporcionó una dieta hipercalórica que consistía en 13% grasa saturada en el alimento y 10% de sacarosa en agua. El peso de cada lote fue evaluado con una balanza granataria, 1 vez por semana durante 4 meses.

Las ratas tratadas con DHC no presentaron diferencias significativas con respecto al C. Por otro lado, los grupos que recibieron una dosis de STZ y el lote STZ-DHC no mostraron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, dichos lotes disminuyeron significativamente el peso de los animales comparado con el control (Gráficas 14A y 14B).



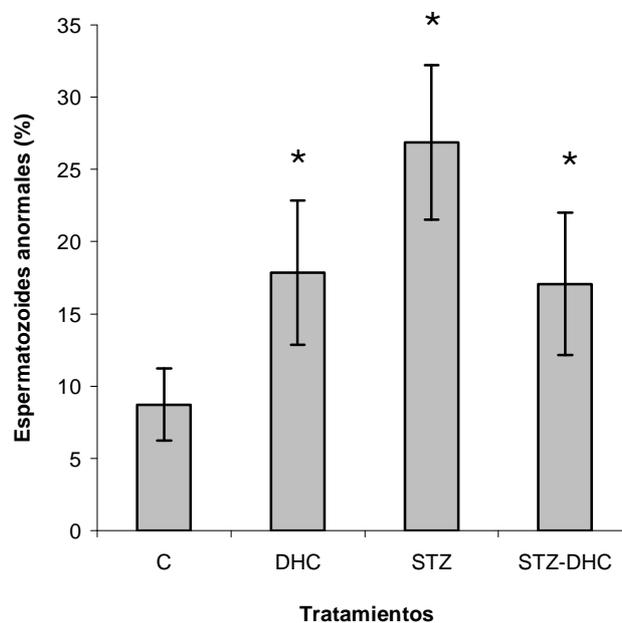
Gráfica 14.- Efecto de la DHC en ratas con DM2 sobre el peso corporal.

Se observó **A)** Seguimiento del peso durante 16 semanas de tratamiento con diferentes dietas: STZ, C, dieta hipercalórica (DHC) y STZ- DHC. **B)** Peso corporal de ratas tratadas con: STZ, C, DHC y STZ- DHC.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. * $p < 0.05$ STZ vs C, DHC. * $p < 0.05$ STZ - DHC vs C, DHC.

Efecto de una DHC, como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Se realizó un conteo de espermatozoides completos con la finalidad de detectar las células que carecían de flagelo y se observó que el grupo con DHC presentó diferencias significativas con respecto al Control. Los lotes tratados con STZ y el STZ-DHC no mostraron diferencias significativas entre sí, sin embargo dichos lotes elevan significativamente el porcentaje de espermatozoides anormales, comparado con el lote control (Gráfica 15).



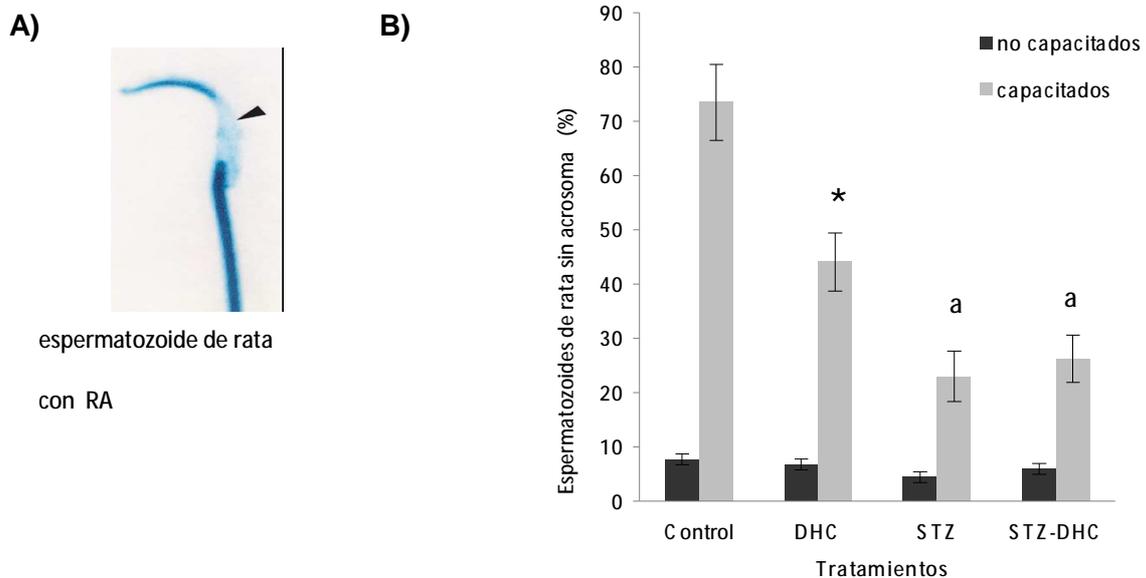
Gráfica 15.- Efecto de la DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides que carecen de flagelo. Los valores de la gráfica pertenecen al conteo de espermatozoides que pierden el flagelo de las ratas tratadas con STZ, C, DHC y STZ- DHC.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

* $p < 0.05$ DHC, STZ, STZ – DHC vs C.

Efecto de la DHC, como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides que pierden el acrosoma después de ser capacitados.

Para valorar la pérdida de acrosoma, los espermatozoides fueron capacitados durante 3 hrs. Aquellos gametos que no fueron capacitados no tuvieron cambio alguno en la morfología de su membrana. En cambio el grupo tratado sólo con una DHC, después de ser incubados en el medio capacitante, se redujo significativamente la pérdida del acrosoma comparado con el grupo control capacitado. Los espermatozoides de las ratas tratadas con STZ decrece estadísticamente aún más que el lote DHC y C. Cabe resaltar que el grupo experimental de ratas con STZ - DHC no presentó diferencias con aquellos animales tratados sólo con STZ (Gráfica 16).



Gráfica 16.- Efecto de la DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides con RA.

A) Patrón de tinción observado en los espermatozoides capacitados y con RA.

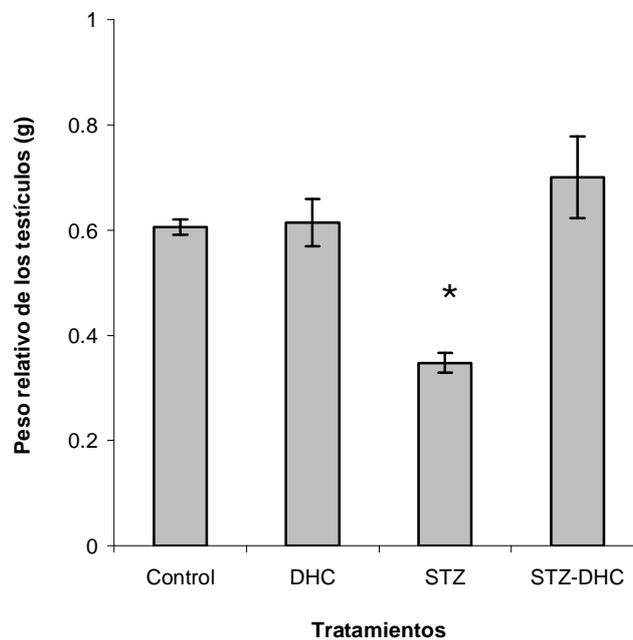
B) Porcentaje de espermatozoides de los grupos STZ, C, DHC y STZ- DHC que pierden el acrosoma por RA.

Los datos mostrados son la media \pm d.s n= 5. Para cada muestra se contaron por triplicado 200 células.

* $p < 0.05$ DHC vs C, STZ, STZ - DHC. ^a $p < 0.05$ STZ, STZ - DHC vs C, DHC.

Efecto de la DHC, como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso relativo de los testículos.

Al comparar el grupo control con el lote de ratas al que sólo se le proporcionó una DHC no se observan cambios significativos. Sin embargo, el lote tratado con STZ disminuye drásticamente el peso relativo de los testículos. Cabe mencionar que el grupo STZ- DHC incrementa significativamente el peso relativo de las gónadas comparado con el grupo STZ (Gráfica 17).



Gráfica 17.- Efecto de la DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre el peso relativo de los testículos.

Peso relativo de los testículos de ratas tratadas con STZ, C, DHC y STZ- DHC.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p< 0.05 STZ vs C, DHC, STZ – DHC.

Efecto de la DHC, sobre la composición de ácidos grasos en testículo de rata *Wistar* con DM2.

Se determinó la composición de ácidos grasos en testículos de ratas *Wistar*. Dicha composición fue valorada mediante cromatografía de gases. Se pudo observar que la DHC generó un incremento en la concentración de ácido oleico y palmítico, pero disminuyó significativamente el porcentaje de linoléico, linolénico, EPA y DHA, comparado con el lote control (Ver tabla 6).

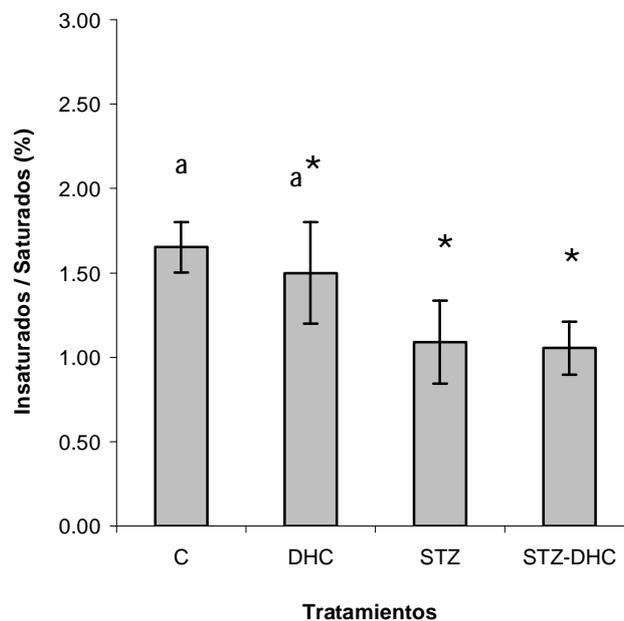
Tabla 6.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratados con una DHC.

Nombre de M.E.	Control	DHC	STZ	STZ- DHC
Laúrico	0.1% ± 0.1	0.0% ± 0.0	0.7% ± 1.7	0.0% ± 0.0
Mirístico	0.9% ± 0.2	0.9% ± 0.2	0.9% ± 0.3	1.5% ± 0.1
Miristoleico	0.1% ± 0.2	0.0% ± 0.0	0.2% ± 0.0	0.0% ± 0.0
Palmítico	27.7% ± 4.9	29.3% ± 5.4	27.9% ± 7.1	25.5% ± 1.4
palmitoleico	3.7% ± 0.8	4.6% ± 0.8	3.2% ± 1.8	3.2% ± 1.6
Esteárico	6.6% ± 2.0	5.1% ± 1.0	6.0% ± 2.6	3.7% ± 0.8
Oleico	20.8% ± 7.3	27.2% ± 3.7	21.8% ± 9	27.8% ± 11.1
Linoleico	20.1% ± 5.1	16.8% ± 2.2	12.8% ± 3.1	12.8% ± 7.8
g linoleico	0.4% ± 0.2	0.0% ± 0.0	0.1% ± 0.0	0.0% ± 0.0
Linolénico	1.1% ± 0.4	0.8% ± 0.2	0.8% ± 0.1	0.7% ± 0.3
CLA1	0.5% ± 0.1	0.3% ± 0.1	0.4% ± 0.1	0.0% ± 0.0
araquidato	0.2% ± 0.1	0.7% ± 0.3	0.8% ± 0.2	0.2% ± 0.1
eicosanoato	1.0% ± 0.3	1.7% ± 0.4	7.9% ± 0.5	22.5% ± 6.3
Araquidónico	6.2% ± 2.6	8.6% ± 1.9	5.4% ± 1.1	1.3% ± 0.6
EPA	0.3% ± 0.1	0.0% ± 0.0	0.2% ± 0.1	0.1% ± 0.0
Erucato	2.5% ± 1.9	0.1% ± 0.0	1.9% ± 0.5	2.2% ± 0.6
DHA	0.5% ± 0.1	0.0% ± 0.0	0.2% ± 0.1	0.0% ± 0.0
Compuestos de 20:3	3.1% ± 1.3	1.3% ± 0.4	4.4% ± 1.6	9.1% ± 2.4
A. Grasos no identificados	3.8% ± 2.4	2.5% ± 1.6	4.2% ± 1.3	1.1% ± 0.1

Los datos mostrados son la media aritmética ± d.s n= 5.

Efecto de la DHC, como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

El índice de fluidez membranal fue determinado mediante el cociente de ácidos grasos insaturados/ saturados. El grupo tratado con DHC no tuvo diferencias significativas con respecto al Control. Cabe mencionar que los lotes tratados con STZ y el STZ-DHC son estadísticamente iguales. Sin embargo, dichos lotes incrementaron significativamente el contenido de ácidos grasos saturados con respecto al grupo control (Gráfica 18).



Gráfica 18.- Índice de fluidez membranal en testículo de ratas con DM2 tratadas con DHC.

Porcentaje de ácidos grasos insaturados presentes en los distintos lotes de ratas tratadas: STZ, C, DHC y STZ-DHC. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. * $p < 0.05$ C vs STZ, STZ - DHC. * $p < 0.05$ STZ - DHC vs C, DHC.

Efecto de la DHC, como suplemento alimenticio, sobre el porcentaje de asociaciones celulares (VIII y IX) presentes en testículo de ratas *Wistar* con DM2.

Los grupos C (Ver Fig. 9B1) y DHC, no mostraron cambios significativos entre sí en la asociación VIII, sin embargo tienen diferencias significativas muy marcadas en la asociación IX (Fig. 13 A). Por otro lado, las ratas tratadas con STZ (Ver Fig. 9B3), las ratas con DHC y el grupo STZ-DHC mostraron un incremento significativo en la asociación IX (Fig. 13 A y 13 B). Finalmente los animales tratados con STZ mostraron diferencias significativas en ambas asociaciones (VIII y IX) con respecto al control.

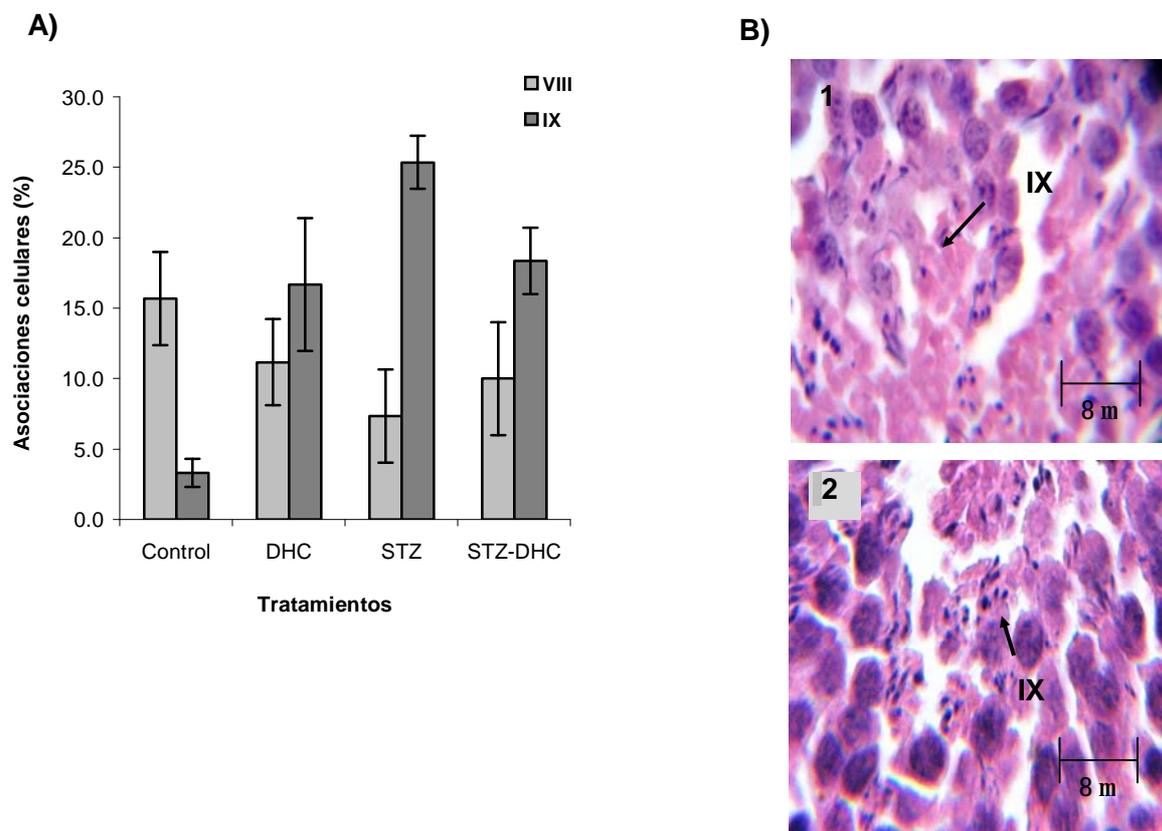


Figura 13.- Efecto de una DHC sobre las asociaciones celulares del testículo de rata *Wistar* con DM2.

A) Porcentaje de asociaciones celulares presentes en el testículo de ratas tratadas con DHC y STZ. La asociación IX pertenece a estadios tempranos y la asociación VIII a etapas maduras.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n= 5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 20 tubulos seminíferos.

B) Se realizaron cortes histológicos donde se presenta el estado de maduración de las espermatidas. La asociación **IX** corresponde a la generación más joven de los espermatidas formada por células redondeadas de núcleos esferoidales. Dicha etapa fue observada con mayor prevalectía en los siguientes lotes: 1); **DHC**, 2); **STZ – DHC**. - Tinción H-E 100X.

Efecto de una DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología del testículo.

Se valoraron los daños histopatológicos en testículos de ratas diabéticas, así como el efecto de una DHC. El grupo Control no fue alterado patológicamente (Ver Fig. 10 A). En cuanto a las ratas tratadas con DHC hubo una degeneración de túbulos seminíferos de difusa a severa (Fig. 14 A). Por otro lado, el testículo de ratas diabéticas (Ver Fig. 10 C) y del grupo STZ- DHC (Fig. 14 B) mostraron una posible acumulación de compuestos amiloides, además de una degradación de túbulos seminíferos con respecto al grupo control.

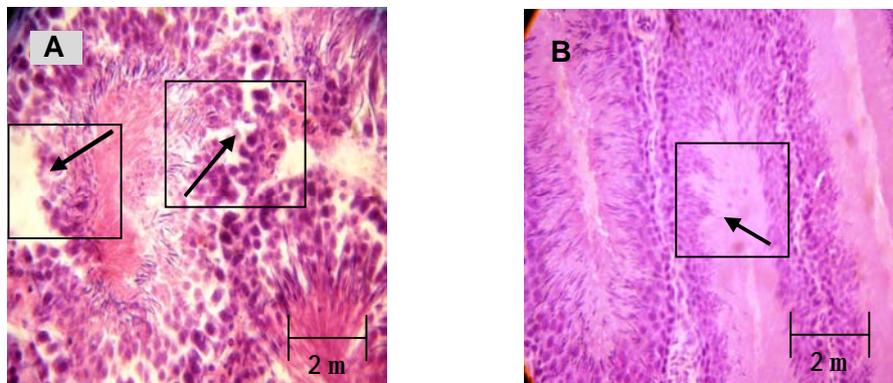
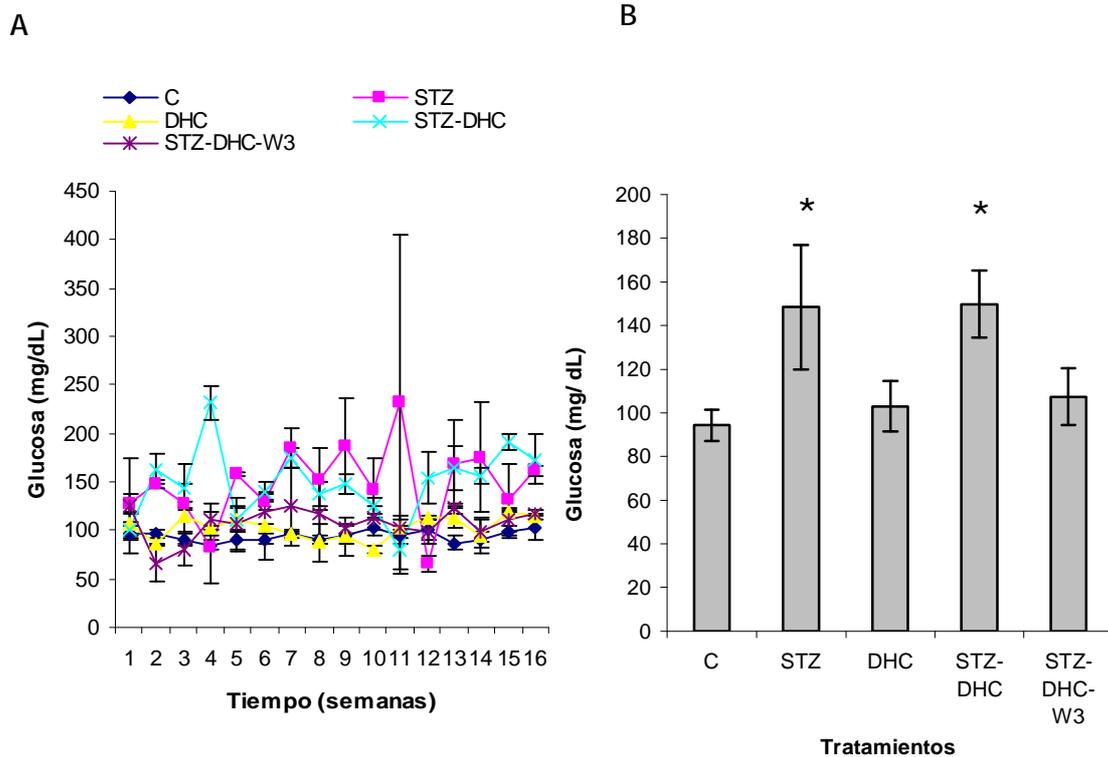


Figura 14 .- Histología de los testículos de ratas *Wistar* con DM2 tratadas con DHC.

Muestra las fotografías de un corte transversal de testículo de ratas *Wistar* con DM2 inducida y tratadas con: A); **DHC.-** degeneración de túbulos seminíferos difusa severa y B); **STZ- DHC.-** acumulación de compuestos amiloides y degradación de túbulos seminíferos. **Tinción H-E 40X.**

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Las mediciones de glucosa nos permiten observar que entre los grupos C, DHC y STZ- DHC- ω -3, no hubo diferencias significativas (Gráficas 19A y 19B). Cabe mencionar que los lotes de STZ y STZ- DHC son estadísticamente iguales. Sin embargo dichos grupos presentan un descontrol en la glicemia, incrementando significativamente al compararlos con los controles (C), (DHC) e incluso con el lote STZ – DHC- ω 3.



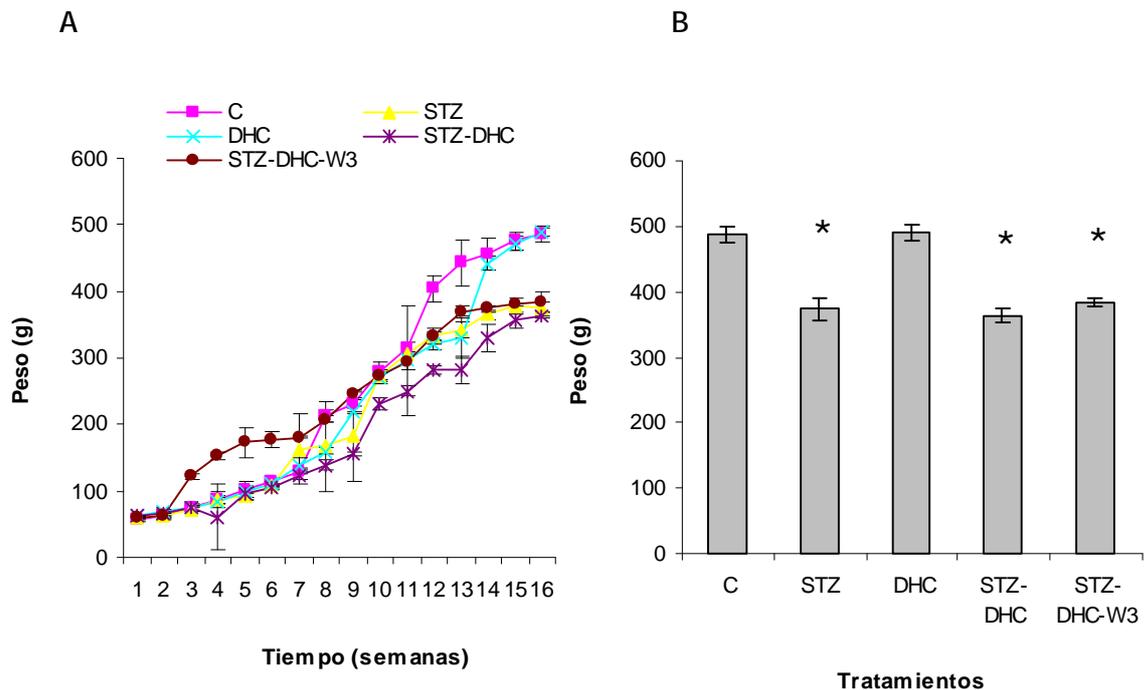
Gráfica 19.- Efecto del ω 3 y una DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre la concentración de glucosa plasmática.

Los valores mostrados en las gráficas representan: A) Comportamiento de los lotes tratados con: C, STZ, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3 sobre la glicemia durante 16 semanas de tratamiento. B) Concentración de glucosa de las ratas, al final del tratamiento.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p < 0.05 STZ vs C, DHC, STZ –DHC- ω 3. *p<0.05 STZ - DHC vs C, DHC, STZ–DHC- ω 3.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso corporal.

La determinación del peso de los animales se realizó una vez por semana. Los resultados indican que entre los grupos: C, DHC, no existió diferencia significativa alguna. Sin embargo, el lote de ratas diabéticas, el STZ- DHC y el lote administrado con STZ-DHC- ω 3 tuvieron un decremento significativo en el peso, comparado con los grupos ya mencionados (Gráficas 20A y 20B).



Gráfica 20.- Efecto del ω 3 y una DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre el peso corporal.

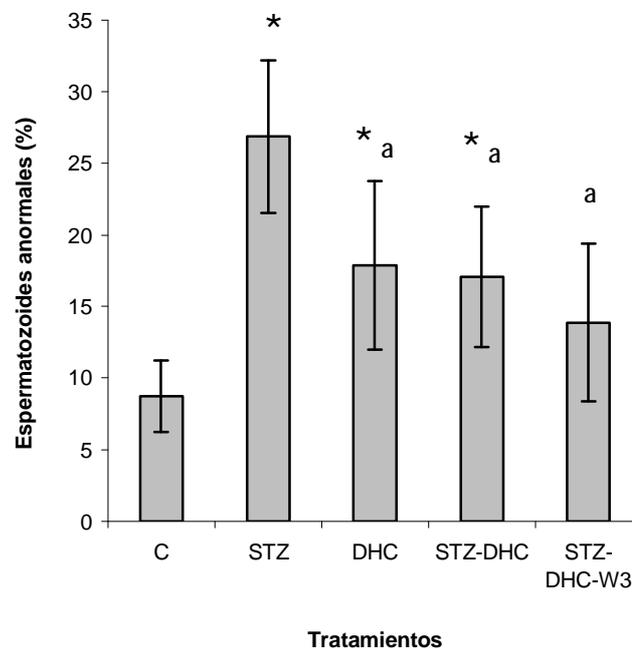
Las ratas fueron destetadas a la tercera semana de edad. A partir de este momento se les proporcionó una dieta hipercalórica que consistió en 13% grasa saturada en el alimento y 10% de sacarosa en el agua. Así mismo se les administró por canulación ácidos grasos omega 3 (ω 3) - (EPA 360 mg/Kg – DHA 240 mg/Kg). Posteriormente se determinó el peso del animal 1 vez por semana durante 4 meses.

Las gráficas muestran: **A)** Seguimiento del peso durante 16 semanas de tratamiento con diferentes dietas: C, STZ, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3. **B)** Efecto de las distintas dietas, sobre el peso corporal de las ratas al final del tratamiento. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n= 5.

* $p < 0.05$ STZ, STZ - DHC, STZ -DHC- ω 3 vs C, DHC.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Se pudo observar que los grupos con mayor número de espermatozoides incompletos, son aquellos tratados con STZ, DHC, STZ-DHC, así mismo dichos grupos no presentaron diferencias significativas entre sí, pero son estadísticamente diferentes al control. Es importante mencionar que el lote STZ-DHC- ω 3 disminuyó significativamente el porcentaje de espermatozoides anormales comparado con el grupo administrado únicamente con STZ (Gráfica 21).



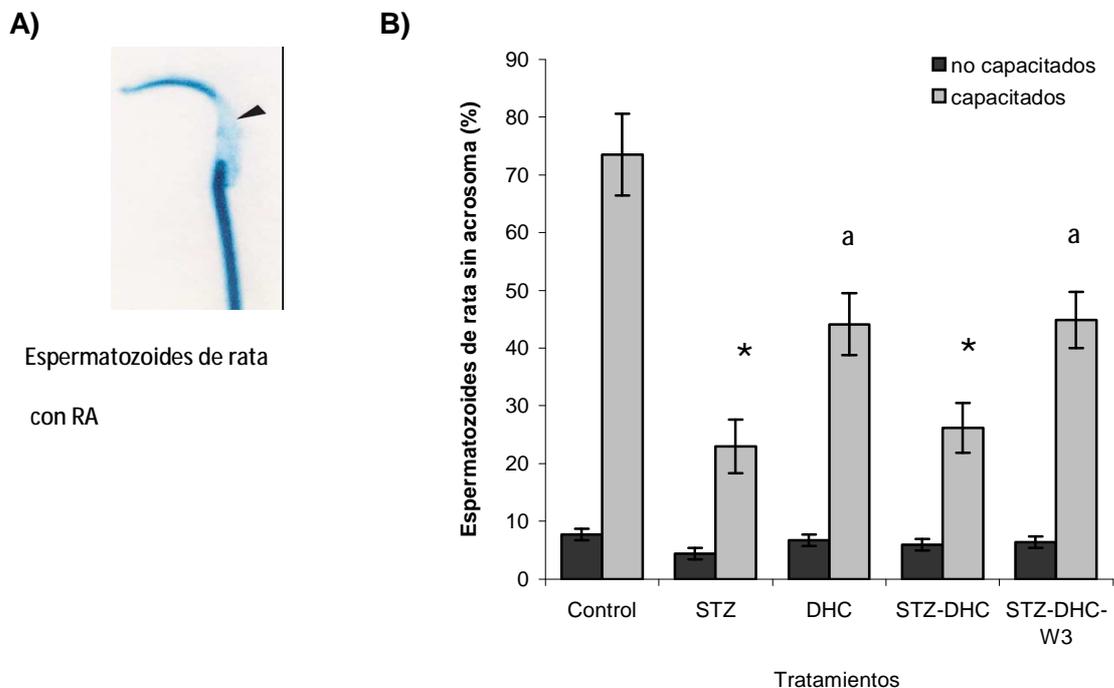
Gráfica 21.- Porcentaje de espermatozoides anormales de ratas con DM2 tratadas con ω 3 y DHC.

Los espermatozoides fueron extraídos de los conductos deferentes, las células se lavaron con NaCl 0.9% y fueron montados en portaobjetos para su conteo. En la gráfica se observa el porcentaje de espermatozoides anormales presentes en los lotes de ratas tratadas con las siguientes dietas: C, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n= 5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células. *p < 0.05 STZ vs STZ -DHC- ω 3. ^a p< 0.05 STZ -DHC- ω 3 vs STZ.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides que pierden el acrosoma.

Después de incubar a los espermatozoides en un medio capacitante durante 3 hrs. Las ratas tratadas con una DHC y el lote de ratas STZ- ω 3- DHC, fueron estadísticamente iguales, ya que ambos grupos mostraron menor RA comparado con el lote control. Así mismo se puede observar que en ratas tratadas con STZ y STZ-DHC, existió un mayor número de espermatozoides que no sufrieron el proceso de RA, mostrando de esa manera diferencias significativas con respecto al grupo control e incluso con el grupo al que sólo se le proporcionó una DHC. El lote de ratas diabéticas a las que se les administró una DHC y un suplemento alimenticio basado en ω 3, incrementó el número de gametos con RA (Gráfica 22).



Gráfica 22.- Efecto del ω 3 y una DHC en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides con RA.

Los espermatozoides extraídos del conducto deferente fueron lavados y capacitados en un medio suplementado con ac. pirúvico, láctico y glucosa, durante 3 hrs. Posteriormente las muestras fueron lavadas, montadas en portaobjetos y teñidas con azul de coomassie. La cuenta espermática se realizó por microscopía.

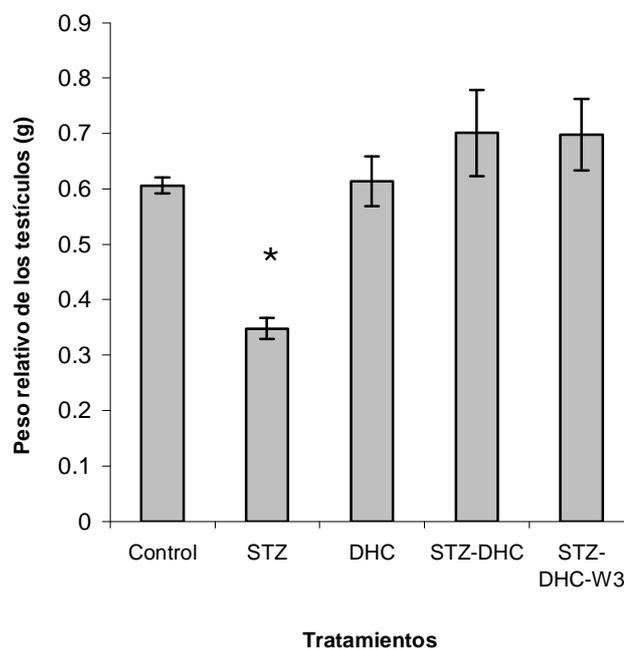
A) Patrón de tinción observado en los espermatozoides capacitados y con RA.

B) Espermatozoides que pierden el acrosoma por RA. Los datos mostrados son la media \pm d.s n= 5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células. *p < 0.05 STZ, STZ - DHC vs C, DHC, STZ -DHC- ω 3.

^a p < 0.05 DHC, STZ -DHC- ω 3 vs C, STZ, STZ - DHC .

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso relativo de los testículos.

Las gónadas de los animales tratados con C, DHC, STZ-DHC, STZ- DHC- ω -3, no mostraron diferencias significativas entre ellos, con relación al peso relativo de los testículos. Sin embargo, el peso de los testículos de las ratas tratadas con STZ fue disminuido significativamente (Gráfica 23).



Gráfica 23.- Peso relativo de los testículos de ratas *Wistar* con DM2 tratadas con ω 3 y DHC.

Comparación en el comportamiento del peso relativo de los testículos tratados con C, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p < 0.05 STZ vs C, DHC, STZ – DHC, STZ –DHC- ω 3.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre la composición de ácidos grasos en testículo.

Los grupos de ratas diabéticas a los que se les administró una DHC y un suplemento basado en ω 3 incrementaron la concentración de ácido linoléico, EPA y DHA, comparado con los demás grupos (Ver tabla 7).

Tabla 7.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas *Wistar* con DM2 tratadas con ω 3 y DHC.

Nombre de M.E.	Control	STZ	DHC	STZ- DHC	STZ- DHC- ω 3
Laúrico	0.1% \pm 0.1	0.7% \pm 1.7	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Mirístico	0.9% \pm 0.2	0.9% \pm 0.3	0.9% \pm 0.2	1.5% \pm 0.1	0.7% \pm 0.3
Miristoleico	0.1% \pm 0.2	0.2% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Palmitico	27.7% \pm 4.9	27.9% \pm 7.1	29.3% \pm 5.4	25.5% \pm 1.4	29.8% \pm 5.6
palmitoleico	3.7% \pm 0.8	3.2% \pm 1.8	4.6% \pm 0.8	3.2% \pm 1.6	3.8% \pm 1.8
Esteárico	6.6% \pm 2.0	6.0% \pm 2.6	5.1% \pm 1.0	3.7% \pm 0.8	5.8% \pm 2.0
Oleico	20.8% \pm 7.3	21.8% \pm 9	27.2% \pm 3.7	27.8% \pm 11.1	22.6% \pm 6.3
Linoleico	20.1% \pm 5	12.8% \pm 3	16.8% \pm 2	12.8% \pm 7.8	13.9% \pm 8.1
g linoleico	0.4% \pm 0.2	0.1% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Linoléico	1.1% \pm 0.4	0.8% \pm 0.1	0.8% \pm 0.2	0.7% \pm 0.3	0.9% \pm 0.4
CLA1	0.5% \pm 0.1	0.4% \pm 0.1	0.3% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
araquidato	0.2% \pm 0.1	0.8% \pm 0.2	0.7% \pm 0.3	0.2% \pm 0.1	0.3% \pm 0.0
eicosanoato	1.0% \pm 0.3	7.9% \pm 0.5	1.7% \pm 0.4	22.5% \pm 6.3	0.6% \pm 0.2
Araquidónico	6.2% \pm 2.6	5.4% \pm 1.1	8.6% \pm 1.9	1.3% \pm 0.6	9.3% \pm 5.1
EPA	0.3% \pm 0.1	0.2% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.1% \pm 0.0	15% \pm 0.4
Erucato	2.5% \pm 1.9	1.9% \pm 0.5	0.1% \pm 0.0	2.2% \pm 0.6	0.4% \pm 0.1
DHA	0.5% \pm 0.3	0.2% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	1.7% \pm 0.4
Compuestos de 20:3	3.1% \pm 1.3	4.4% \pm 1.6	1.3% \pm 0.4	9.1% \pm 2.4	1.4% \pm 0.7
A. Grasos no identificados	3.8% \pm 2.4	4.2% \pm 1.3	2.5% \pm 1.6	1.1% \pm 0.1	2.0% \pm 0.8

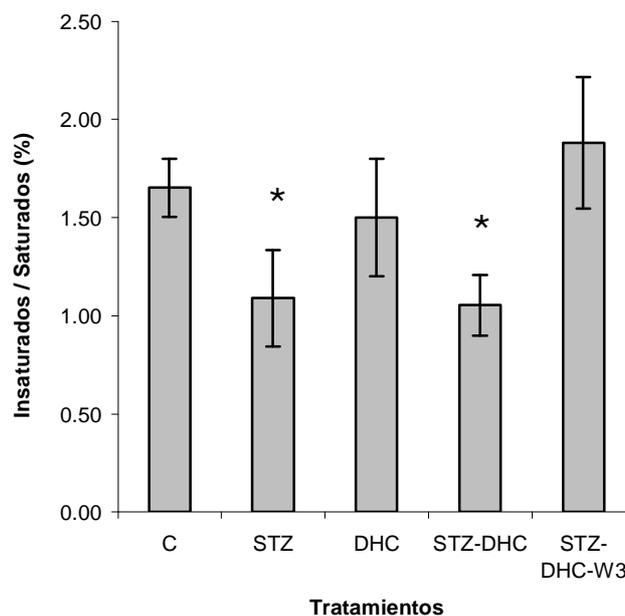
Los testículos fueron procesados para la extracción lipídica por el método de Folch y colaboradores (1957), para analizar la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.

La tabla muestra la composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratadas con diferentes dietas (C, STZ, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3)

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

Los lotes DHC y STZ-DHC- ω 3 no presentan cambios significativos con respecto al grupo control. Sin embargo los grupos STZ y STZ-DHC mostraron un decremento en la proporción de AGPI's. Las ratas administradas con STZ-DHC- ω -3, incrementaron significativamente el contenido de AGPI's, comparado con los lotes STZ-DHC y STZ (Gráfica 24).



Gráfica 24.- Índice de fluidez membranal obtenido en testículos de ratas con DM2 tratadas con ω 3 y DHC.

Índice de fluidez membranal mediante el cociente de insaturación, obtenida en testículo de ratas *Wistar* tratadas con las diversas dietas: C, STZ, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p < 0.05 STZ, STZ -DHC vs C, DHC, STZ -DHC- ω 3.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el tipo de asociaciones celulares en testículo.

Para valorar la presencia de anomalías en el desarrollo espermático se contaron las asociaciones celulares VIII y IX en testículo de ratas tratadas con diferentes dietas: C, STZ, DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- ω 3.

En los grupos control (Ver Fig. 9 B1), DHC y STZ- DHC (Ver Fig. 13 B1 y 13 B2), no se observó cambios significativos entre sí, dichos lotes presentan la asociación número VIII, con la misma frecuencia. (Fig. 15 A). Sin embargo los lotes: STZ, DHC, STZ-DHC y STZ-DHC- ω 3 incrementan la asociación IX de manera significativa, con respecto al grupo control (Fig. 15 A y 15 B).

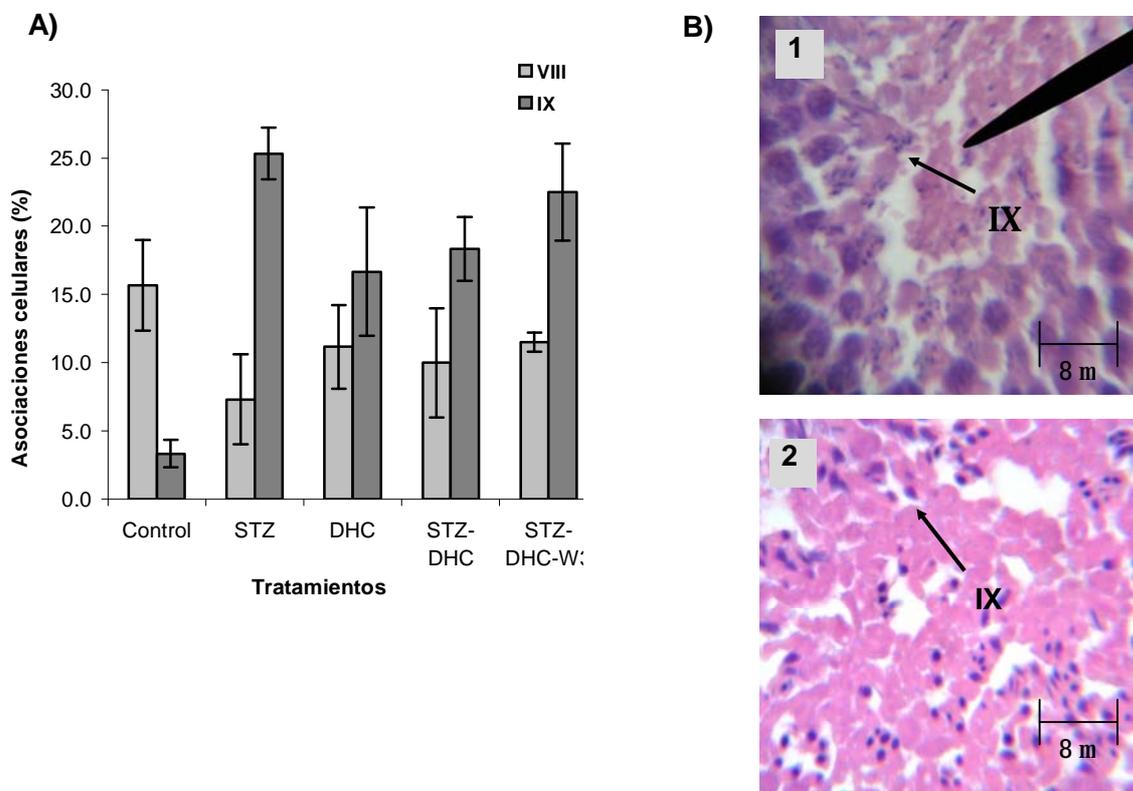


Figura 15.- Efecto del ω 3 y una DHC sobre el tipo de asociaciones celulares presentes en testículo de ratas *Wistar* con DM2.

A) Frecuencia de las asociaciones celulares en el túbulo seminífero de un corte histológico de testículo, en los diferentes lotes. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 20 túbulo seminíferos. **B)** Las imágenes muestran un fragmento de túbulo seminífero donde: 1); **STZ- DHC**, 2); **STZ - DHC- ω 3**, existe un incremento en la presencia de la asociación celular **IX** que corresponden a espermátidas inmaduras. **Tinción H-E 100X.**

Efecto de los ácidos grasos ω -3 y una DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología del testículo.

Para localizar los posibles daños en testículo se realizaron cortes histológicos. Nuestros resultados indican que el grupo Control no presentó cambios patológicos aparentes (Ver Fig. 10 A). Sin embargo este difiere con el lote tratado con una DHC por lo que se observa una degeneración de túbulos seminíferos de difusa a severa (Ver Fig. 14 A).

Por otro lado el lote STZ- DHC reveló una degradación de túbulos seminíferos con posible amiloidosis en las membranas basales (Fig. 16 A). Al administrar ácidos grasos ω 3 a un grupo con STZ- DHC, se encontró una degradación de túbulos seminíferos multifocal leve (Fig. 16 B).

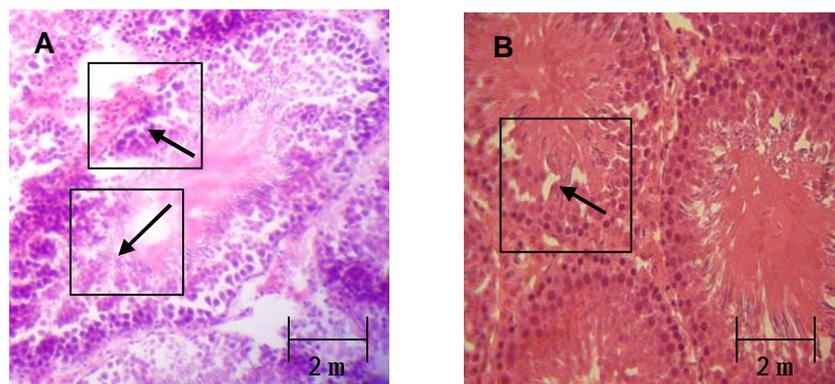


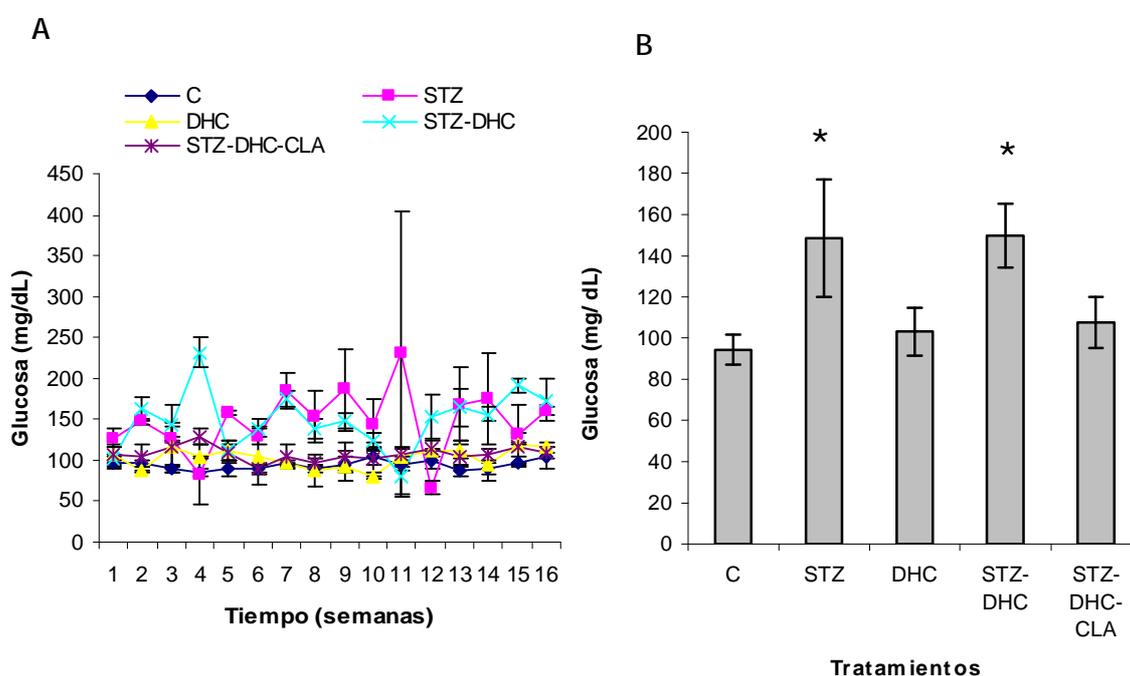
Figura 16.- Efecto del ω 3 y DHC en ratas con DM2 sobre la histología del testículo.

Se muestra los daños patológicos causados a testículos de rata *Wistar* con DM2 inducida. Así como el efecto de las distintas dietas: A); **STZ- DHC.-** degradación de túbulos seminíferos con posible amiloidosis en las membranas basales, B); **STZ- DHC- ω 3.-** degradación de túbulos seminíferos multifocal leve. **Tinción H-E 40X**
Degeneración de túbulos seminíferos: este tipo de alteración se refiere a procesos degenerativos y de necrosis observados, caracterizado por aumento del volumen celular con citoplasma grumoso y turbio

Efecto del CLA y una DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Los grupos: C, DHC, STZ-DHC-CLA no presentaron cambios significativos entre si. Sin embargo, los lotes STZ y STZ-DHC incrementaron significativamente y registraron valores de glucosa en sangre hasta de 150 mg/dl. Así como también mantuvieron niveles irregulares, comparado con los animales de los lotes C y DHC.

Al administrar CLA a un lote con STZ-DHC, la glicemia tiende a verse disminuida de manera significativa, hasta 100 mg/dl (Gráfico 25A y 25B).



Gráfica 25.- Efecto del CLA y DHC en ratas con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre.

La gráfica presenta el efecto que tuvo la adición de distintas dietas como: C, STZ, DHC, STZ - DHC, STZ- DHC- CLA en ratas *Wistar* macho sobre la concentración de glucosa en sangre.

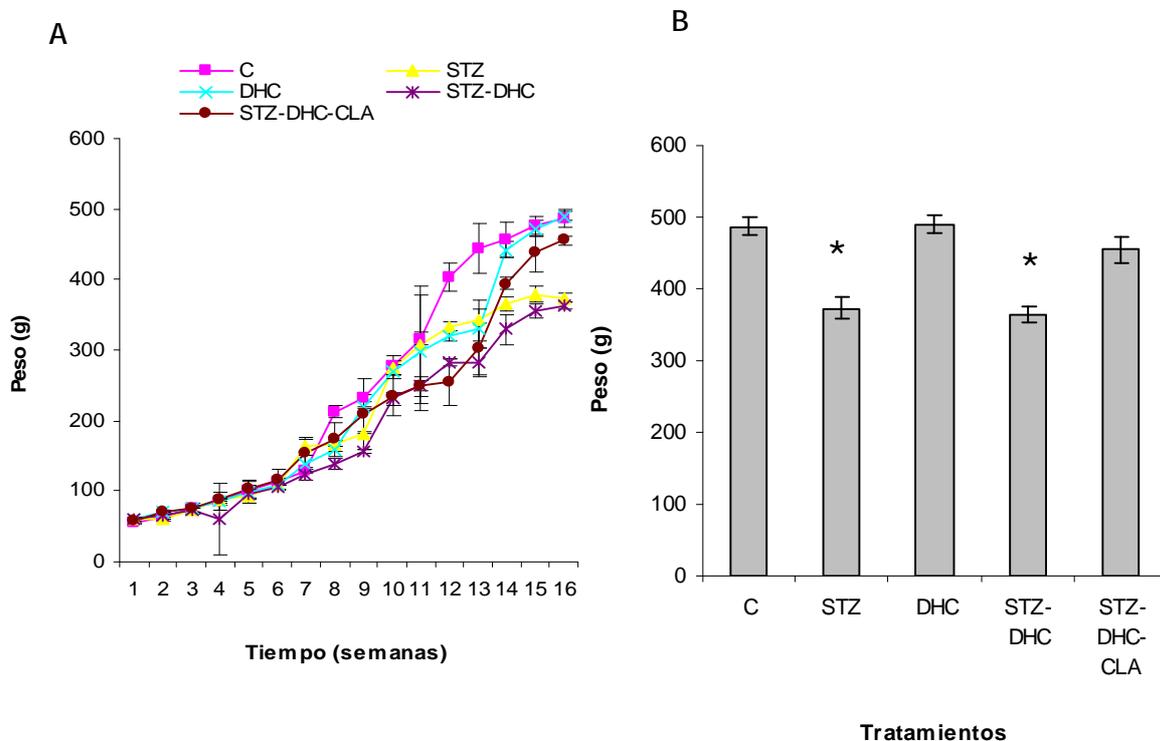
La gráfica A) muestra el seguimiento de los niveles de glicemia durante 16 semanas de tratamiento

B) Concentración de glucosa al final del tratamiento. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

*p < 0.05 STZ, STZ - DHC vs C, DHC, STZ -DHC- CLA.

Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) y una DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso corporal.

Los grupos C, DHC, STZ-DHC-CLA no mostraron diferencias significativas ya que todos ellos mantuvieron el mismo comportamiento (Gráfica 26 A y 26 B). Cabe mencionar que el lote de ratas al que se le administró una dosis de STZ y el tratado con STZ-DHC disminuyeron significativamente el peso corporal de los animales, comparado con sus respectivos controles (C y DHC).



Gráfica 26.- Efecto del CLA y DHC en ratas con DM2 sobre el peso corporal.

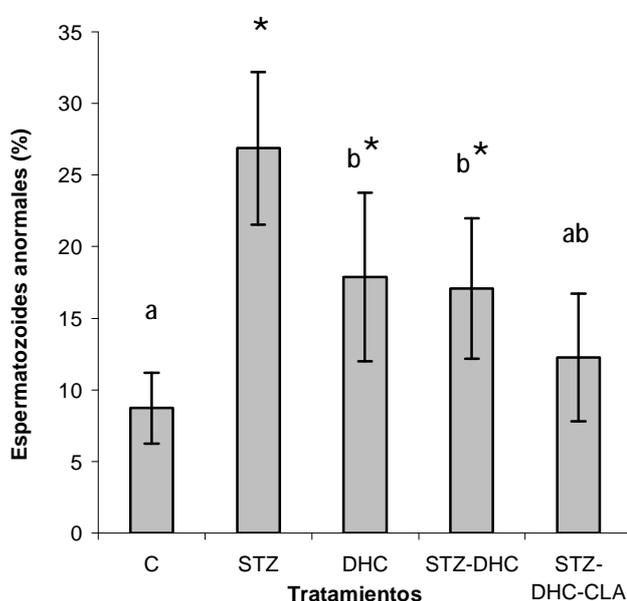
Peso de las ratas tratadas con DHC, STZ- DHC, STZ- DHC- CLA. **A)** Peso durante 16 semanas de tratamiento

B) Peso corporal de ratas al final del tratamiento. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

* $p < 0.05$ STZ, STZ – DHC vs C, DHC, STZ –DHC- CLA.

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

Se observó que los grupos STZ, DHC, STZ-DHC, estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre sí. Sin embargo, dichos lotes mostraron un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides anormales comparado con el respectivo control (Gráfica 27). Cabe mencionar que entre el grupo de ratas tratadas con STZ-DHC-CLA y el lote control no existió diferencia significativa. Sin embargo, en el grupo STZ-DHC-CLA se observó significativamente un menor porcentaje de espermatozoides anormales comparado con el lote STZ.



Gráfica 27.- Efecto del CLA y DHC en ratas *Wistar* con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides anormales.

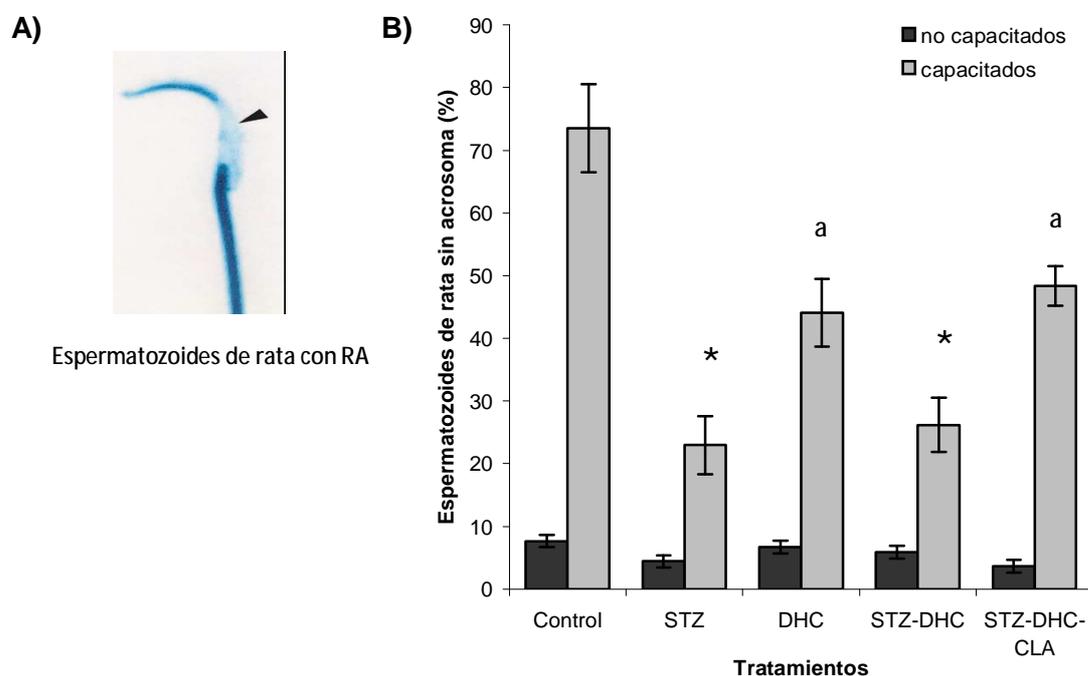
Los espermatozoides fueron obtenidos de conducto deferente, lavados mediante centrifugación/ resuspensión con NaCl 0.9% y montados en portaobjetos para su conteo.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

*p < 0.05 STZ, DHC, STZ - DHC vs C. ^b p < 0.05 DHC, STZ -DHC vs C.

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides que pierden el acrosoma.

El grupo tratado con DHC y el lote de ratas con STZ-CLA-DHC, no presentaron diferencias significativas entre si. Dichos lotes mostraron de manera significativa menor pérdida de acrosoma comparado con el lote control. Los grupos STZ y STZ-DHC, disminuyeron aún más el porcentaje de espermatozoides al compararlo con los demás grupos. Cabe mencionar que las ratas administradas con STZ-DHC-CLA incrementaron el porcentaje de gametos que sufrieron el proceso de RA, con respecto a los grupos STZ y STZ-DHC (Gráfica 28).



Gráfica 28.- Efecto del CLA y DHC sobre el porcentaje de espermatozoides que presentaron RA.

Las muestras capacitadas fueron lavadas, montadas y teñidas con azul de coomassie, para valorar y cuantificar a los espermatozoides que sufrieron RA.

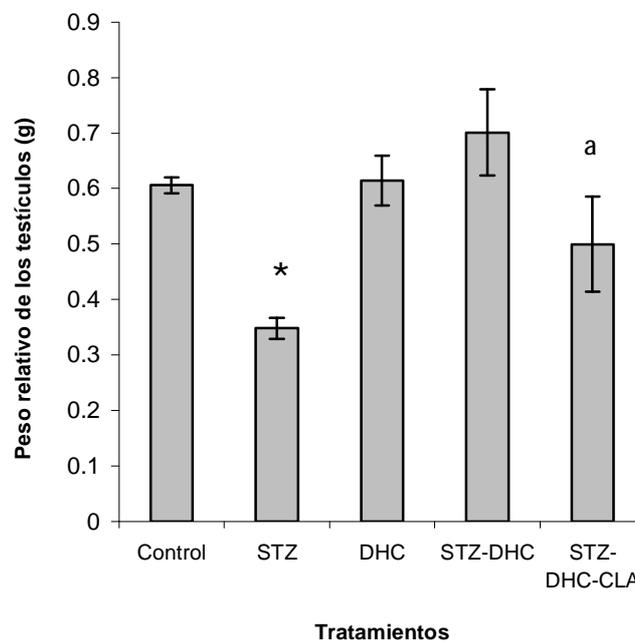
A) Patrón de tinción observada en los espermatozoides capacitados y con RA. B) Porcentaje de espermatozoides que pierden el acrosoma.

Los datos mostrados son la media \pm d.s n= 5. Para cada muestra, se contaron por triplicado 200 células.

*p < 0.05 STZ, STZ - DHC vs C, DHC, STZ -DHC- CLA. ^a p< 0.05 DHC, STZ -DHC- CLA vs C, STZ, STZ - DHC .

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el peso relativo de los testículos.

Los grupos: C, DHC, STZ- DHC, no presentaron diferencias significativas en cuanto al peso relativo de las gónadas, comparado con el lote STZ. Sin embargo, las ratas diabéticas a las que se les administró como suplemento alimenticio CLA y que además se les proporcionó una DHC, mostró una disminución significativa en el peso del testículo comparado con los lotes C, DHC y STZ-DHC. Pero fue estadísticamente mayor al grupo tratado sólo con STZ (Gráfica 29).



Gráfica 29.- Peso relativo de los testículos en ratas con DM2 tratadas con CLA y DHC.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p < 0.05 STZ vs C, DHC, STZ – DHC, STZ –DHC- CLA. ^a p< 0.05 STZ – DHC - CLA vs C, STZ, DHC, STZ - DHC .

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre la composición de ácidos grasos en testículo.

La DHC y la administración de STZ indujeron alteraciones en la composición de ácidos grasos en testículo. El grupo de ratas diabéticas a los que se les administró una DHC y un suplemento de CLA incrementaron la concentración de oleico y linoleico, comparándolo con el lote de STZ-DHC. Sin embargo, en el lote STZ-DHC-CLA se observó un decremento en la concentración de linoleico, EPA y DHA (Ver tabla 8).

Tabla 8.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratados con CLA y DHC.

Nombre de M.E.	Control	STZ	DHC	STZ- DHC	STZ- DHC- CLA
Laúrico	0.1% \pm 0.1	0.7% \pm 1.7	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Mirístico	0.9% \pm 0.2	0.9% \pm 0.3	0.9% \pm 0.2	1.5% \pm 0.1	0.8% \pm 0.3
Miristoleico	0.1% \pm 0.2	0.2% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Palmitico	27.7% \pm 4	27.9% \pm 7	29.3% \pm 5	25% \pm 1.4	27% \pm 5.6
palmitoleico	3.7% \pm 0.8	3.2% \pm 1.8	4.6% \pm 0.8	3.2% \pm 1.6	3.5% \pm 1.4
Esteárico	6.6% \pm 2.0	6.0% \pm 2.6	5.1% \pm 1.0	3.7% \pm 0.8	6.9% \pm 3.0
Oleico	20.8% \pm 7	21.8% \pm 9	27.2% \pm 3	27% \pm 11.1	31% \pm 0.5
Linoleico	20.1% \pm 5	12.8% \pm 3	16% \pm 2.2	12% \pm 7.8	17% \pm 2.1
g linoleico	0.4% \pm 0.2	0.1% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0
Linolénico	1.1% \pm 0.4	0.8% \pm 0.1	0.8% \pm 0.2	0.7% \pm 0.3	0.7% \pm 0.4
CLA1	0.5% \pm 0.1	0.4% \pm 0.1	0.3% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.6% \pm 0.1
araquidato	0.2% \pm 0.1	0.8% \pm 0.2	0.7% \pm 0.3	0.2% \pm 0.1	0.2% \pm 0.1
eicosanoato	1.0% \pm 0.3	7.9% \pm 0.5	1.7% \pm 0.4	22% \pm 6.3	0.5% \pm 0.2
Araquidónico	6.2% \pm 2.6	5.4% \pm 1.1	8.6% \pm 1.9	1.3% \pm 0.6	0.6% \pm 0.3
EPA	0.3% \pm 0.1	0.2% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.1% \pm 0.0	0.1% \pm 0.0
Erucato	2.5% \pm 1.9	1.9% \pm 0.5	0.1% \pm 0.0	2.2% \pm 0.6	0.0% \pm 0.0
DHA	0.5% \pm 0.2	0.2% \pm 0.1	0.0% \pm 0.0	0.0% \pm 0.0	0.1% \pm 0.1
Compuestos de 20:3	3.1% \pm 1.3	4.4% \pm 1.6	1.3% \pm 0.4	9.1% \pm 2.4	0.9% \pm 0.5
A. Grasos no identificados	3.8% \pm 2.4	4.2% \pm 1.3	2.5% \pm 1.6	1.1% \pm 0.1	3.6% \pm 1.8

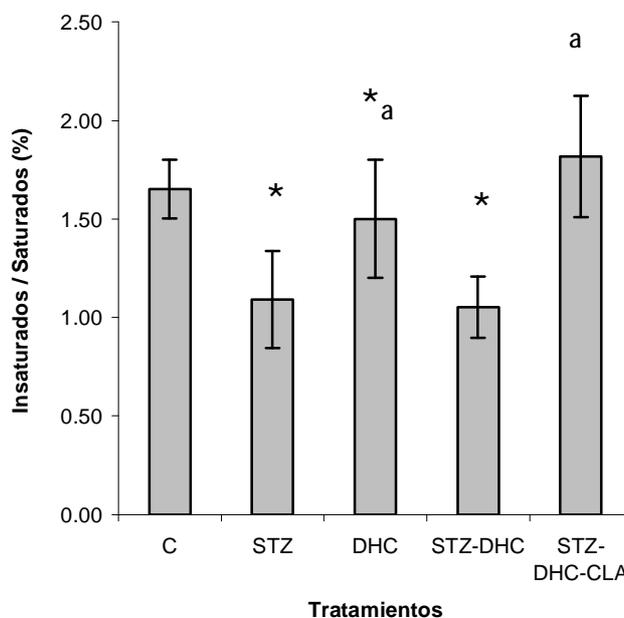
En la tabla se observa un incremento en la concentración de oleico y linolénico, en el grupo de ratas diabéticas tratadas con CLA y DHC. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5.

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

El índice de fluidez membranal se determinó mediante el cociente de insaturación (ác. Insaturados / saturados).

El grupo tratado con DHC disminuyó la concentración de ácidos grasos insaturados, aunque de manera no significativa comparado con el control.

Los lotes STZ y STZ- DHC incrementaron la proporción de ácidos grasos saturados y disminuyeron los AGPI's lo que podría afectar a la fluidez de las membranas en los testículos de las ratas. Es importante resaltar que el lote STZ-DHC-CLA, incrementó significativamente el contenido de AGPI's, comparado con los grupos STZ y STZ-DHC (Gráfica 30).



Gráfica 30.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados en testículo de ratas con DM2 tratadas con CLA y DHC.

El gráfico muestra el % de ácidos grasos insaturados obtenidos de los testículos de ratas *Wistar* tratadas con distintas dietas: C, STZ, DHC, STZ-DHC, STZ-DHC-CLA.

Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s n=5. *p < 0.05 STZ, STZ - DHC vs C, STZ -DHC- CLA.

^a p< 0.05 DHC, STZ -DHC- CLA vs STZ, STZ - DHC.

Efecto del CLA y una DHC como suplemento alimenticio, en ratas *Wistar* con DM2, sobre el tipo de asociaciones celulares en testículo.

Los datos revelaron que los grupos: DHC, STZ-DHC (Ver Fig. 13 B1 y 13 B2) y STZ-DHC-CLA son estadísticamente iguales, con respecto a la asociación número VIII y no presentan cambios significativos entre sí (Fig. 17 A y 17 B). Por otro lado, los lotes STZ, DHC y STZ – DHC incrementaron la presencia de espermátidas inmaduras (etapa IX), con respecto al grupo control (Ver Fig. 13 A y 13 B). Finalmente las asociaciones celulares IX y VIII tienden a aparecer con la misma frecuencia en el lote STZ-DHC-CLA, siendo así estadísticamente diferentes al lote tratado con STZ (Fig. 17 A y 17 B).

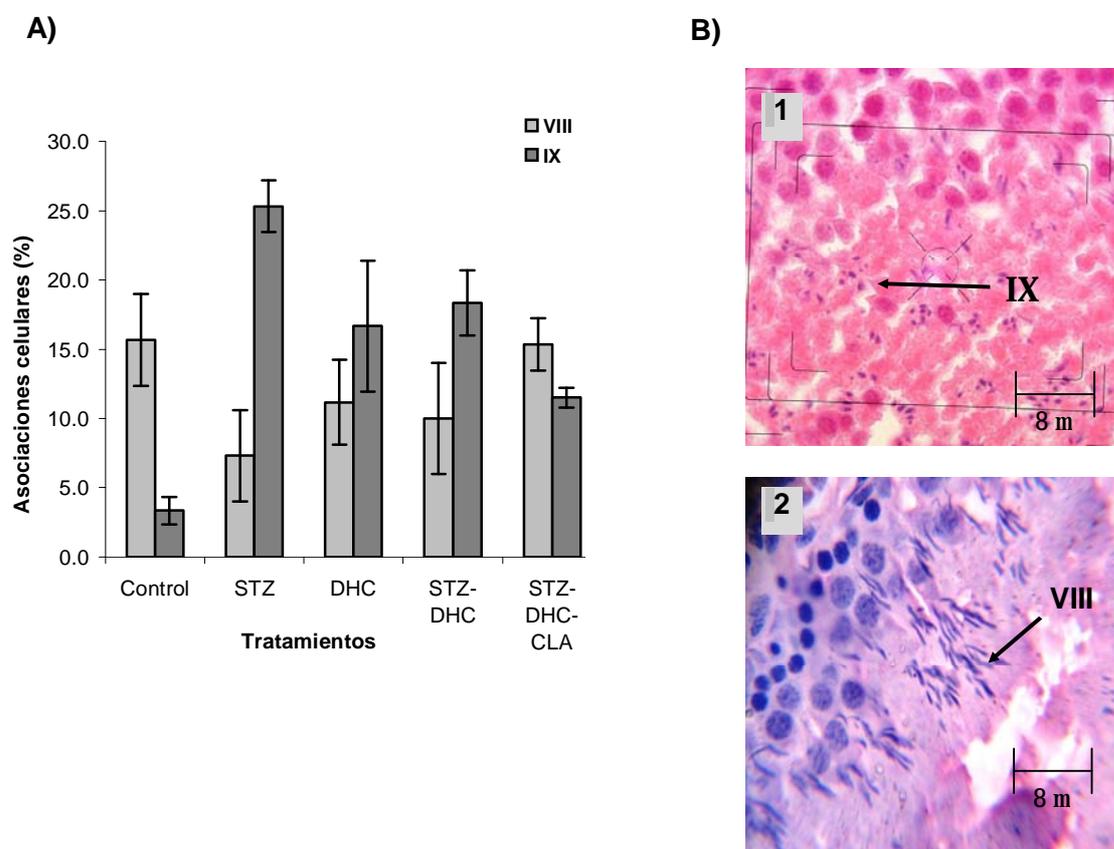


Figura 17.- Porcentaje de asociaciones celulares en testículos de ratas con DM2, tratadas con CLA y DHC.

A) La asociación IX representa etapas inmaduras dentro de la espermatogénesis y la asociación VIII a las etapas maduras. Los datos mostrados son la media aritmética de \pm d.s de 5 experimentos realizados para cada muestra, se contaron por triplicado 20 tubulos seminíferos.

B) Se observa el efecto del CLA y una DHC sobre las asociaciones celulares del testículo de rata *Wistar* con DM2. Las imágenes muestran una sección transversal de un túbulo seminífero donde: 1); **STZ- DHC**, muestran una mayor presencia de la asociación celular **IX**. 2); Al administrar **CLA** al grupo de ratas tratadas con **STZ – DHC** incrementa la presencia de la etapa **VIII**. – **Tinción H-E 100X**.

Efecto del CLA y una DHC, como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* con DM2, sobre la histología del testículo.

Se observaron alteraciones degenerativas en el testículo de las ratas tratadas, valorando el tamaño y número de células que conforman las diversas capas del túbulo seminífero. Del mismo modo se ve afectada la cantidad y morfología de las espermátidas. Los resultados indicaron que el grupo Control no presentó cambios patológicos aparentes (Ver Fig. 10 A). El lote tratado con una DHC presentó una degeneración de túbulos seminíferos difusa severa (Ver Fig. 13 A). Sin embargo, las ratas tratadas con STZ- DHC muestran claramente una acumulación de compuestos amiloides en membranas basales, así como la degradación de túbulos seminíferos (Fig. 18 A). Al administrar CLA a un grupo con STZ- DHC, se generó una degradación de túbulos seminíferos, difusa leve moderada con posible amiloidosis intersticial (Fig. 18 B).

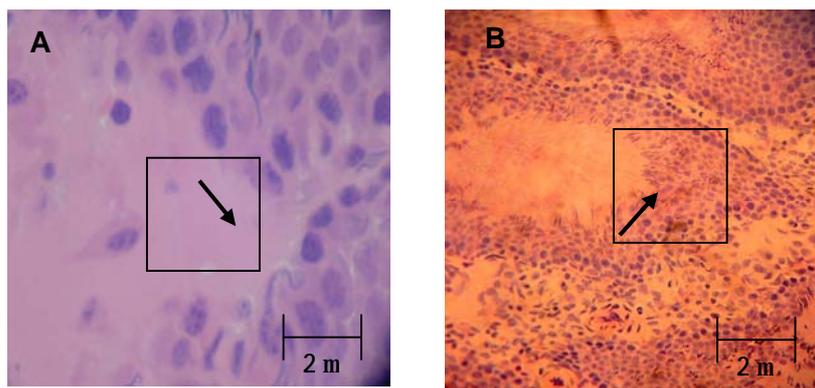


Figura 18 .- Corte transversal de testículo de ratas *Wistar* con DM2 tratadas con CLA y DHC.

Se muestra los daños patológicos causados a los testículos de las ratas tratadas con las distintas dietas: A); STZ- DHC, B); STZ- DHC- CLA. Tinción H- E 40X.

V.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

V.1.- Glucosa

La diabetes mellitus es un padecimiento severo, crónico y progresivo en el que los niveles de glucosa en sangre llegan a ser irregulares, principalmente elevados. Esto en conjunto puede alterar el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas (Pfreundts Ch. y Scholmerich, 2002).

Para estudiar la DM se han propuesto distintos modelos, uno de ellos es la inducción con fármacos. La estreptozotocina (STZ) ha sido reportada como una de las drogas más eficientes para la inducción de la diabetes en diferentes modelos experimentales. Su eficacia está relacionada con el modelo animal utilizado y con la dosis empleada para lograr establecer un efecto diabetogénico (Szkudelski, 2001).

Se ha probado la administración de diversas dosis de STZ en ratas neonatas, en rangos de 50 – 100 mg/Kg de peso lo cual provoca una necrosis de células β , niveles irregulares de glucosa en sangre y generalmente hiperglicemia (Islas y col., 2000). Sin embargo, cabe mencionar que la dosis de STZ es dependiente de la cepa y la edad de las ratas utilizadas (Orozco 2008).

En el presente trabajo se generó un modelo de Diabetes Mellitus tipo 2 en ratas *Wistar* macho neonatas de 48 hrs. de nacidas. Este modelo fue obtenido por medio de una inyección intraperitoneal de 100 mg/Kg de STZ, con la finalidad de valorar el efecto de los ácidos grasos omega 3 (ω 3) y linoleico conjugado (CLA), como suplemento alimenticio en ratas *Wistar* macho diabéticas sobre la histología de testículos y la reacción acrosomal de los espermatozoides.

Nuestros datos mostraron que el lote de ratas a las que se les administró STZ en una dosis única, elevaron la concentración de glucosa a los dos días después de la inducción, llegando hasta 200 mg/dl, consecuencia de una hipoinsulinemia secundaria. Posteriormente disminuye la hiperglucemia y se mantienen concentraciones irregulares y elevadas de glucosa durante los 4 meses (descontrol de la glicemia, un indicativo de DM2). En promedio se observó un aumento significativo en la concentración de glucosa en el grupo de las ratas diabéticas, comparado con el lote control (Gráfica 1A y 1B).

Dichos cambios en la concentración de glucosa pueden ser consecuencia de una destrucción selectiva y parcial de células β de los islotes de Langerhans del páncreas, lo que ocasiona su mal funcionamiento y poca o nula secreción de insulina.

Este proceso puede ser provocado por el efecto citotóxico que provoca la STZ cuando ingresa a las células β mediante el transportador de glucosa 2 (GLUT 2) (Pickup y Goseth, 1997).

Se conoce que la STZ tiene mayor especificidad por las células β , donde forma Óxido Nítrico y especies reactivas de oxígeno los cuales son responsables de la fragmentación del DNA (Szkudelski, 2001). Los neonatos son capaces de regenerar parcialmente algunas de las células dañadas debido a que a esa edad aún existen células indiferenciadas dentro del páncreas. Sin embargo, la secreción de insulina no es suficiente para abastecer ó disminuir la glucosa en sangre a concentraciones normales (Areas y col., 2003).

V.2.- Ácidos grasos

Por otro lado, al administrar ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en ratas diabéticas, la concentración de glucosa disminuyen desde 150 mg/dl hasta 100 mg/dl, siendo estadísticamente iguales al control (normoglicemia), esto quiere decir que dichos ácidos grasos pueden ayudar a disminuir y conservar el control glicémico en las ratas diabéticas (gráfica 1A y 1B).

Sabemos que algunas propiedades físico-químicas de las membranas están determinadas por la naturaleza de los ácidos grasos que la componen. Se ha reportado que los ácidos grasos poliinsaturados como el ω -3 y el CLA pueden tener efectos benéficos sobre el control de la diabetes. Estos ácidos grasos poseen dobles enlaces que al ser incorporados a las membranas de las células, disminuyen los ácidos grasos saturados e influyen en la fluidez membranal, por ende podríamos suponer que ayudan a mejorar la sensibilidad a la insulina a través de mejorar la sensibilidad de las proteínas membranales (Pérez y Guerrero, 2006).

La resistencia a la insulina es característica de la DM2. La insulina es requerida para la captación de la glucosa, al unirse con su receptor, favorece el transporte de la glucosa al interior de la célula para la obtención de energía (Anders, 2000). Tanto el ácido eicosapentanoico (EPA) como el docosahexanoico (DHA) son ácidos grasos esenciales, que pertenecen a la serie ω -3. Actúan sobre los lípidos plasmáticos reduciendo el nivel de los triglicéridos como resultado, descenso del colesterol. El aumento de la β – oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas del hígado también contribuye al descenso de los triglicéridos, reduciendo la cantidad de ácidos grasos libres y facilitando la sensibilidad a la insulina (Pérez y Guerrero 2006). Además, los ácidos grasos ω 3 también son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas de la serie 3, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos de la serie 5), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la

coagulación de la sangre, respuestas inflamatorias, reducción de triglicéridos y efectos vasodilatadores diferentes de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico ($\omega 6$) como consecuencia, puede haber una menor presión sanguínea permitiendo así una mayor interacción entre la glucosa y sus receptores (Poitout y Robertson, 2007).

Otro de nuestros resultados (Gráficas 7A y 7B) indica que al administrar CLA como suplemento alimenticio a ratas diabéticas no existieron diferencias significativas con respecto al lote tratado con STZ, pero si demuestra una tendencia a disminuir los niveles de glucosa, aunque no con la misma eficacia que los ácidos grasos $\omega 3$.

Se ha propuesto que los ácidos grasos poliinsaturados funcionan como ligandos de los PPARs – γ el cual promueve la transcripción de genes relacionados con la sensibilidad a la insulina y la reducción de triglicéridos en plasma. Esta regulación requiere de diferentes receptores nucleares, que interactúan con el DNA por medio de ligandos específicos. Los ácidos grasos poliinsaturados, al actuar como ligandos de los receptores nucleares denominados PPARs (receptores activadores de proliferación peroxisomal), desencadenan una gran variedad de respuestas celulares; inducen la diferenciación de adipocitos, modifican la resistencia a la insulina, regulan la presión vascular, etc. Dichos receptores tienen un papel clave en la regulación de las vías metabólicas involucradas en la manutención del balance energético y oxidación de grasas (Rodríguez-Cruz y col., 2005).

Existen varias subfamilias de PPARs, entre los que se encuentran α , β y γ . Estos receptores se expresan en distintos tejidos de mamíferos. Los PPARs α están involucrados en la expresión de genes involucrados con la sensibilidad a la insulina y se encuentran en hepatocitos, los PPARs β se localizan en los islotes de Langerhans del páncreas y regulan la expresión de genes implicados con la secreción de insulina (Laybutt y col., 2002).

Las ratas a las que se les administró sólo una dieta hipercalórica (DHC) no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control, ya que sus concentraciones de glucosa oscilan alrededor de los 100 mg/dl. Sin embargo, en aquellas ratas pertenecientes al lote tratado con STZ y que además se les administró una DHC incrementaron los niveles de glucosa, de manera significativa con respecto al grupo control (Gráfica 13A y 13B).

Investigaciones anteriores han demostrado que la mayor parte de las grasas alimentarias se suministran en forma de triacilglicéridos. Los ácidos grasos libres (AGL) son absorbidos por los enterocitos de la pared intestinal y transportados en la sangre como complejos de albúmina o como lípidos esterificados en las lipoproteínas, el cual consiste en un núcleo de triacilglicéridos y ésteres de ácidos grasos de colesterol (Díaz, 2008).

La cantidad almacenada de polisacáridos hace que la glucosa ingerida en exceso se convierte por la glicólisis en piruvato y después en acetil CoA, a partir de la cual se sintetizan los ácidos grasos. Esto nos indica que las grasas y los glúcidos pueden potencialmente originar la formación de triglicéridos, promoviendo así la resistencia a la insulina e inhibiendo el transporte o fosforilación de la glucosa.

También las grasas saturadas pueden disminuir la flexibilidad de las membranas celulares, trayendo como consecuencia una hiperglucemia y una glucotoxicidad (Zhang, 2005).

El fenómeno de glucotoxicidad puede ser explicado de la siguiente manera: la glucosa se une a los grupos amino terminales de las proteínas, llevándonos a un proceso de glicación y por ende alterando la estructura y la función celular de éstas. Se ha propuesto que las glicaciones pueden producir resistencia a la insulina (Durruty y García de los Rios, 2001), así como una disminución de la síntesis y actividad del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) en el músculo (Cruz y col., 2001).

V.2.1.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2.

Todas las células de los mamíferos requieren de ácidos grasos poliinsaturados para la estructura de las membranas celulares y para su buen funcionamiento. Estos ácidos grasos son transformados en mediadores hormonales llamados eicosanoides, que regulan todos los estadios de la inflamación (iniciación, prolongación y finalización). Así mismo, un desequilibrio en la proporción de estos puede provocar daños a nivel metabólico (Holman y col., 1983).

Los datos obtenidos en este trabajo nos han mostrado que uno de los trastornos a nivel reproductivo provocado por la DM2 es una modificación en la composición de ácidos grasos en los testículos de ratas diabéticas. Es decir, la DM2 provocó un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados, mientras que los lotes de ratas tratadas con STZ y que además se les adicionó ω -3 (Gráfica 6) o CLA (Gráfica 12) como un suplemento alimenticio durante 4 meses, mostraron un incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, como el Eicosapentaenóico (EPA) y Docosahexaenóico (DHA) y disminuyeron el esteárico (Tabla 5), esto probablemente incrementó el grado de fluidez membranal ya que los ácidos grasos poliinsaturados son incorporados a los fosfolípidos de las membranas permitiendo así, el movimiento de proteínas de superficie (Hurtado y Gómez, 1998).

En general el suplemento de ácidos grasos ω -3 o CLA a ratas diabéticas restituyó los niveles de ácidos grasos insaturados en testículo y disminuyó la fragilidad en los espermatozoides completos (Gráfica 3). Además, aumentó el porcentaje de espermatozoides que pierden al acrosoma por RA, al ser capacitados in vitro durante tres horas (Gráfica 4).

Estudios previos han observado que los ácidos grasos esenciales (EFA), pueden tener una importante función en el mantenimiento normal de los testículos, esto al verse afecta la producción de células de Leydig y Sertoli y con ello una disminución en la producción de hormonas (Walker y Cheng, 2005).

En este estudio los ácidos grasos fueron extraídos del testículo entero, por lo que los datos mostrados son de la composición de una mezcla de los diferentes tipos celulares localizadas en esta gónada.

V.2.2.- Espermatozoides anormales

Las ratas tratadas con STZ mostrarán un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides anormales con respecto a los grupos controles (Ver gráfica 3).

Estudios previos muestran que en individuos diabéticos existe un incremento en la producción de espermatozoides anormales así como un hipogonadismo el cual se caracteriza por la disminución o la falta total de la función testicular, debido a una falla gonadal primaria o secundaria provocada por deficiencia de las hormonas FSH, LH y testosterona principalmente (Contreras, 2002). Un hipogonadismo masculino parcial se asocia frecuentemente a cuadros de insulino-resistencia, particularmente en diabéticos tipo 2 y obesos abdominales. La caída de la testosterona puede ser mediada por el aumento de los ácidos grasos saturados (Levalle, 1998).

El lote de ratas STZ- ω 3 (Gráfica 3) y STZ-CLA (Gráfica 9) aumentaron estadísticamente el número de espermatozoides completos, comparándolo con el grupo de ratas tratadas con STZ. Los AGPI's de cadena larga, además de ser una fuente energética, son importantes para mantener y regular la flexibilidad membranal (Caballero, 2006). Esto puede explicar el por qué las células espermáticas fueron más resistentes a los movimientos mecánicos. Por otro lado, se pudo observar que el lote tratado con una DHC tiende a disminuir aún más el porcentaje de espermatozoides anormales comparado con el grupo STZ. Sin embargo, ambos lotes no mostraron diferencias significativas entre si, pero si cuando fueron comparados con el control. La DHC por si misma está generando un incremento en la

proporción de ácidos grasos saturados y podría estar influyendo para que exista una rigidez en la membrana de las células lo que impide su buen funcionamiento, de esta manera podría ocasionar que las células sean más frágiles al movimiento mecánico, dando como resultado espermatozoides sin flagelo (descabezados).

V.2.3.- Espermatozoides con RA

La capacitación y la RA son procesos consecutivos, que preparan al espermatozoide para adquirir la habilidad fertilizante. Se conoce como capacitación al conjunto de cambios que le ocurren al espermatozoide durante su viaje por el tracto genital de la hembra y que determinan que pueda llevar a cabo la RA.

En este trabajo se valoró el efecto de la adición de los ácidos grasos ω 3 o CLA, en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides que sufrieron RA después de haber sido capacitados durante 3 Hrs., en un medio mínimo suplementado con láctico, glucosa y pirúvico.

El grupo Control (C) y el lote con ácidos grasos ω -3, no presentaron cambios significativos entre sí, ambos grupos perdieron el acrosoma hasta en un 70% o tinción característica de RA con azul de coomasie. Sin embargo, el lote tratado con STZ mostró una disminución significativa con respecto a los grupos controles (Gráfica 4). Diversos autores han sugerido que la DM2 puede ocasionar trastornos al sistema reproductor masculino, así como alteraciones en la motilidad y cantidad espermática. Esto ha sido atribuido al incremento anormal de las especies reactivas de oxígeno, la cual provoca alteraciones en los componentes celulares, que dañan la función. Sin embargo, esto puede determinar la producción de diferentes respuestas que dependen del tipo y la cantidad de radicales libres implicados, en la composición bioquímica de las membranas celulares (Gallardo y col., 2003).

Cabe mencionar que el lote de ratas STZ- ω 3 (Gráfica 4) y el grupo STZ-CLA (Gráfica 10) tuvieron un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides con RA, comparado con el grupo de ratas tratadas sólo con STZ. Sin embargo se sabe que algunos cambios referentes a la capacitación son modificaciones de la MP, en su permeabilidad, en la fluidez y en un rearrreglo o alteración de proteínas de la superficie espermática. También hay un aumento en la movilidad de los espermatozoides y un mayor flujo de iones calcio y HCO_3 (Baldí y col., 2000). Se sabe que los AGPI's de cadena larga son indispensables para una adecuada función de las membranas biológicas, lo que determina la fluidez y la actividad de algunas enzimas asociadas a la membrana que regulan los niveles de

colesterol. Se ha sugerido que durante la capacitación espermática, se produce una modificación de los lípidos y de los microdominios en la membrana.

Como es sabido, la relación entre colesterol y fosfolípidos permite que la MP tenga la fluidez apropiada para su actividad; entre las que se encuentra el pasaje selectivo de sustancias entre medio extracelular e intracelular (Brian y col., 1980).

Por otro lado al administrar una DHC a ratas con STZ, decrece significativamente el porcentaje de espermatozoides que sufrieron RA (Gráfica 16). Esto demuestra una vez más que el comportamiento que tienen los ácidos grasos saturados en la membrana, le proporcionan una rigidez que no permite la entrada de iones involucrados en el proceso de RA. Se ha propuesto que los AGPI's también se acumulan en tejidos animales de forma proporcional a la cantidad ingerida. El porcentaje de espermatozoides con RA concuerda con el mantenimiento del índice de insaturación de las membranas. La fluidez de las membranas y la pérdida del acrosoma se vio beneficiada por la incorporación celular de los AGPI's. Sin embargo, la ausencia de estos ácidos grasos no produjo cambio alguno en el acrosoma de los gametos masculinos de las ratas con DM2 inducida.

V.2.4.- Efecto de los AGPI's sobre el peso relativo de los testículos

La DM ha incrementado en los últimos años y con ello distintos trastornos, entre los que destacan algunas alteraciones dentro de la reproducción (Zarate y col., 1989). De acuerdo a la OMS esta enfermedad es una de las principales causas de disfunción sexual (Maatman y col., 1987). Por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue valorar posibles daños ocasionados en la morfología gonadal de ratas con DM2.

Los resultados mostraron que la diabetes inducida con STZ generó efectos adversos en la morfología de los gametos masculinos, así como de manera significativa una disminución en el peso de los testículos, con respecto al control (Gráfica 5).

Se ha reportado que la DM en ratas es la causante de alteraciones en el eje Hipotálamo-Hipófisis- Gónada, relacionándose así la pérdida del peso gonadal (Baccetti y col., 2002).

Hassan (1993) atribuye el decremento de hormonas como la FSH, LH, prolactina y testosterona al daño ocasionado al eje Hipotálamo- Hipófisis- Gónada.

También la disminución del peso de los órganos sexuales se puede deber a las alteraciones en los tejidos blancos para responder a la testosterona, debido a la DM (Rodríguez y Vivas 2003).

Por otro lado pudimos observar que las ratas diabéticas a las que se les administró una dieta suplementada con ácidos grasos ω 3 diariamente durante 4 meses, elevaron significativamente el peso de los testículos con respecto al lote STZ (Gráfica 5). Sin embargo el lote STZ-CLA mostró una disminución en el peso relativo de gónadas al

compararlo con el control. El grupo STZ es estadísticamente menor que el administrado con STZ-CLA. Dicho comportamiento se puede deber a que al administrar ácidos grasos poliinsaturados como el ω_3 y el CLA a ratas con DM2, mejora la fluidez membranal de las células. Esto es, sabemos que al existir una rigidez en las membranas celulares, se ven afectados los receptores y transportadores celulares, lo cual nos lleva a una disminución de las hormonas FSH y LH, alterando la diferenciación espermática y detenciones en las divisiones mitóticas y meióticas. La FSH induce una proliferación de las células de Sertoli y estimula a estas para sintetizar proteínas captadoras de andrógenos que convierten la testosterona en dihidrotestosterona y estrógenos. Por otro lado la LH produce una diferenciación rápida de las células de Leydig las cuales producen andrógenos como testosterona (Garner y Afees, 1993).

Nuestros resultados indican que, las ratas pertenecientes a los grupos STZ-DHC, STZ-DHC- ω_3 , STZ-DHC-CLA, tuvieron una tendencia a incrementar el peso, volumen y aspecto de los testículos, sin presentar cambios significativos con respecto al control, pero si al lote STZ (Gráficas 17, 23 y 29).

V.2.5.- Efecto de los ácidos grasos sobre el tipo de asociaciones celulares en testículo.

Investigaciones previas han demostrado la biosíntesis de DHA en el epitelio de los túbulos seminíferos, especialmente en espermátidas redondas y en mayor cantidad en espermatozoides maduros (Alvarez y Ollero 2000). Esto sugiere que el DHA puede ser de gran importancia dentro de las MP de las espermátidas, lo cual mejora la espermatogénesis y ayuda a la maduración del espermatozoide. La espermatogénesis en ratas muestra diferentes etapas de desarrollo celular. Dichas etapas son conocidas como asociaciones celulares. Probablemente la deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados y el incremento en la proporción de ácidos grasos saturados en las membranas celulares de testículo de ratas tratadas con STZ, provocó una disminución en el porcentaje de espermátidas maduras (etapa VIII) y un incremento significativo hasta en un 25% del número de espermátidas en la etapa IX (Fig.9 B3). Sin embargo, se observó que al administrar un suplemento basado en ω -3 a ratas diabéticas se encuentra una relación similar de los dos estadios (VIII y IX) del desarrollo espermático ya que no existen diferencias significativas (Fig. 9).

Hallazgos recientes han revelado que puede existir defectos lipídicos en las células germinales y espermatozoides de ratas con DM2, ya que en el testículo no se encuentra un aumento en los niveles de ácido Araquidónico (AA, 20:4n-6), pero sí del ácido

docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-6) producto final de la vía ω -6 (Holman y col., 1983). De la misma manera se observa en nuestros resultados un incremento en el porcentaje de linoleico (18:2 n-6), precursor de DPA. Esto nos demuestra que probablemente el DPA aumenta como respuesta compensatoria a la falta de DHA para corregir posibles alteraciones físico-químicas de la MP de las células germinales en ratas con DM2.

En ratas con STZ se produjo un descenso de DHA, el cual pudiera deberse a un defecto en su biosíntesis en el retículo endoplásmico (RE) o en su transporte. También se han encontrado en mayor proporción cantidades de ácido linoleico, probablemente porque la mayoría de las células responden ante una disminución de DHA incrementando la biosíntesis de ácidos poliinsaturados de la vía ω -6. Se ha sugerido que los niveles de DHA y EPA en este tipo de células podrían jugar un papel importante en su función celular y en la regularización de su madures espermática (Lenzi y col., 1996).

Sin embargo, en este trabajo las ratas con DM2 y tratadas con DHC disminuyó de la misma manera la concentración de DHA y EPA, así como el A.A. e incrementó la proporción de ácidos grasos saturados. Pero al administrar ω -3 al grupo STZ-DHC aumentó la concentración de DHA, disminuyó el araquidónico e incrementó la proporción de AGPIs (Tabla 6 y Gráfica 18).

Probablemente al administrar ω -3 al lote de ratas con una DHC-STZ, se pudo corregir el defecto lipídico de las membranas incrementando la concentración de DHA y EPA en testículo, con la finalidad de reparar daños causados y aumentar la calidad espermática. Parece ser que las concentraciones de DHA y EPA son más recurridas en la espermatogénesis de ratas con DM2 que en ratas sanas (control).

La disponibilidad de DHA en los compartimentos testiculares podría favorecer en la activación de diversas vías de transducción, en la apertura de los canales de calcio, transporte de ciertas proteínas, en la protección y en la activación de genes involucrados en el ciclo celular, etc. (Alvarez y Ollero 2000). Además, se ha demostrado que dichos ácidos podrían estar participando en el remodelaje de las membranas en las espermátidas redondas (células en proceso de diferenciación), ya que en los espermatozoides maduros existe una mayor concentración de DHA (Zalata y col., 1998).

V.2.6.- Histología de testículo.

En este trabajo se observaron cambios en la morfología e histología de los túbulos seminíferos de testículos de ratas con DM2 inducida, los cuales podrían ser los causantes de las distintas alteraciones que se dan en los espermatozoides.

Los grupos controles C y $\omega 3$, no presentaron cambios patológicos aparentes (Fig.10 A y 10 B). Sin embargo, los testículos de las ratas diabéticas mostraron una degeneración de túbulos seminíferos (proceso degenerativo y de necrosis caracterizado por un aumento en el volumen celular cuyo citoplasma es grumoso y turbio, el núcleo conserva sus características morfológicas. La necrosis provoca una disminución en el tamaño y número de células que conforman las diversas capas del túbulo seminífero, afectando la cantidad y morfología de las espermátidas). Además, el lote tratado con STZ también mostró una acumulación de compuestos amiloides en membranas basales y degradación significativa de túbulos seminíferos con respecto a los lotes control (Fig. 10 C). Al administrar $\omega 3$ al lote STZ, al parecer la estructura testicular se vio protegida ya que sólo presentó una degradación de túbulos seminíferos difusa moderada, comparada con el lote tratado con STZ (Fig.10 D).

También, por cromatografía de gases se demostró que existen cambios en la composición lipídica en los testículos de ratas diabéticas. Cabe mencionar que los ácidos grasos tienen un papel importante en la estructura y función de las membranas, ya que sirven como estructura protectora y modulan algunas propiedades importantes, tales como la fluidez y transporte de iones (Caballero y col., 2006).

Los daños histopatológicos en testículos de ratas tratadas con STZ – DHC mostraron la acumulación de compuestos amiloides en membranas basales, además de una degradación de túbulos seminíferos (Fig. 14 B). Dicho resultado también podría explicar el decremento en peso del testículo. Además, la hiperglucemia conduce al daño tisular, debido a la unión excesiva de glucosa a las proteínas (glucotoxicidad), los productos que se forman son estables y se acumulan dentro de las células que no dependen de insulina, pero también se acumulan fuera de las células, uniéndose a proteínas circulantes y a proteínas estructurales de MP (Méndez, 2002). También hay evidencias que indican que la glicación conduce a modificaciones químicas de las proteínas que participan en la patogénesis diabética. Cabe mencionar que el mayor daño en pacientes diabéticos ocurre en tejidos y órganos ricos en colágena y donde la entrada de glucosa no es regulada por la insulina, como es el caso del testículo (Hoshi y col., 1996).

Al administrar $\omega 3$ a un grupo con STZ- DHC, se encontró una degradación de túbulos seminíferos multifocal leve (Fig. 16 B). Sin embargo, las ratas tratadas con STZ- DHC mostraron claramente una acumulación de compuestos amiloides en membranas basales, (Fig. 16 C). Al igual que el grupo con STZ- DHC-CLA (Fig. 18 B). Por lo tanto, los resultados sugieren que la histología del testículo se encuentra alterada. Probablemente, los mecanismos están relacionados con una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gonada, asociados a una disminución de la amplitud de secreción de LH, la cual modifica los niveles de testosterona libre y reduce la funcionalidad de las células de Leydig.

Sin embargo, algunos autores han observado una reducción significativa del diámetro tubular testicular, y como consecuencia una notoria disminución en el número de células de Sertoli. Éstas constituyen el soporte del epitelio y secretan la proteína ligante de andrógenos que concentra la testosterona al interior del túbulo seminífero y permite la manutención de una espermatogénesis normal (Ashley, 1975).

Es importante remarcar que en testículos de ratas tratadas con STZ se observó una disminución significativa en el número de espermatogonias presentes en el epitelio seminífero, con respecto a su control. Esto podría explicarse por el mal funcionamiento de las células de Sertoli, las cuales proporcionan el sostén a las células germinales. Además, constituyen el medio transportador de nutrientes desde el plasma hacia el interior del túbulo seminífero, asegurando un crecimiento y desarrollo óptimo de las espermatogonias.

Es importante mencionar que en el epitelio seminífero del testículo de ratas con STZ (figura 9), se observó la presencia de espermátidas alargadas en menor proporción en el lumen tubular, comparado con el grupo control.

Cabe mencionar que Jhonson y colaboradores (1987) describen que una disminución en la producción de espermatogonias, espermátidas y espermatozoides, indican una alteración en el proceso espermatogénico.

Además, Flickinger (1981), menciona que la discontinuidad epitelial en los túbulos seminíferos, refleja un defecto en la estructura tubular, la cual está asociada a la ausencia de lípidos, y a la detención en el proceso de la espermatogénesis.

VI.- CONCLUSIONES

- Ø **Se generó un modelo con hiperglicemia y con características semejantes a la DM2 en ratas Wistar. Además, el control de la glicemia se vio favorecido al administrar ácidos grasos omega 3 (w3).**

- Ø **El ácido linoleico conjugado (CLA) no redujo los niveles de glucosa en ratas con DM2.**

- Ø **La DM2 en ratas wistar puede afectar:**
La fragilidad del espermatozoide.
Las asociaciones celulares en testículo se ven retrazadas.
La RA se ve retrazada en los gametos masculinos.

- Ø **El suplemento de ácidos grasos w3 ó CLA en ratas diabéticas tienden a restituir los niveles de ácidos grasos insaturados en el testículo.**

- Ø **En ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) y que además fueron suplementadas con w3 o CLA, se ven favorecidos parámetros como:**
porcentaje de espermatozoides completos
células capacitadas y con RA.

- Ø **En ratas tratadas con STZ y que además fueron suplementadas con dieta hipercalórica (DHC), no se ven favorecidos parámetros como:**
porcentaje de espermatozoides completos
células capacitadas y con RA.

- Ø **La DM2 y la dieta hipercalórica (DHC) modifica la composición de ácidos grasos en el testículo. Así como el estudio histopatológico es más severo que en ratas sólo con DM2.**

- Ø **Al administrar el suplemento con w3 o CLA a ratas tratadas con STZ, se incremento la proporción de ácidos grasos insaturados en el testículo (EPA, DHC, Linóleico, Linolenico).**

ÍNDICE DE FIGURAS

PAG.

Figura 1.- Localización de los problemas macrovasculares y microvasculares en individuos con diabetes	(20)
Figura 2.- Estructura de la insulina humana y la secuencia de aminoácidos	(21)
Figura 3.- Diferentes etapas de procesamiento de la insulina en la célula beta pancreática	(22)
Figura 4.- Regulación de la secreción de insulina en la célula β pancreática	(23)
Figura 5.- Mecanismo de acción del aloxana	(26)
Figura 6.- Mecanismo de acción de la estreptozotocina (STZ)	(27)
Figura 7.- Esquema general de las partes que conforman a un gameto masculino de Rata	(29)
Figura 8.- Principales cambios a nivel de Membrana durante el proceso de RA en espermatozoides	(30)
Figura 9.- Efecto del $\omega 3$ en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el tipo de asociaciones celulares de testículo	(50)
Figura 10.- Corte transversal "histológico" de testículos de ratas <i>Wistar</i> con DM2, tratadas con $\omega 3$	(51)
Figura 11.- Análisis histológico de asociaciones celulares presentes en testículos de ratas con DM2 y tratadas con CLA	(59)
Figura 12.- Histología de los testículos de ratas <i>wistar</i> con DM2 tratadas con CLA	(60)
Figura 13.- Efecto de una DHC sobre las asociaciones celulares del testículo de rata <i>Wistar</i> con DM2	(68)
Figura 14.- Histología de los testículos de ratas <i>Wistar</i> con DM2 tratadas con CLA	(69)
Figura 15.- Efecto del $\omega 3$ y una DHC sobre el tipo de asociaciones celulares presentes en testículo de ratas con DM2	(77)
Figura 16.- Efecto del $\omega 3$ y DHC en ratas con DM2 sobre la histología del testículo	(78)
Figura 17.- Porcentaje de asociaciones celulares en testículos de ratas con DM2, tratadas con CLA y DHC	(86)
Figura 18.- Corte transversal de testículo de ratas <i>Wistar</i> con DM2 tratadas con CLA y DHC	(87)

Gráfica 1.- Efecto del $\omega 3$ en ratas con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre	(42)
Gráfica 2.- Efecto del $\omega 3$ en ratas con DM2 sobre el peso corporal	(43)
Gráfica 3.- Efecto del $\omega 3$ en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides anormales	(44)
Gráfica 4.- Efecto del $\omega 3$ en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma	(45)
Gráfica 5.- Efecto del $\omega 3$ en ratas con DM2 sobre el peso relativo de los testículos	(46)
Gráfica 6.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2 mediante cromatografía de gases	(48)
Gráfica 7.- Efecto del CLA en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre	(52)
Gráfica 8.- Efecto del CLA en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el peso corporal	(53)
Gráfica 9.- Porcentaje de espermatozoides anormales en ratas con DM2 tratadas con CLA	(54)
Gráfica 10.- Porcentaje de espermatozoides con RA, de las ratas tratadas con CLA	(55)
Gráfica 11.- Efecto del CLA en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el peso relativo de los testículos	(56)
Gráfica 12.- Efecto del CLA en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el cociente de saturación de ácidos grasos en testículo	(58)
Gráfica 13.- Concentración de glucosa en sangre de ratas con DM2 tratadas con DHC.	(61)
Gráfica 14.- Efecto de la DHC en ratas con DM2 sobre el peso corporal	(62)
Gráfica 15.- Efecto de la DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el Porcentaje de espermatozoides que carecen de flagelo	(63)
Gráfica 16.- Efecto de la DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el Porcentaje de espermatozoides con RA	(64)
Gráfica 17.- Efecto de la DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el peso relativo de los testículos	(65)
Gráfica 18.- Índice de fluidez membranal en testículo de ratas con DM2 tratadas con DHC.	(67)
Gráfica 19.- Efecto del $\omega 3$ y una DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre la concentración de glucosa plasmática	(70)
Gráfica 20.- Efecto del $\omega 3$ y una DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el peso corporal	(71)
Gráfica 21.- Porcentaje de espermatozoides anormales de ratas con DM2 tratadas con $\omega 3$ y DHC	(72)
Gráfica 22.- Efecto del $\omega 3$ y una DHC en ratas con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides con RA	(73)
Gráfica 23.- Peso relativo de los testículos de ratas <i>Wistar</i> con DM2 tratadas con $\omega 3$ y DHC	(74)
Gráfica 24.- Índice de fluidez membranal obtenido en testículos de ratas con DM2 tratadas con $\omega 3$ y DHC	(76)

Gráfica 25.- Efecto del CLA y DHC en ratas con DM2 sobre la concentración de glucosa en sangre	(79)
Gráfica 26.- Efecto del CLA y DHC en ratas con DM2 sobre el peso corporal	(80)
Gráfica 27.- Efecto del CLA y DHC en ratas <i>Wistar</i> con DM2 sobre el porcentaje de espermatozoides anormales	(81)
Gráfica 28.- Efecto del CLA y DHC sobre el porcentaje de espermatozoides que presentaron RA	(82)
Gráfica 29.- Peso relativo de los testículos en ratas con DM2 tratadas con CLA y DHC	(83)
Gráfica 30.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados en testículo de ratas con DM2 tratadas con CLA y DHC	(85)

ÍNDICE DE TABLAS

PAG.

Tabla 1.- Se muestra la clasificación de la DM 1; DM2; Otros tipos de Diabetes y La Diabetes gestacional	(16)
Tabla 2.- Patrones de dietas administradas a ratas <i>Wistar</i> durante 4 meses	(35)
Tabla 3.- Metodología utilizada para tinción con H-E en testículo	(39)
Tabla 4.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratadas con ω 3	(47)
Tabla 5.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas con DM2 tratadas con CLA.	(57)
Tabla 6.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratados con una DHC	(66)
Tabla 7.- Composición de ácidos grasos en testículos de ratas <i>Wistar</i> con DM2 tratadas con ω 3 y DHC	(75)
Tabla 8.- Composición de ácidos grasos en testículo de ratas con DM2, tratados con CLA y DHC	(84)

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGPI's	Ácidos grasos poliinsaturados
AL	Aloxana
ATP	Adenosín trifosfato
CLA	Ácido linoléico conjugado
DHC	Dieta hipercalórica
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FFA y AGL	Ácidos grasos libres
FSH	Hormona folículo estimulante
GK	Glucoquinasas
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GSH	Glutación reducido
HA	Radicales aloxana
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
MP	Membrana plasmática
OMS	Organización mundial de salud
ON	Oxido nítrico
RA	Reacción acrosomal
STZ	Estreptozotocina
SUR	Receptor de Sulfonilurea
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ω 3	Omega 3

VII.- GLOSARIO

Acrosoma.- Pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide y que contiene enzimas hidrolíticas. La misión de éstas es degradar la zona pelúcida.

Degeneración.- Incluye todos los cambios celulares e intersticiales

Espermatozoide.- Es una célula haploide altamente diferenciada que constituye el gameto masculino. Dicha célula tiene la capacidad de fecundar al óvulo.

Espermatogénesis.- Es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoide; es la gametogenesis en el macho

Espermátidas.- son células precursoras de los Espermatozoides. Estas células se forman cuando se reproduce el espermatozocito secundario y son las que evolucionarán hasta convertirse en Espermatozoides

Haploide.- es aquella célula que contiene la mitad (n) del número normal de cromosomas

Hiperinsulinemia.- exceso de insulina en sangre. La insulina es una hormona segregada por el páncreas que regula la cantidad de glucosa en sangre y su utilización por el organismo

Hipertrigliceridemia.- se caracteriza por el aumento de los triglicéridos plasmáticos por encima de 200 miligramos por cada decilitro de sangre.

Hiperglucemia.- cantidad excesiva de glucosa en la sangre. etimológicamente *hyper-* en griego significa "demasiado"; *-glyc-* en griego significa "dulce"; *-emia* significa "de la sangre".

Triglicéridos.- son otro tipo de lípidos en la sangre. La mayoría de la grasa del cuerpo son triglicéridos almacenados para ser convertidos en energía cuando hace falta. Los triglicéridos se obtienen de las grasas en los alimentos y son metabolizados en el hígado

VIII.- REFERENCIAS

Abraham L. Kierszenbaum. (2000). Fusion of membranes during the acrosome reaction: A tale of two SNAREs. *Molecular Reproduction and Development* 57:4, 309

Aguas AP, Pinto da Silva PP. (1989). Bimodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during Ca^{2+} dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *J Cell Sci* 93(Pt 3): 467-479.

Álvarez G.J., Ollero M.D., Freedman S. (2000). El ácido docosahexaenoico corrige un defecto lipídico en células germinales y esperma del epidídimo y aumenta la producción de esperma en ratones cfr. *Revista iberoamericana de fertilidad*: 136-140.

Anders A. F. Sima. (2000). "Chronic complications in diabetes, animal models and chronic complications" Ed. Harwood academic publishers. Detroit, USA.

Areas, M., Gregorio, S., Reyes, F. (2003). Evaluación de la inducción de diabetes neonatal con estreptozotocina en ratas Wistar. *Alim. Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. ISSN 0300-5755, N° 347:45-49

Arteaga A. Maiz A., Olmos P. y Velasco N. (1997). *Manual de Diabetes y Enfermedades Metabólicas*. Depto. Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. P. Universidad Católica de Chile.

Armstrong C. (2006). Releases Standards of Medical Care for Patients with Diabetes. *Am Fam Physician*. Sept; 74(5); 871-874.

Ashley, H. (1975). *Comparative histology*. EN: *The Pathology of rats*, Eds. W.E. Ribelin y G. Migaki, Univ. Wisconsin Press (Madison, Wisconsin): 3-30.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 1; 5:110-123 Review.

Ballester J., Muñoz M.C., Domínguez J., Rigau T., Guinovart J., Rodríguez –Gil J. (2001). Insulin-Dependent Diabetes affects Testicular Function by FSH and LH-Linked Mechanisms. *Journal of Andrology*. Vol.25. No. 5. September: 706-719.

Battle L, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM. (1999). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin, *Biochem Pharmacol*. Vol.41:2786-2790.

Brain K., Byrne R., Bedigian K. (1980). Studies on the mechanism of capacitation: Albumin mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Cell. Biology*. Vol.77.No.3: 1546- 1550.

Bendahmane M, Zeng H, Daulat R. (2002). Assessment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non-carbohydrate agonists. *Biochemistry and biophysics* 404: 38-47.

Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Tamargo J. (2006). Farmacología de los ácidos grasos omega-3. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España: 1-17.

Casis, S. (1997). Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*. Vol.25: 595-603.

Claire Wathes D., Robert E. D., John Aitken R. (2007). Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Australia. 77(2): 190-201.

Contreras P. (2002). Testículo e Insulino-Resistencia. (Testis and Insulin-Resistance). Fundación Médica San Cristóbal.

Cruz, M., Velasco, E., Kumate, J. (2001). "Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa". *Gac. Med. Mex. México, D.F.* Vol. 137(2):135-146.

Dianes C. (1990). Compendio de bioquímica. Manual moderno. México D.F: pp. 63, 67.

Díaz N.L., Galán C.S., Fernández P.G. (1993). Grupo de autocuidado de diabetes mellitus Tipo 2 *Rev. Salud pública de México*. Marzo- Abril:52 (2): 13-14.

Díaz B.E. (2008) Manejo Nutricional de la obesidad y sus comorbilidades. Laboratorio de metabolismo energético. Universidad de Chile . Vol.18, no.3:1-8.

Durruty, P, García de los Ríos, M. (2001). "Glucose and lipid toxicity in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes". *Rev. Med. Chile* 129: 671-9.

Ebelt H, Peschke D, Bromme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E. (2000). Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta- cells in vitro. 28: 65-72

Edlund H. (1998). Modulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: 560-567.

Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. Vol. 43. :1528- 1533.

Espinha D. C., Lucimar P., Elisângela Ch.(2007). Morphologic evaluation and Ca^{2+} mobilization by glicose and acetylcholine in human pancreatic cells. *Arq Bras Endocrinol Metab* V.51 n.3 San Paulo:165-163

Fleming R, Hopkinson ZE, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. (2001). Ovarian Function and Metabolic Factors in Women with Oligomenorrhea Treated with Metformin in a Randomized Double Placebo-Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab*;Vol. 86: 1126- 33.

Flickinger, C. (1981). Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis. *Biology of reproduction*, 25: 871-83.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497- 509.

Gallardo M, Pereira G, Grondona F, Padrón R, Barrios V, Lantigua A, Domínguez E, Fragas R, Nurques B, Reyes A, Vega V. (2003). Relación de la alteración espermática en el líquido seminal con algunos metabolitos del estrés oxidative. *Rev. Cubana Invest. Biomedica*. 22 (2): 90-94.

Garcia S, King H, Aubert R, Herman W: Global burden of diabetes (1999). prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*; 21: 1414- 1431.

Garner D., Afeese. (1993). Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membranes precedes the acrosoma reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci* 108 (Pt 3): 935- 946.

Gilbert, S. F. (2005). *Developmental Biology*. 7a Ed. Interamericana. Sinauer Associates, Inc. Publ.: 52-56.

Goday A, Serrano Ríos M. (2000) Epidemiología de la diabetes mellitus en España. *Med Clin (Barc)* ; 102: 306-315.

Guma F.C.R, y col. (1997). Effect of FSH and insulin on lipogenesis in cultures of Sertoli cells from immature rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30. 591-597.

Gulaya N. M., Margitich V.M., Govseeva N.M., Klimashevsky V.M., Gorpynchenko Il., Boyko M.I. (2007). Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. Department of Lipid Biochemistry, O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine: 46(3): 169-75.

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. (1987). Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population age 20-74 yr. *Diabetes*; 36: 523-34.

Hassan, A.A., Hassouna, M.M. (1993). The effects of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *The Journal of urology*. Vol.3. Numero 10: 140 – 142.

Hernández-Ávila M, Olaíz G. (2002). La diabetes y el mexicano: Un reto para la salud pública., *Ciencia Revista de la Academia Mexicana de ciencias.*, Julio-Septiembre, Vol. 53, Nº 3: 8-17.

Howard BV., Abbott WG, Beltz WF. (1987). Integrated study of low density lipoprotein metabolism and very low-density lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*; 36:870.

Holman, R., Johnson, S., Gerrard, J., Mauer, M., Kupcho-Sandberg, S., Brown, D. (1983). "Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical Sciences*. Vol. 80. Pp. 2375-2379.

Hoshi A, Takahashi M, Fujii J, Myint T, Kaneto H, Suzuki K, Yama Y, Taniguchi N. (1996). Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase diabetic rats. *Biochem J*. v.15;318:119-123.

Hurtado E. G, Gómea D. (1998). Lipid dismetabolism in Leydig and Sertoli cell isolated from streptozotocin diabetic rats. *The Int. of Biochemistry and cell Biology* 30:1001-1010.

Hussain K, Hindmarsh P, Aynsley-Green A: (2003). Neonates with symptomatic hyperinsulinemic hypoglycemia generate inappropriately low serum cortisol counterregulatory hormonal responses. *J Clin Endocrinol Metab*; 88: 4342-7.

Islas, S., Revilla, C. (2002). "Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación". En Islas, S. y Lifshitz, A. "Diabetes Mellitus". Ed. McGraw-Hill Interamericana. Pag. 3-14.

Jacobs, H. (1983). Uptake of labelled alloxan in mouse organs and mitochondria in vivo and in vitro. *Endocrinology* 113: 943-948.

Jhonson, L.; Banguyen, H.; Petty, C., Neaves, W. (1987). Quantification of human Spermatogenesis: Germ Cell Degeneration during Spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biology of Reproduction*, 37:739-47,

Katsumori K, Wasada T, Kuroki H, Aii H, Aoki K, Soito S, Omori Y. (1995) Prevalence of macro and borderline glucose-intolerant subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* ; 29 (3): 195-201.

Katsumori K, Wasada T, Kuroki H, Aii H, Saeki A, Aoki K, Saito S, Omori Y. (1995) Prevalence of macro and microvascular diseases in non-insulin-dependent diabetic and borderline glucose-intolerant subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*; 29(3): 195-201.

Khan S., Teerels K., Dorrington J. (1992). Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod*.46: 335-341.

Laybutt, R., Sharma, A., Sgroi, D., Gaudet, J., Bonner-Weir, S., Weir, G. (2002). "Genetic Regulation of Metabolic Pathways in β -Cells Disrupted by Hyperglycemia." *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 277. No. 13. Pp. 10912-10921.

Lenzi A., Gandini L, Maresca V, Rago, Sagró P, Dondero F, Picardo M. (1996). Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Molecular Human Reproduction* . vol.6 No.3: 226-231.

Le Roith, D; Taylor, S; Olefsky, J, (2003). *Diabetes mellitus Texto básico y clínico, segunda edición*, Mc Graw Hill Interamericana, México, pag. 1331-1336.

Levalle O, Aszpis S, Nagelberg A, Mormandi E, Otero P. (1998). Inducción de la Espermatogénesis en el Hipogona-dotrófico. (Induction of Spermatogenesis in Hypogonadotropic Hypogonadism). División Endocrinología. Hospital Carlos Durand. Buenos Aires. Argentina.

Lipshutz G. (2007). Pancreas-Kidney and Pancreas Transplantation for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, Volume 36, Issue 4: 1015-1038.

Maatman T. Montague D, Martin LM, (2000). Erectile dysfunction in men with diabetes mellitus. *Urology*. 29: 589-592.

Mancillas A.L., Gómez P.F., Rull R.J. (2002) Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus, conceptos actuales. *Rev Edocrinol Nutr*; 10 (2): pag. 63-68.

Marzouki ZMH, Coniglio J. (1982). Effect of essential fatty acid deficiency on lipids of rat Sertoli and germinal cells, *Biology of reproduction*, 27: 312-315.

Méndez D.J. (2002). Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. IMSS. Gac. Médica. México. Vol.139 No. 1: 49-55.

Mcculloch D. (2000). Insulin secretion and pancreatic beta cell function. Volume 1. Blackwell Science.: vol.2: 102-104.

Morrison W. R. Y Smith LI. M. (1964). Preparation Of Fatty Acid Methyl Esters And Dimethylacetals From Lipids With Boron Fluoride-Methanol. Department Of Food Science And Technology. University Of California, Davis, California. Pp. 600 – 608.

Mordes, J.P. and Rossini A.A. (1991). Animal models of diabetes. American Journal of Medicine; 70: 353-355.

Murray, R. (1994). Sexual dysfunction in diabetes mellitus. Nippon Rinsho.55: 2991-2995.

Olson G.E, WinFrey V.P, Flaherty S.P. (1987). Cytoskeletal assemblies of mammalian spermatozoa. Ann N y Acad Sci 513: 222-246.

Orozco T. R. (2008). Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA ω -3) y linoléico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus 2 (DM2) en ratas *wistar*. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-I.

Oyeyemi, Matthew, Olugbenga y Ubiogoro, Oniovosa. (2005) Espermiograma y Características Morfológicas de los Espermatozoides en el Testículo y Epidídimo del Verraco Grande Blanco en Nigeria . Int. J. Morphol., vol.23, no.3, p.235-239. ISSN 0717-9502.

Pérez G., Guerrero F. (2006). Ácidos grasos en la dieta Diabetes mellitus e insulino resistencia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Revista Fac Med Uni Colomb (54): pag. 134 – 141.

Peterson RN, Russell LD. (1985). The Mammalian Spermatozoon: A model for the study of regional specificity in plasma membrane organization and function. Tissue Cell 17 (6): 769-791.

Pfreunds Chwn. - Scholmerich "Fisiopatología y Bioquímica" (2002) Ediciones Harcourt Madrid, España. pp. 332-335.

Pickup, J And W.S. (1997). Goseth.Environmental factors in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus in Textbook of diabetes. 2ª edition. Volume 1. Blackwell Science.Pp. 142-143.

Poitout, V., Robertson, P. (2007). "Glucolipototoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction". Endocrine Reviews, doi:10.12:10/ 23.

Rehman K, Beshay E, Carrier S. (2001). Diabetes and male sexual function. *Sex Reproduction Med.* Vol.1. No.1. : 1-7

Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A., Del Prado, M., Torres, N. (2005). "Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud". *Revista de Investigación Clínica.* Vol. 57, Núm. 3. Pp. 457-472.

Rodriguez H., Salazar P., Schmidt N. (2008). Histología testicular humana comparada. *Rev. chil. anat.* vol.17, no.2, p.183-188. ISSN 0716-9868.

Rodríguez M, Vivas G. (2003). Mecanismos moleculares y acción de los ácidos grasos poliinsaturados. *Unidad de Investigaciones Medicas en nutrición. IMSS. Investigación clínica.* vol. 57. No.3: 457-472.

Roger J. Zoorob, Michael D. Hagen. (1997). Guidelines on the care of diabetic nephropathy, retinopathy and foot disease. *American Family physician* November 15,; 2021-2027.

Saibal K., Ranjan CH. (2005). Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus: Present Therapies and New Drug Target. *Mini- Reviews in Medical Chemistry.* (5): 1019 – 1034.

Sanguinetti R.F., Ogawa K., Kurohmaru M., Hayashi J. (1995). Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after streptozotocin administration. *44: 71-73.*

Soudamani S, Yuvaraj S, et al. (2005). Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats, *The anatomical record part a 287A: 1281-1289.*

Slack J. (1995). Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension. *Am J Med; 90(suppl2A): 7S-12S.*

Sybulsky, S. y Maughan G. (1971). Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* Vol. 20(4):297-302.

Szkudelski T. (2001). The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β -cells of the rat Páncreas. *Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.*50: 536-546.

Trejo R; Mújica A, (1990). Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation, and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 26(4):366-376.

Tresierra, A.; Culquichicón, Z. (1993). *Biología*. Trujillo (Perú): Editorial Libertad, pag. 60.

Tsalikian E. (2000). Insulin aspart in pediatric and adolescent patients with type 1 diabetes. N° 767. *Diabetología*; 43: 200.

Velázquez M.O., Rosas P.M., Lara E.A., Pastelín H.G., Attie F, Tapia CR. (2000). Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) *Arch Cardiol Mex* 2000; 72 (1): 71-84.

Voet, D., Voet, Judith. (1990). "Biochemistry". Ed. John Wiley & Sons, Inc. United States. Pp 1223.

White JR, Campbell RKE, Hirsch I. (1997). Insulin analogues: New agents for improving glycemic control. *Postgrad Med*; 101: 58-74. (85-102)

Walker H. and Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Biology and Physiology*. USA. Society for Reproduction and Fertility 130:15-28.

Yanagimachi R, Usui N. (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89 (1): 161-174.

Yanagimachi R, Usui N. (1994). Mammalian fertilization in: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwold GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. *The physiology of reproduction*. Vol.1: New York: Raven Press; Pp. 190-302.

Zarate A, Villalpando S, Miranda R. (1989). *Diabetes mellitus. Bases para su tratamiento*. Editorial Trillas. México. México. Pag.93. Pp. 3-5.

Zhang Yali, Xiao Meifang, Niu Gang, Tan Huanran. (2005). "Mechanisms of oleic acid deterioration in insulin secretion: Role in the pathogenesis of type 2 diabetes". *Life Sciences* 77: 2071-2081

Zalata, A., Hafez, T., Zini, A., Comhaire, C. (1998). Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum. Reprod.*, 10: 1444- 1451.