



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

CARACTERIZACIÓN DE LA GAMETOGÉNESIS MASCULINA EN UN  
MODELO MURINO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA  
P R E S E N T A :  
JOCELYN BERENICE CAMACHO RODRÍGUEZ

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. JOSE RENE ESCALONA MUGICA  
ASESORA: DRA. ROSA LINARES CULEBRO  
ASESORA: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
SINODAL: MTRA. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ  
SINODAL: DRA. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ



CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 académicos**

A el Dr. Jose Rene Escalona Mugica, por su apoyo y guía en la realización de la tesis.

A la Dra. Rosa Linares Culebro, la Dra. Leticia Morales Ledesma, la Mtra. Angélica Flores Ramírez y la Dra. Elizabeth Vieyra Valdez por su asesoramiento y soporte en el escrito de la tesis.

A la Biol. Ivonne Grisel Sánchez Cervantes por su asesoría en la técnica de inmunofluorescencia, observación de muestras y captura de micrografías en un microscopio confocal. LSM 880 de la marca Zeiss.

A todo el equipo del Laboratorio de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su apoyo en el cuidado y disección de las ratas y su ayuda en la obtención de la concentración y viabilidad de los espermatozoides.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Aparato reproductor masculino</b> .....	4
Fisiología .....	4
Espermatogénesis .....	6
Control hormonal.....	8
<b>Obesidad</b> .....	10
Definición y epidemiología .....	10
Tejido adiposo .....	11
La obesidad produce un estado de inflamación .....	12
Efecto de la obesidad en el metabolismo .....	12
<b>Infertilidad masculina y obesidad</b> .....	13
Infertilidad .....	13
Alteraciones endocrinas relacionadas con la obesidad .....	14
Efecto de la obesidad en testículo .....	15
Efecto de la obesidad sobre los espermatozoides .....	15
<b>Antecedentes</b> .....	17
<b>Planteamiento del problema</b> .....	18
<b>Pregunta de investigación</b> .....	18
<b>Hipótesis</b> .....	19
<b>Objetivos</b> .....	19
General.....	19
Específicos .....	19
<b>Materiales y métodos</b> .....	19
Animales experimentales .....	19
Diseño experimental .....	20
Masa corporal y consumo calórico .....	21
Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y prueba de tolerancia a la insulina .....	22
Determinación de las medidas somatométricas.....	22
Toma de muestras de tejido en punto final .....	23
Cuantificación de triacilgliceroles, colesterol y HDL en plasma .....	24
Espermatobioscopia.....	24
Análisis morfométrico del testículo .....	26
Caracterización de la gametogénesis.....	27

Análisis estadístico.....	29
<b>Resultados</b> .....	30
Ganancia de masa corporal y consumo de alimento .....	30
Medidas somatométricas .....	31
Tejido adiposo .....	32
Perfil lipídico .....	34
Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) .....	34
Curva de sensibilidad a la insulina (ITT) .....	35
Efecto de la obesidad en el espermiograma .....	36
Análisis morfométrico del testículo .....	37
Caracterización de la gametogénesis.....	39
<b>Discusión</b> .....	40
Alteración en las medidas somatométricas y consumo de alimento .....	40
Aumento del tejido adiposo.....	41
Perfil lipídico .....	42
Alteración en el metabolismo de la glucosa e insulina.....	43
Efecto de la dieta en la espermatogénesis.....	44
<b>Conclusiones</b> .....	48
<b>Apéndice</b> .....	50
Preparación de 100 g de dieta HFD .....	50
Protocolo de tinción para hematoxilina de Gill y eosina amarillenta.....	50
Viabilidad espermática .....	51
Protocolo de inmunofluorescencia.....	51
Preparación de MOWIOL.....	52
<b>Referencias</b> .....	54

## Resumen

**Antecedentes:** La asociación entre la alta adiposidad y la infertilidad en hombres no ha sido claramente demostrada. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una disminución de la fertilidad masculina, paralela al aumento de la prevalencia de la obesidad.

**Objetivo:** Se describieron los efectos de la obesidad causada por una dieta alta en grasas (HFD) en un modelo murino, sobre el metabolismo y la gametogénesis.

**Metodología:** Se utilizaron 13 Ratas Wistar macho de 5 semanas postnatales, las cuales fueron alimentadas durante 18 semanas con una dieta HFD, semanalmente se monitoreó la ganancia de masa corporal y el consumo calórico. A las 22 semanas posnatales se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y de sensibilidad a la insulina. A la siguiente semana se sacrificaron las ratas y se determinó la concentración de triacilglicérols, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el aumento de la masa del tejido adiposo. Además, se analizó la concentración y viabilidad de los espermatozoides y se evaluó la morfología de los túbulos seminíferos mediante la tinción de H&E. Finalmente, se analizaron alteraciones en la espermatogénesis utilizando anticuerpos contra PCNA (marcador de proliferación) y SCP3 (indicador de la meiosis).

**Resultados:** La dieta HFD provocó un aumento en la masa corporal de las ratas, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. No se encontraron diferencias en la morfología de los túbulos seminíferos, ni en la concentración de PCNA y SCP3. Sin embargo, si se observó una disminución de la masa testicular y de la viabilidad de los espermatozoides.

**Conclusión:** La obesidad inducida por una dieta alta en grasas, tuvo un efecto negativo sobre la espermatogénesis, al inhibir la vitalidad de los espermatozoides. Sin embargo, se necesitaría el análisis de más procesos celulares y moleculares para establecer con mayor precisión los mecanismos involucrados en estas alteraciones.

## **Abstract**

**Background:** The association between high adiposity and male infertility has not been entirely demonstrated. However, in recent years there has been a decrease in male fertility that correlates to the increase in the prevalence of obesity.

**Methodology:** 13 male Wistar rats of 5 postnatal weeks were used, which were fed for 18 weeks with a HFD diet, with a monitoring weekly mass gain and caloric intake. Subsequently, at 22 postnatal weeks, intraperitoneal glucose tolerance and insulin sensitivity tests were performed. The following week the rats were sacrificed and the concentration of triacylglycerols, high-density lipoprotein (HDL) and the mass gain of adipose tissue were determined. In addition, sperm concentration and viability were analyzed and the morphology of the seminiferous tubules was evaluated by H&E staining. Finally, alterations in spermatogenesis were analyzed using antibodies against PCNA (a proliferation marker) and SCP3 (a label for meiosis).

**Results:** The HFD diet caused an increase in the rats' body mass glucose intolerance and insulin resistance. No differences were found in the morphology of the seminiferous tubules, nor in PCNA and SCP labeling. However, a decrease in testicular mass and sperm viability was observed.

**Conclusion:** Obesity induced by a high-fat diet had a negative effect on spermatogenesis by inhibiting sperm vitality. However, further analysis of the cellular and molecular processes involved is needed to determine the precise mechanisms involved in these alterations.

## Introducción

La espermatogénesis es el proceso por el cual los gametos masculinos se desarrollan a partir de espermatogonias (Lewis & Downes, 2019). La espermatogénesis se lleva a cabo de forma continua dentro del epitelio germinal de los testículos adultos (Deshpande et al., 2019), está controlada por interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y los testículos; conformando el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) (Sliwowska et al., 2014). Además, involucra diversas hormonas proteicas y esteroides (Davidson et al., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la obesidad como un problema de salud pública en México y el resto del mundo. La obesidad está asociada con la desregulación del eje HHG y con infertilidad en las mujeres. Sin embargo, en los varones esta asociación no está muy bien caracterizada; a pesar de ello, existe cada vez más evidencia de que la obesidad masculina está involucrada en la reducción de la fertilidad (Deshpande et al., 2019). La obesidad impacta de forma negativa a través de numerosos mecanismos que incluyen: alteración en las concentraciones plasmáticas de la testosterona y de los estrógenos, niveles elevados de mediadores inflamatorios, especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento de la temperatura testicular, entre otros. En conjunto, estos elementos pueden tener efectos perjudiciales sobre la espermatogénesis y por lo tanto en la fertilidad (Kahn & Brannigan, 2017).

Actualmente, en la bibliografía no existen resultados concluyentes del efecto de la obesidad sobre la espermatogénesis. El objetivo principal del trabajo es determinar los efectos de la obesidad inducida por la dieta alta en grasas (HFD) sobre la gametogénesis masculina en un modelo murino. De esta forma, podremos aportar más evidencia sobre los efectos perjudiciales de la obesidad sobre la fertilidad masculina, así como los mecanismos celulares involucrados.

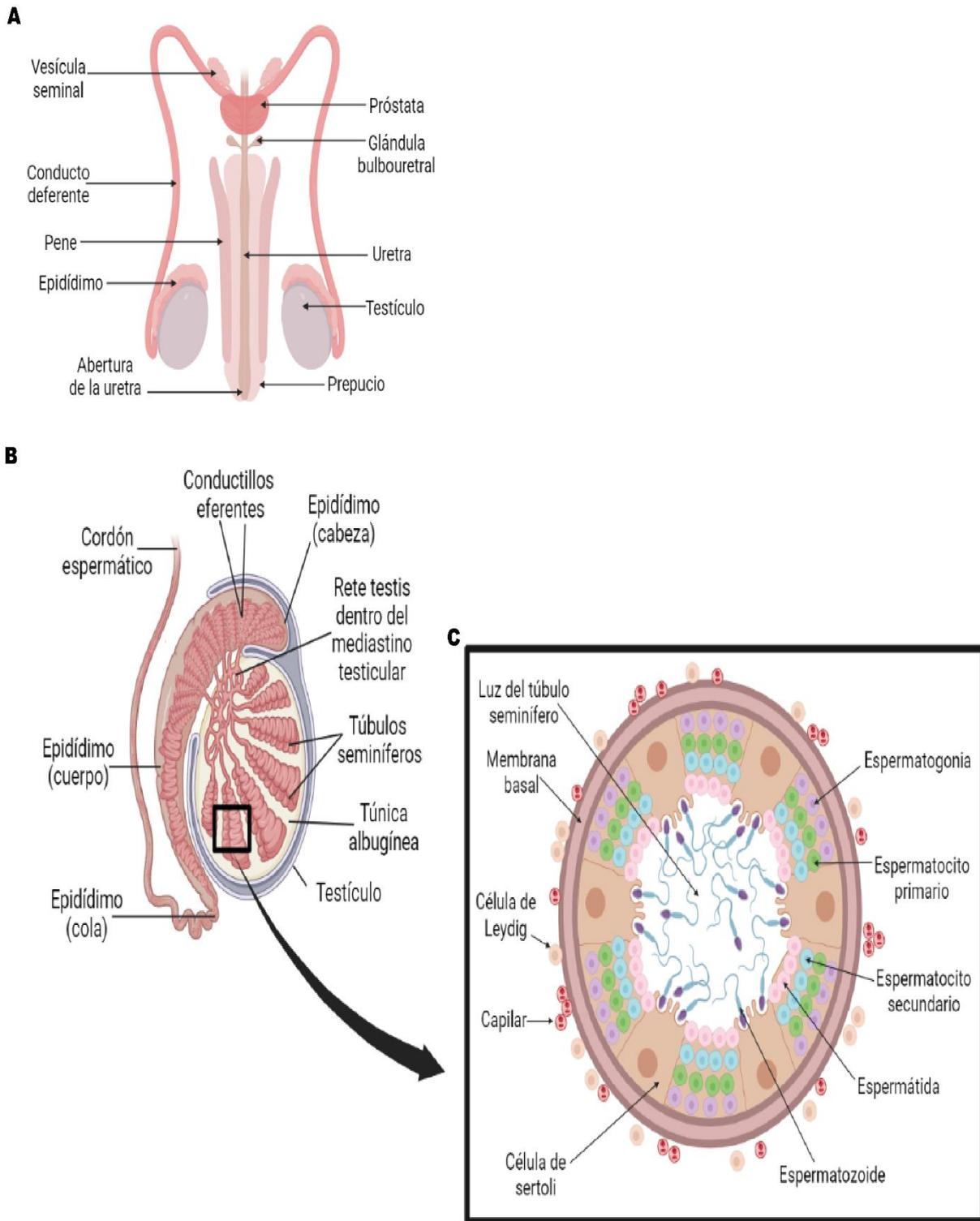
# Aparato reproductor masculino

## Fisiología

El aparato reproductor masculino consta de dos elementos esenciales: las gónadas (testículos) y el conjunto de glándulas y conductos que constituyen a los órganos sexuales masculinos (**Imagen 1A**) (Boron & Boulpaep, 2012).

Los testículos son los órganos responsables de la producción de gametos (espermatozoides), células altamente especializadas que participan en la reproducción sexual. Adicionalmente, producen múltiples hormonas esteroides y factores de crecimiento involucrados en la función reproductiva (Boron & Boulpaep, 2012). Cada testículo está organizado en lóbulos o dominios, los cuales a su vez están divididos por un grupo de tabiques (**Imagen 1B**). Cada lóbulo está compuesto por tejido intersticial y de 1-3 túbulos seminíferos, a su vez en el tejido intersticial se encuentran las células de Leydig (aproximadamente  $2 \times 10^8$  células de Leydig por testículo), células inmunitarias, vasos sanguíneos, fibroblastos y tejido conectivo.

La función principal de las células de Leydig es la producción de hormonas sexuales masculinas (andrógenos). Los túbulos seminíferos son estructuras formadas por epitelios formados por células de Sertoli, estructuras dentro del testículo donde se llevan a cabo todos los procesos involucrados en la producción de espermatozoides (espermatogénesis y espermiogénesis) (**Imagen 1C**). La integridad de todas estas estructuras, particularmente de los túbulos seminíferos es crucial en la diferenciación de los gametos masculinos y, por lo tanto, en la reproducción (Raad et al., 2017). Los órganos accesorios sexuales incluyen el par de epidídimos, los conductos deferentes, las vesículas seminales, los conductos eyaculadores, la próstata, las glándulas bulbouretrales, la uretra y el pene (Fox, 2014) (**Imagen 1A**).



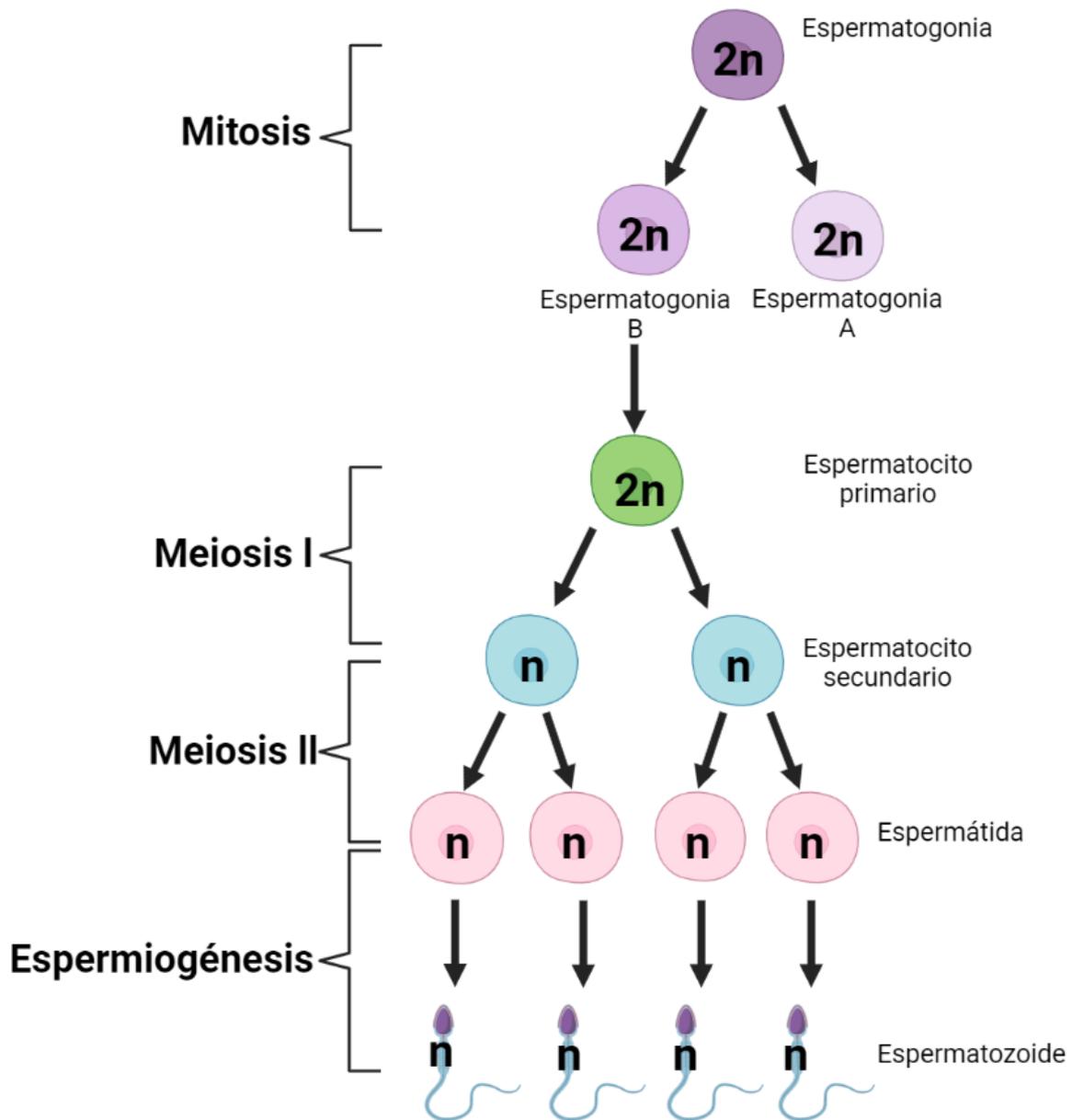
**Figura 1. Aparato reproductor masculino.** A) Anatomía de los genitales internos masculinos y los órganos accesorios sexuales. B) Corte sagital del testículo. C) Corte trasversal del túbulo seminífero. Modificado de Boron & Boulpapep, 2012.

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso finamente regulado que consiste en la producción de espermatozoides funcionales (Raad et al., 2017). Este proceso involucra la participación del hipotálamo, la hipófisis, las células de Leydig, las células de Sertoli; así como a diversas hormonas proteicas y esteroides (Davidson et al., 2015). Para su estudio la espermatogénesis se divide en tres fases; proliferación espermatogonial por mitosis, la reducción del material genético por meiosis y la maduración morfológica (espermiogénesis) (**Figura 2**). En conjunto, las tres fases tienen una duración aproximada de 74 días en el hombre (Deshpande et al., 2019).

Las espermatogonias corresponden a la reserva de células progenitoras, son células diploides y redondeadas, capaces de realizar mitosis (Fox, 2014). Como producto de la división mitótica se producen dos tipos de espermatogonias, espermatogonias tipo A (células de la reserva de precursores de gametos) y en espermatogonias tipo B (células que iniciarán la primera división meiótica). Para mantener una capacidad reproductiva, es necesario un balance entre ambos tipos de división celular, así como de la muerte celular (apoptosis). Un desbalance en cualquiera de ellos podría impactar de forma negativa a la fertilidad (Lewis & Downes, 2019).

Las células que realizan meiosis, los espermatocitos primarios, pasan por un proceso de maduración en dos etapas en las que reducen su complemento cromosómico para generar gametos haploides (Fox, 2014). En la primera división se producen dos espermatocitos secundarios; posteriormente en la segunda división se genera un par de espermatidas; las cuales no experimentan divisiones adicionales y se convierten en espermatozoides que son liberados a la luz del túbulo seminífero, este proceso de maduración morfológica y funcional de espermatidas a espermatozoides se le conoce como espermiogénesis (Lewis & Downes, 2019).



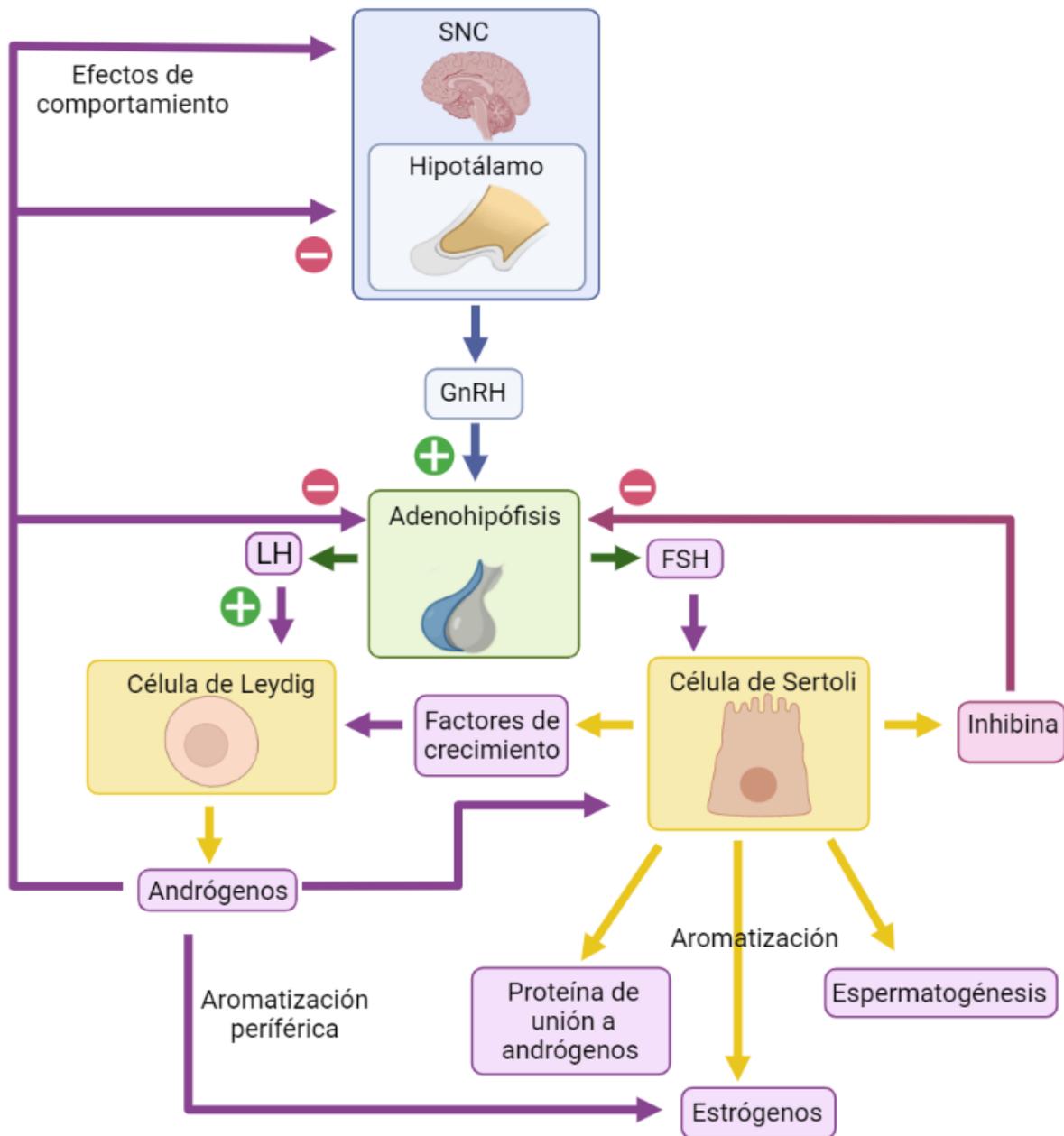
**Figura 2. Proceso de espermatogénesis.** Las espermatogonias experimentan división mitótica en la cual se reemplazan a sí mismas y producen una célula hija que experimentará meiosis para producir espermatozoides. Modificado de Fox, 2014.

La espermatogénesis es regulada por hormonas, esteroideas y por las gonadotropinas. Cualquier modificación en la secreción de estas hormonas podría interrumpir la espermatogénesis y causar infertilidad. Entre los factores que alteran el proceso espermatogénico se encuentran la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico (Deshpande et al., 2019). Existe una estrecha relación entre el estado metabólico y reproductivo de los organismos.

## Control hormonal

Como se mencionó previamente, el desarrollo de la espermatogénesis depende de varios estímulos hormonales que dan como resultado un patrón complejo de vías de señalización intratesticular. El eje HHG controla dos funciones principales en la reproducción masculina: la producción de espermatozoides y la biosíntesis de testosterona. El hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula a la adenohipófisis para que secreten la hormona luteinizante (LH), la cual actúa sobre las células de Leydig y estimula la secreción de la testosterona (Smith & Walker, 2015) y de la hormona folículo estimulante (FSH) que estimula a las células de Sertoli para promover el desarrollo de los gametos a lo largo de las diferentes fases de la espermatogénesis (Davidson et al., 2015) (**Figura 3**).

Además, las células de Sertoli secretan la proteína fijadora de andrógenos (ABP, del inglés *Androgen Binding Protein*), varios estudios en rata indican que aproximadamente el 80% de esta proteína se secreta en la luz del túbulo seminífero, mientras que el resto se libera en la sangre, esta proteína es necesaria para el mantenimiento de la concentración de testosterona en el epitelio seminífero, además de mantener la función normal del epitelio de los túbulos eferentes y la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Forti et al. 1988). La testosterona intratesticular es necesaria para el mantenimiento de la barrera hematotesticular y las uniones celulares específicas entre las células de Sertoli; además, es necesaria en la progresión meiótica y la maduración de las espermátidas (Liu & Ding, 2017).



**Figura 3. Eje hipotálamo-hipofisis-gonadal.** El Hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la cual estimula a la adenohipofisis para sintetizar y liberar a la hormona luteinizante (LH), que actúa sobre las células de Leydig, y la hormona folículo estimulante (FSH) que estimula las células de Sertoli. La retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisis-gonadal ocurre por 2 vías. (+) significa estimulación. (-) representa inhibición a nivel del sistema nervioso central (SNC). Modificado de Boron & Boulpapep, 2012.

Otras moléculas como la leptina y la insulina participan en la regulación de la espermatogénesis. La leptina, es una adipocina principalmente sintetizada y secretada por el tejido adiposo, actúa uniéndose a sus receptores que se encuentran ampliamente distribuidos en el hipotálamo, páncreas, testículo, músculo esquelético, riñones, pulmones e incluso en la cola de los espermatozoides. La leptina participa en la homeostasis energética y en el control de la ingesta calórica; además, se ha observado que modula la maduración y el desarrollo de las funciones sexuales. Por ejemplo, se ha observado que la leptina participa en la regulación del inicio de la pubertad, al desencadenar las oleadas nocturnas de gonadotropinas, ya que estimula a las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas. Además, la presencia de receptores de leptina en los túbulos seminíferos, en las células de Sertoli y de Leydig sugiere que la leptina puede tener un papel regulador en la espermatogénesis (Malik et al., 2019).

En el caso de la insulina, si bien su función principal es regular el metabolismo energético también hay pruebas de que la insulina desempeña un papel en la regulación de la reproducción. La insulina puede servir como una señal importante que vincula el metabolismo y el estado reproductivo. Por ejemplo, existe evidencia de que la insulina puede ser un regulador de la secreción de GnRH en el hipotálamo (Sliwowska et al., 2014). Además, se ha demostrado que la insulina está presente en el semen humano y es vital para la motilidad, capacitación y fertilización de los espermatozoides (McPherson & Lane, 2015).

## **Obesidad**

### **Definición y epidemiología**

La OMS define la obesidad y el sobrepeso como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Es un problema de salud pública que va en aumento; al comparar los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 con los datos obtenidos del 2018, el porcentaje de hombres mayores de 20 años con obesidad y sobrepeso fue de 69.4 % y 73%, respectivamente (Shamah et al., 2020; Hernández et al., 2016).

La obesidad es el resultado de un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético. A nivel individual, múltiples causas endógenas o ambientales podrían conducir a este desequilibrio. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se debe a una combinación de una ingesta calórica excesiva y a la poca actividad física (Wang & Liao, 2012).

Existen dos métodos para diagnosticar y clasificar a la obesidad: el primer método consiste en la evaluación del índice de masa corporal (IMC). El cual se basa en el peso de la persona en kilogramos ajustado a la altura en m<sup>2</sup>. De esta manera, un IMC entre 25 y 29.9 kg /m<sup>2</sup> define a las personas con sobrepeso y aquellos con un IMC  $\geq$  30 kg/ m<sup>2</sup> se clasifican como obesos. Estos criterios son utilizados para adultos de ambos sexos, indistintamente de la edad (Vecchié et al., 2018). La obesidad está estrechamente asociada con la hipertensión, la aterosclerosis, la enfermedad coronaria, la diabetes y alteraciones reproductivas particularmente en mujeres. En hombres puede afectar a los órganos y tejidos reproductivos, causando una disminución de la calidad del semen y, por lo tanto, en el potencial reproductivo (Ou et al., 2019).

## Tejido adiposo

El tejido adiposo representa el 20-28% de la masa corporal de los individuos sanos; sin embargo, en individuos obesos ese porcentaje puede aumentar hasta un 80% (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020).

El tejido adiposo se clasifica en 3 tipos: blanco, pardo y beige; según su función, coloración, vascularización y estructura. El tejido adiposo blanco presenta una menor vascularización y está formado por células adiposas uniloculares; es decir, contienen una sola vacuola lipídica, en dicha vacuola se almacenan lípidos para su utilización cuando existe una demanda de energía. Del total de lípidos que engloba la vacuola lipídica del adipocito blanco, entre el 90% y 99% son triacilgliceroles. Por su parte, el tejido adiposo pardo se encuentra más vascularizado y con un gran contenido de mitocondrias, las células adiposas que conforman al tejido adiposo pardo son multiloculares o con varias vacuolas lipídicas. Finalmente, el tejido adiposo beige son células adiposas parecidas a los adipocitos pardos, con coloración beige.

Recientemente, se ha determinado que el tejido adiposo no es solo un almacén de energía; también se le ha considerado como un importante órgano endocrino capaz de secretar citocinas (adipocinas). Entre las funciones de estas moléculas, se encuentra la regulación del dimorfismo sexual, la reproducción, el metabolismo de esteroides, el mantenimiento de la temperatura corporal, la homeostasis energética, entre otros (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020).

## La obesidad produce un estado de inflamación

La inflamación asociada a la obesidad se desencadena primero por el exceso de nutrientes y se localiza principalmente en tejidos metabólicos especializados, como el tejido adiposo blanco, que está compuesto principalmente por adipocitos. Los adipocitos secretan una amplia gama de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, denominadas adipocinas. El exceso de nutrientes conduce a la activación de las vías de señalización metabólica, incluida la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), el factor nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) y la proteína quinasa R. Todas estas vías contribuyen al inicio de la inflamación asociada a la obesidad (Kolb et al., 2016).

Se plantea la hipótesis de que, debido a las mayores tasas metabólicas necesarias para mantener los procesos biológicos normales, se produce un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando daño celular (Davidson et al., 2015; Kahn & Brannigan, 2017).

## Efecto de la obesidad en el metabolismo

La obesidad suele asociarse con algunas alteraciones metabólicas como, resistencia a la insulina, hiperglucemia y dislipidemias (Sikaris, 2007). La insulina es una hormona anabólica que regula el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas en el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético, inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. En el músculo esquelético y el tejido adiposo, la insulina regula la captación de la glucosa a través de la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde una reserva intracelular a la membrana plasmática. Además, en el tejido adiposo, la insulina promueve la lipogénesis e inhibe la lipólisis. En el hígado, la insulina también suprime la producción de glucosa y promueve la síntesis de ácidos grasos *de novo*. Así, la

insulina regula la concentración de glucosa y ácidos grasos en circulación (Ortiz-Huidobro et al., 2021). Sin embargo, la obesidad puede provocar resistencia a la insulina, la cual se define como una disminución de la sensibilidad y/o respuesta a la insulina, lo que disminuye la captación de glucosa en los tejidos sensibles a insulina y aumenta la concentración de glucosa en sangre (Rattigan et al., 2007). La resistencia a la insulina puede ser inducida por la grasa depositada intracelularmente y/o por los productos secretados por los adipocitos. Estos productos incluyen citocinas como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), este último tiene un efecto supresor paracrino sobre la secreción de adiponectina, la cual es un potente sensibilizador de la insulina cuya secreción disminuye a medida que se expande la masa de adipocitos (Haslam & James, 2005).

La resistencia a la insulina es la principal fuerza impulsora detrás del desarrollo de dislipidemias. Las altas concentraciones de triacilgliceroles (TG) acompañadas de una disminución de las concentraciones de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High Density Lipoprotein*) son las principales características de la dislipidemia (Vekic et al., 2019). En humanos, los valores normales de colesterol son menores de 200 mg/dL y de triacilgliceroles son menores a 150 mg/dL (DOF, 2012).

## **Infertilidad masculina y obesidad**

### **Infertilidad**

De acuerdo con la OMS (2018), la infertilidad se define como “una enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección”. La prevalencia de la infertilidad se ha estimado en una de cada siete parejas en el mundo occidental y una de cada cuatro parejas en los países en desarrollo. La infertilidad en la pareja puede deberse al factor femenino, masculino o ambos. El factor masculino está involucrado en alrededor del 20-30% de los casos de infertilidad (Vander Borgh & Wyns, 2018).

En el caso de mujeres, la obesidad está asociada con la infertilidad principalmente mediante la desregulación del eje HHG. Por otro lado, en los varones esta asociación no está muy bien caracterizada, llegando a existir incluso resultados

contradictorios en la bibliografía. Sin embargo, existe cada vez más evidencia de que la obesidad masculina puede estar igualmente involucrada en la reducción de la fertilidad y la salud del embrión (Deshpande et al., 2019). Se ha demostrado que los varones obesos frecuentemente muestran una disminución en los niveles séricos de testosterona, aumento en la concentración de estradiol y mayor actividad de la enzima aromatasa (Vigueras-Villaseñor et al., 2011). Además, se ha observado que la obesidad afecta los parámetros espermáticos microscópicos, principalmente la concentración, la motilidad y la morfología (Deshpande et al., 2019).

### Alteraciones endocrinas relacionadas con la obesidad

La obesidad masculina se asocia con hipogonadismo, es decir, con una disminución en la actividad endocrina del testículo. La mayoría de los varones obesos tienen perfiles hormonales alterados; por ejemplo, presentan niveles elevados de estrógeno y leptina. Por otro lado, presentan concentraciones bajas de testosterona, de FSH y de la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) (Liu & Ding, 2017).

En condiciones normales, la LH estimula la producción de testosterona, la cual se une principalmente a la albúmina o a la SHBG. La SHBG regula la biodisponibilidad de la testosterona a sus tejidos diana. Por otro lado, la testosterona circulante libre puede transformarse en el tejido adiposo en estrógeno ( $E_2$ ), en una reacción catalizada por enzima P450 Aromatasa. En los hombres obesos, el exceso de tejido adiposo blanco y la hiperinsulinemia pueden alterar la producción de SHBG en el hígado. Esto tendría como consecuencia un aumento de la cantidad de testosterona libre disponible para la conversión en  $E_2$  dentro del tejido adiposo. Esto a su vez reducirá la secreción de la GnRH en el hipotálamo, ocasionando un aumento en la concentración del  $E_2$  y una disminución de la testosterona y de las gonadotropinas (Raad et al., 2017).

El tejido adiposo produce diversas citocinas implicadas en la regulación de la saciedad y el metabolismo, así como del eje HHG. Entre estas moléculas destaca la leptina (Kahn & Brannigan, 2017). La leptina en condiciones normales estimula la liberación de la GnRH; sin embargo, el exceso (asociado con la obesidad) hace que el eje HHG se vuelva resistente a su acción. Debido a la presencia de receptores de leptina en el tejido testicular y en la membrana plasmática de los espermatozoides,

es probable que los niveles elevados de leptina en el suero afecten directamente a la espermatogénesis provocando un aumento de la apoptosis de las células germinales en los testículos. Adicionalmente, la leptina puede inhibir la acción de las gonadotropinas sobre las células de Leydig, lo que conduce a una disminución de la producción de andrógenos en los testículos (Davidson et al., 2015).

Finalmente, en hombres obesos se ha observado que los niveles de citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, son altas en el suero, el tejido testicular y el líquido seminal. Este par de citocinas inhiben la acción de la LH y participan en la reducción de los niveles de la testosterona (Liu & Ding, 2017).

### Efecto de la obesidad en testículo

Los hombres obesos tienen un aumento de la grasa abdominal inferior, la grasa de los muslos y la grasa escrotal que funcionan como aislantes de los testículos; lo que provoca un aumento de la temperatura testicular, afectando negativamente la síntesis de testosterona (Craig et al., 2017), así como hiperplasia de las células de Leydig (Li et al., 2015).

La disminución en la producción de testosterona afecta la adhesión de las células de Sertoli, provocando la retención y fagocitosis de espermátidas maduras; además, la función epitelial de los túbulos seminíferos se ve afectada. Aunado a esto, se ha observado que la exposición a altos niveles de estrógeno puede causar una reducción en el tamaño de las gónadas y una disminución en la cantidad y la calidad de los espermatozoides (Davidson et al., 2015).

### Efecto de la obesidad sobre los espermatozoides

El impacto de la obesidad en los parámetros espermáticos es complejo y probablemente multifactorial (Craig et al., 2017). La calidad del semen puede verse afectada por el estrés oxidativo y el aumento de la temperatura escrotal. El incremento de las ROS seminales se asocia con alteraciones en la concentración, motilidad y morfología espermática (Kahn & Brannigan, 2017). Además, se ha observado una asociación con un aumento de la frecuencia de fragmentación del ADN y daño en la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Davidson et al., 2015). La obesidad puede aumentar la tasa de apoptosis de las células germinales y

somáticas. Durante la primera ronda de espermatogénesis, se produce una ola masiva de apoptosis en los testículos para mantener un delicado equilibrio entre las células germinales y las células de Sertoli. Algunos estímulos como las ROS, el estrés por calor y diversos agentes farmacológicos podrían ocasionar aumento de la apoptosis de las células germinales (Ghosh & Mukherjee, 2018).

Asimismo, los hombres con un alto IMC podrían presentar una reducción en la calidad de los espermatozoides como consecuencia de los cambios en su membrana celular. La membrana del espermatozoide está compuesta de varios ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico, etc.) e insaturados (oleico, docosahexaenoico, etc.). Los lípidos membranales de los espermatozoides se determinan principalmente durante la espermatogénesis en los testículos y su posterior maduración en el epidídimo. Se ha observado que el incremento en el IMC se correlaciona negativamente con los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) el cual favorece la concentración, la morfología y la motilidad de los espermatozoides, ácido palmítico en los espermatozoides y con una menor capacidad de fecundación. De tal forma, que los cambios en la composición de los ácidos grasos de los espermatozoides podrían ser un mecanismo subyacente a la reducción de la calidad del esperma en hombres con un IMC alto (Liu & Ding, 2017) (**Figura 4**).

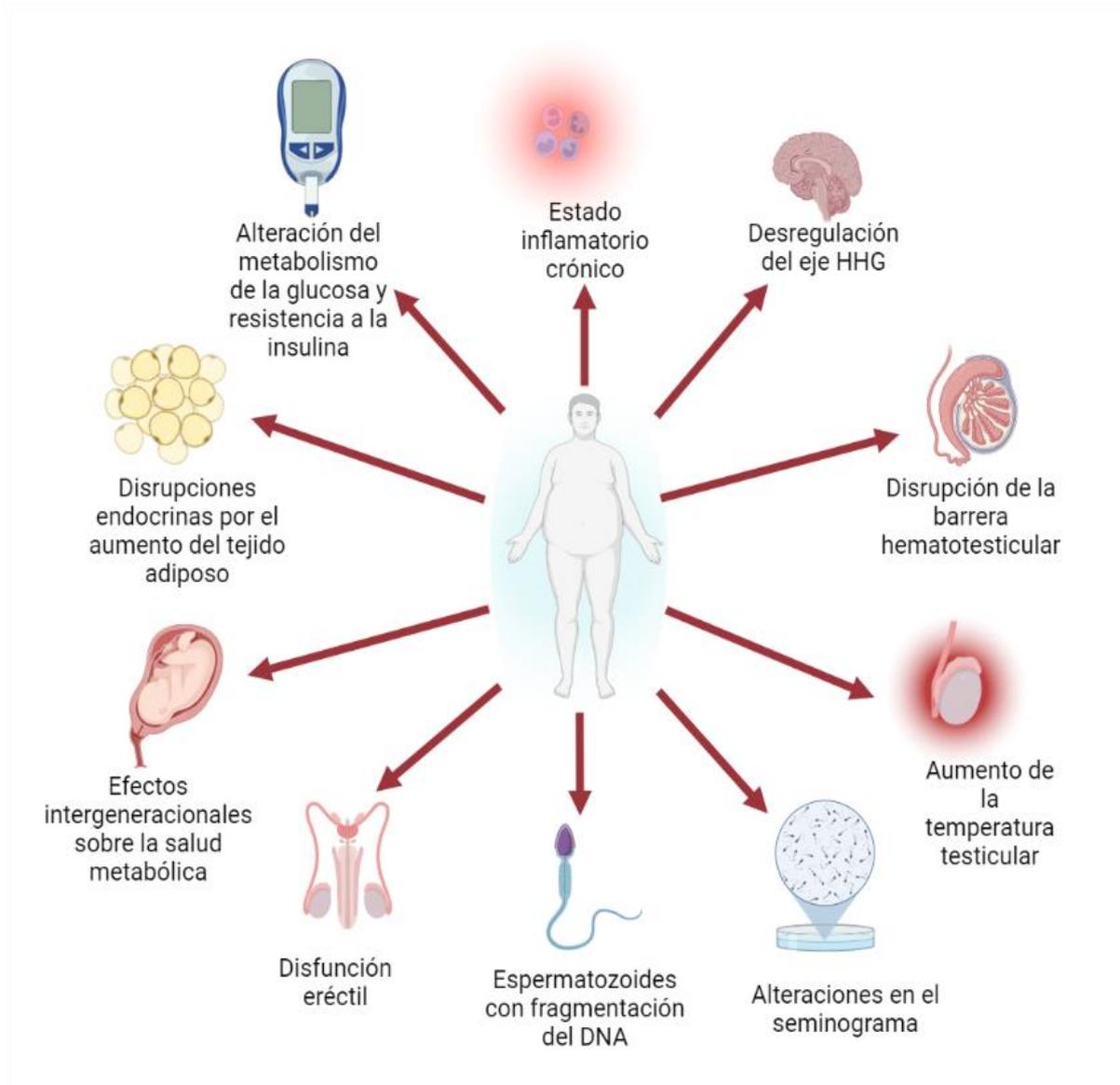


Figura 4. Efectos de la obesidad en el metabolismo y la fertilidad masculina. La obesidad es un trastorno multifactorial que se asocia con diversas complicaciones metabólicas y trastornos reproductivos.

## Antecedentes

Debido a preocupaciones éticas sobre los estudios en seres humanos, los modelos animales se han utilizado ampliamente para estudiar la asociación entre la obesidad y la infertilidad, así como los mecanismos moleculares y celulares involucrados (Assaad et al., 2014). Las ratas se utilizan con frecuencia como animales de laboratorio para la investigación debido a su fácil mantenimiento, corto periodo de gestación y vida útil. Las ratas Wistar se han utilizado para estudiar enfermedades metabólicas, como la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 y la obesidad inducida por una dieta rica en grasas (Garg et al., 2018). Existen estudios que revelan que las dietas

ricas en grasa promueven obesidad, hiperglucemia y resistencia a la insulina, por lo que son utilizadas para generar un modelo de obesidad válido en roedores (Buettner et al., 2006).

Los estudios actuales sobre el efecto de la obesidad en la función reproductiva se han centrado principalmente en hembras, mientras que los efectos en los machos se encuentran poco estudiados (Jia et al., 2018). Se ha caracterizado el deterioro progresivo de la función testicular murina tras la alimentación a largo plazo con una HFD. También, se ha observado en ratones una desorganización estructural y pérdida de la compactación de los túbulos seminíferos; mostrando túbulos seminíferos rotos, aumento de la vacuolización dentro de los túbulos y en los espacios intersticiales que conduciría a la distrofia de células de Leydig (Ghosh & Mukherjee, 2018). Además, se ha observado alteración de la capacidad de fecundación, en la reacción acrosómica, en la calidad de los espermatozoides y una menor motilidad (Davidson et al., 2015).

Cada vez se tiene más evidencia que indica que la obesidad masculina está asociada con un mayor tiempo para lograr un embarazo, menores tasas de embarazo y un aumento en la pérdida del embarazo (Davidson et al., 2015)

## **Planteamiento del problema**

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades crónicas muy frecuentes, las cuales actualmente se consideran un problema de salud pública. La obesidad se ha relacionado con alteraciones en la espermatogénesis que podría ocasionar infertilidad; sin embargo, aún no se han establecido por completo los mecanismos celulares por lo que esto sucede. Por lo tanto, en el presente proyecto se describen los posibles efectos que podría tener la obesidad en un modelo murino inducido por una dieta alta en grasa en el estado metabólico y sobre las alteraciones en la gametogénesis y la morfología del testículo.

## **Pregunta de investigación**

¿Qué efectos tiene la obesidad sobre la regulación de la espermatogénesis y la morfología del testículo?

## **Hipótesis**

Dado que la infertilidad en la población masculina está asociada a la obesidad, entonces al inducir obesidad en un modelo murino con una dieta alta en grasa, provocará cambios morfológicos en las gónadas; así como alteraciones en la progresión meiótica y disminución de la proliferación celular.

## **Objetivos**

### **General**

En un modelo murino, determinar los efectos de la obesidad, inducida por dieta alta en grasas, sobre la proliferación celular y la meiosis durante la gametogénesis masculina.

### **Específicos**

- Establecer y caracterizar en ratas Wistar macho:
  1. Un modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasas (HFD).
  2. El estado metabólico mediante una curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, curva de sensibilidad a la insulina y glucemia en ayuno.
  3. La morfología del testículo.
- Cuantificar la meiosis y la proliferación celular en los túbulos seminíferos, utilizando anticuerpos contra SCP3 y PCNA respectivamente.

## **Materiales y métodos**

### **Animales experimentales**

Se utilizaron ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron alojados en el vivario del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los animales se mantuvieron en las condiciones estipuladas por el Comité

Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina (CICUAL), con el número de registro del proyecto 012-CIC-2019.

Durante todo el estudio las ratas se mantuvieron en condiciones de humedad relativa de 60%, temperatura controlada de 20-24°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Fueron alojadas en cajas de acrílico (32x47x20 cm) (2 ratas por caja) con una cama de olote que fue cambiada 2 veces por semana. Asimismo, el alimento fue cambiado 3 veces por semana. Durante todo el estudio, las ratas tuvieron acceso al agua y al alimento correspondiente *ad libitum*.

## Diseño experimental

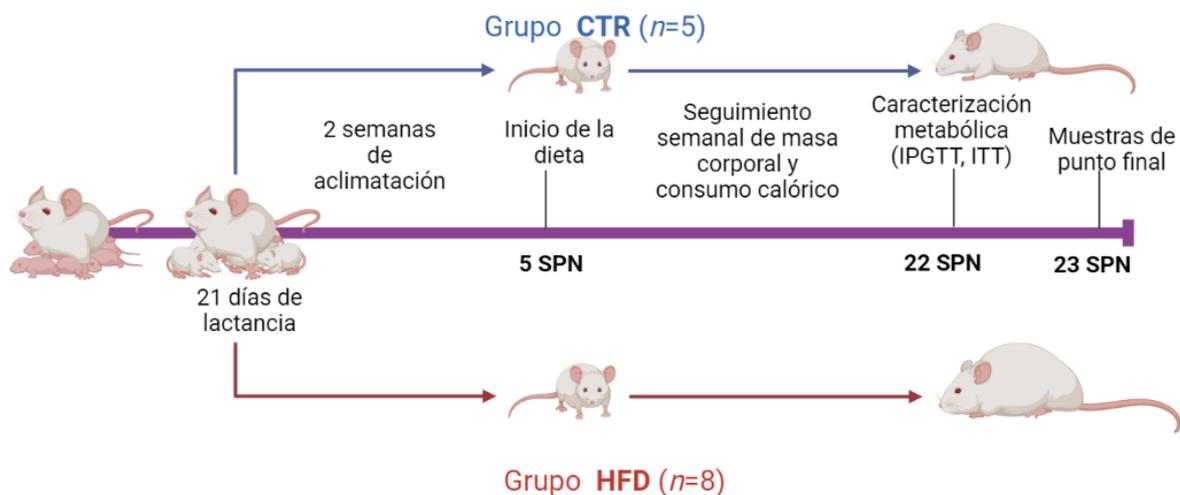
Se utilizaron 13 ratas macho de 21 días de edad (después del destete), las ratas fueron divididas en dos grupos: un grupo experimental ( $n=8$ ) alimentado con una dieta alta en grasas (HFD) y un grupo control ( $n=5$ ) alimentado con una dieta normocalórica (CTR).

El grupo CTR, fue alimentado con una dieta estándar (Laboratory Rodent Diet 5001) con un aporte energético de 4.0 Kcal/g, con una composición calórica de: 58% de carbohidratos, 29% de proteína y 13% de grasa. El grupo HFD fue alimentado con una dieta alta en grasas preparada en el laboratorio de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM. La preparación de la HFD se realizó a partir de la dieta CTR a la que se le adicionaron grasas de origen animal (manteca de cerdo) y de origen vegetal (aceite de oliva). La composición calórica de esta dieta fue de: 20% carbohidratos, 20% proteína y 60% de grasa, con un aporte energético de 5.78 Kcal/g (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Composición calórica y aporte energético de las dietas.

	<b>Composición calórica</b>			<b>Aporte energético (Kcal/g)</b>
	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Grasa (%)</b>	
<b>Dieta estándar (CTR)</b>	58	29	13	4.0
<b>Dieta alta en grasas (HFD)</b>	20	20	60	5.78

Después de 2 semanas de aclimatación al vivario del Departamento de Embriología y Genética, las ratas fueron alimentadas con su respectiva dieta durante 18 semanas. Ambos grupos fueron monitoreados semanalmente para cuantificar la ganancia de masa (g) y el consumo calórico diario (Kcal/día). A las 22 semanas postnatales (SPN) se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y de sensibilidad a la insulina. A la siguiente semana, las ratas fueron sacrificadas para la toma de muestras de punto final. En este punto se determinó la concentración de triacilgliceroles, HDL y colesterol total en plasma; se midió la masa del tejido adiposo, adicionalmente, se realizó el análisis de la concentración de espermatozoides y la viabilidad, el análisis morfométrico de los testículos y la caracterización de la espermatogénesis (**Figura 5**).



**Figura 5. Diseño experimental.** Inicio de la dieta, caracterización metabólica y obtención de muestras de punto final de los grupos CTR y HFD. IPGTT: (prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal). ITT: (prueba de tolerancia a la insulina). SPN: semanas postnatales.

## Masa corporal y consumo calórico

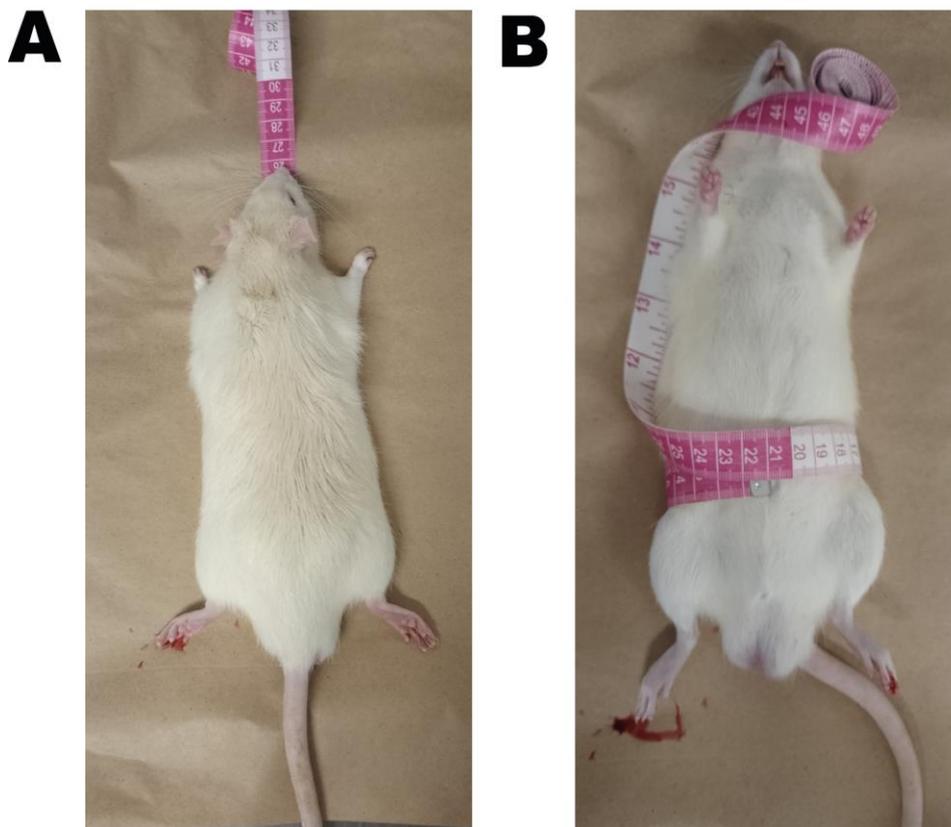
La masa corporal se midió una vez por semana, siempre en el mismo día (jueves), se colocó a la rata en la balanza dentro de un recipiente de plástico previamente tarado. Los datos se expresaron en gramos con una resolución de 0.01g. Para el consumo de comida, se colocó una cantidad fija de alimento (aproximadamente 50 g por animal) en la tapa de la caja, 24 horas después, se pesó el remanente, tanto de la tapa como lo del fondo de la caja. Los valores se expresaron como calorías/animal/en 24 horas.

## Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y prueba de tolerancia a la insulina

A las 22 SPN ambos grupos fueron puestos en un ayuno de 12 horas previo a las pruebas, se determinó la glucosa en plasma en ayuno. Para la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) se aplicó una inyección intraperitoneal de una solución estéril de glucosa al 40% a una dosis de 2 g/kg de masa (de 2.03 a 2.70 mL dependiendo de la masa del animal). Para la prueba de tolerancia a la insulina (ITT) se administró una dosis de insulina humana recombinante de 0.2 UI/kg de masa. Posterior a cada intervención, se realizaron mediciones consecutivas de glucemia mediante una punción en la vena lateral de la cola a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. En el caso de las ratas que presentaron una glucemia menor a 50 mg/dL, los animales fueron retirados del experimento y se les proporcionó alimento (los datos de estos animales fueron excluidos para el análisis). Finalmente, se graficaron las concentraciones de glucosa obtenidas sobre el tiempo y se calculó el área bajo la curva. Los valores de glucosa en sangre fueron determinados con un glucómetro (Accu-Chek), los resultados fueron expresados en mg/dL.

## Determinación de las medidas somatométricas

Bajo anestesia general con pentobarbital sódico intraperitoneal (100 mg/kg), la rata se colocó sobre una cinta métrica (**Figura 6A**) y se midió la distancia de la nariz al ano para obtener la talla, posteriormente, se midió el diámetro abdominal (**Figura 6B**), la cinta métrica rodeó el abdomen a la altura de las crestas ilíacas, los resultados se reportaron en cm, con los datos obtenidos se calculó el IMC (peso (kg)/ [estatura (m)]<sup>2</sup>) y el índice de Lee ( $\sqrt[3]{\text{masa corporal (g)}}$ /longitud hocico-ano (cm)).



**Figura 6. Medición de la talla y el diámetro abdominal.** A) Medición de la talla, desde la nariz hasta la cola del animal. B) medición del diámetro abdominal, alrededor de las crestas iliacas.

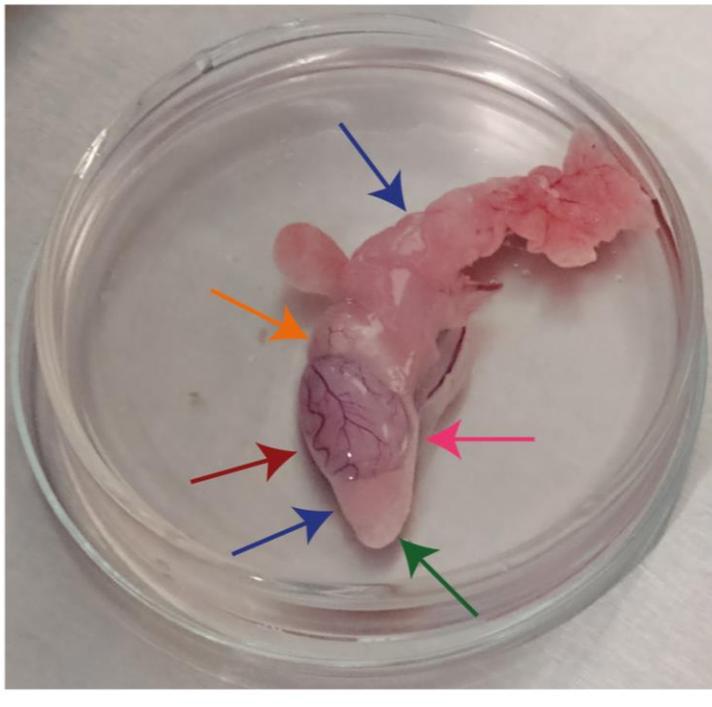
### Toma de muestras de tejido en punto final

Una vez que finalizaron las 23 SPN, bajo anestesia general con pentobarbital sódico intraperitoneal (100 mg/kg) se realizó la disección de las ratas y se extrajeron los testículos, el epidídimo (**Figura 7**) y los depósitos de grasa retroperitoneal, peripancreático, gonadal y subcutáneo. Se reportó la masa de las gónadas y de los depósitos de grasa como un porcentaje de la masa total del individuo. Finalmente, mientras que los animales se encontraban bajo los efectos de la anestesia, se les practicó eutanasia por exanguinación, se extrajeron 5 mL de sangre en tubos con EDTA, a partir de la vena cava inferior. La sangre se centrifugó para recolectar el plasma y se conservó en alícuotas, las cuales fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de triacilgliceroles, colesterol y HDL.

Los testículos extraídos se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en solución buffer de fosfatos salino (PBS) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, pasado el tiempo, se lavaron en agua corriente para retirar el exceso de PFA. Los testículos se colocaron en cassettes para inclusión y se realizaron series de deshidratación con cambios

seriados de alcohol (50, 60, 70, 80, 90, 96, 100%) de 50 minutos cada uno. Después, fueron aclarados con xilol e infiltrados con parafina histológica líquida durante 45 minutos cada uno. Finalmente, los tejidos incluidos se cortaron en 5  $\mu\text{m}$  en el micrótopo.

Una vez que se realizaron los cortes las muestras se colocaron en un horno (60°C) durante 1 minuto, para posteriormente ser teñidas con H&E.



**Figura 7. Extracción de los testículos.** Testículo (flecha roja), tejido adiposo gonadal (flecha azul), cabeza del epidídimo (flecha naranja), cuerpo del epidídimo (flecha rosa), cola del epidídimo (flecha verde).

### Cuantificación de triacilglicerolos, colesterol y HDL en plasma

A partir del plasma obtenido anteriormente, se empleó el sistema Lipidocare (SD Biosensor). Se utilizó una tira reactiva de perfil de lípidos (colesterol total, HDL y triacilglicerolos). Se insertó la tira en el equipo y se colocó una alícuota del plasma, una porción de la muestra fluye a la capa inferior de la tira reactiva y se transfirió a las almohadillas de reacción. Los resultados se expresaron como mg/dL.

### Espermatobioscopia

El epidídimo extraído se lavó con PBS, se le retiró la grasa y se cortó la cola del epidídimo, en 5 mL de PBS se desmenuzó la cabeza para liberar a los

espermatozoides. Se dejaron incubando por 15 minutos a 37 °C, una vez pasado el tiempo de incubación se cargó la cámara de Neubauer con 10 µL y se observó al microscopio (**Figura 8 A**), para la viabilidad los espermatozoides se tiñeron con eosina Y (MCA MEYER, 45380), los espermatozoides vivos se identificaron por la presencia de la integridad de su membrana, lo que impidió que el tinte se absorbiera, en contraste, los espermatozoides muertos se tiñeron (**Figura 8 B**). La concentración de los espermatozoides se calculó con la siguiente fórmula:

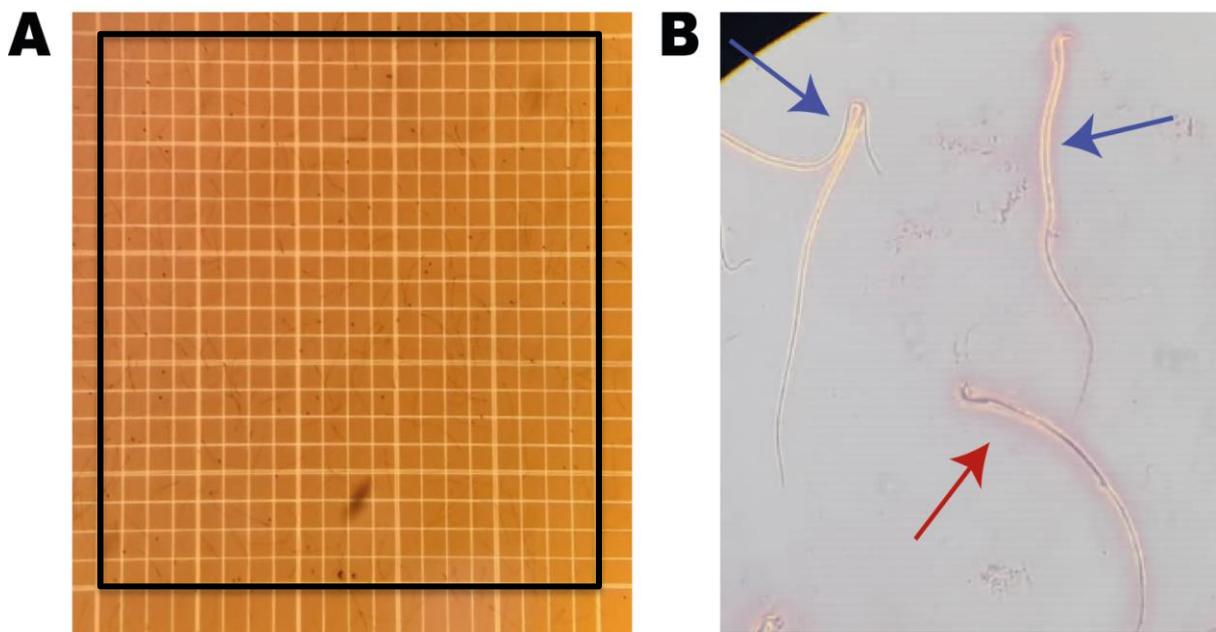
$$\frac{\text{Espermatozoides}}{\text{mL}} = (\text{espermatozoides contados}) (\text{factor de dilución}) (\text{volumen final})$$

Donde:

Factor de dilución= 10

Factor de conversión=10000 mL

Los resultados de la concentración se expresaron en millones/mL, la viabilidad se reportó considerando el 100% de los espermatozoides (vivos/ muertos) y el porcentaje correspondiente a los espermatozoides vivos.



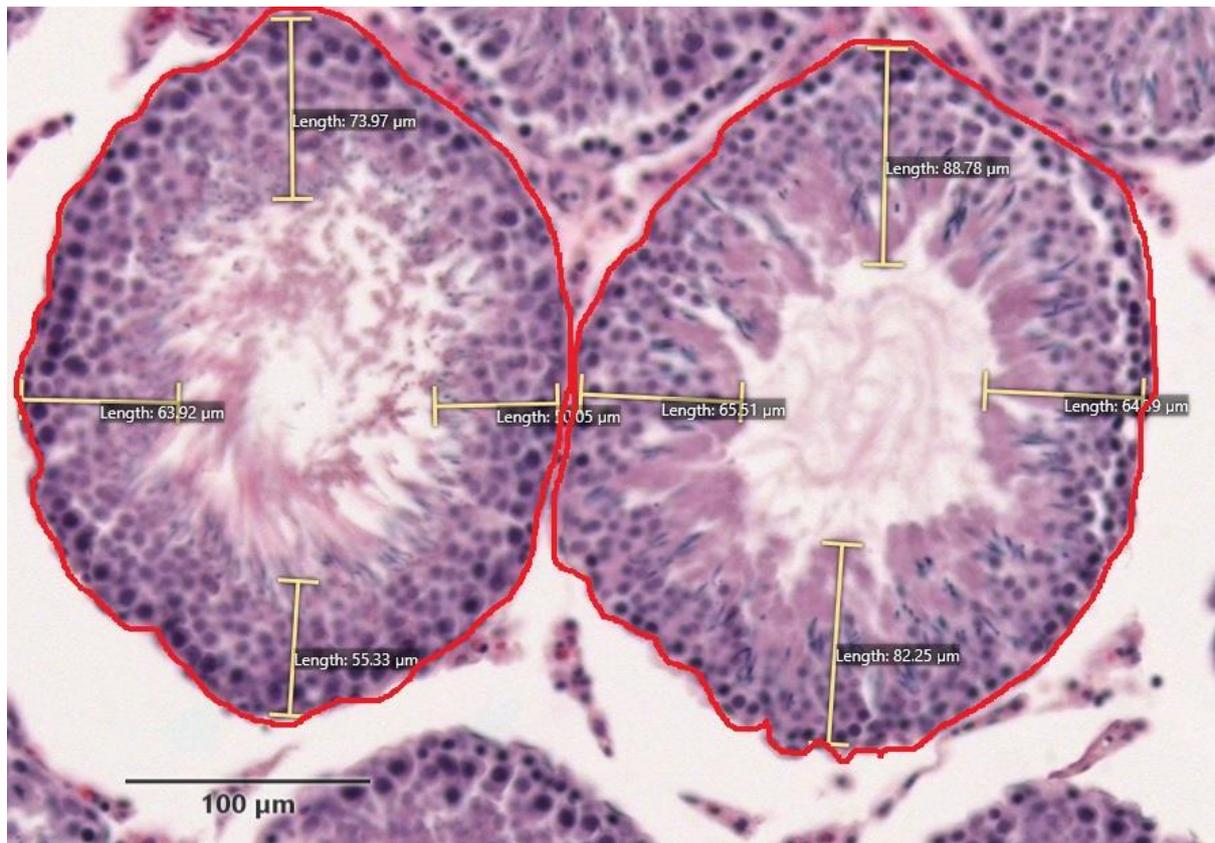
**Figura 8. Concentración y viabilidad espermática.** A) Conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer. B) Viabilidad espermática. Espermatozoide muerto (flecha roja), espermatozoide vivo (flecha azul).

## Análisis morfométrico del testículo

Las secciones de tejido embebidas en parafina se calentaron en una parrilla a 60°C durante 10 minutos; a continuación, se desparafinaron con xilol. Posteriormente se rehidrataron con lavados seriados en alcohol 100% y alcohol 96% de 2 minutos cada uno, se realizó un lavado con agua corriente. Después, se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Gill por 2 minutos, se realizó el viraje con carbonato de litio al 1% y se lavó con agua. La tinción del citoplasma se realizó con eosina amarillenta por 30 segundos. Después de eso, se deshidrató el tejido con lavados seriados con alcohol 96% y alcohol 100%; finalmente se aclaró con xilol.

El análisis morfométrico se realizó sobre fotografías de 2 cortes seriados de cada individuo. Utilizando el programa ViewPoint Ligh de la marca Precipoint, se midió el área de los túbulos seminíferos, así como el grosor del epitelio germinal. Se evaluaron 10 campos no superpuestos por cada corte elegidos de forma aleatoria, en cada campo se tomó un máximo de 2 túbulos, se excluyeron aquellos que tuvieran una apariencia ovoide o alargada, debido a que se infiere que el plano del corte no es transversal.

El área de los túbulos seminíferos se midió delimitando la pared del túbulo, como se muestra en la **Figura 9** (línea roja). Para la medición del grosor del epitelio germinal, se realizaron 4 mediciones por cada túbulo midiendo la distancia desde la lámina basal hasta las espermatidas (**Figura 9**) (líneas amarillas).



**Figura 9. Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos de una rata control.** Criterios para la medición del área del túbulo seminífero (línea roja) y del grosor del epitelio germinal (líneas amarillas).

### Caracterización de la gametogénesis

Las secciones de tejido embebidas en parafina se calentaron a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, las laminillas se colocaron en vasos de coplin de vidrio para realizar cambios seriados de 5 minutos cada uno, como se indica a continuación:

1. Xilol
2. Xilol
3. Alcohol 100%
4. Alcohol 100%
5. Alcohol 96%
6. Alcohol 96%
7. Alcohol 70%
8. Alcohol 50%

Al finalizar, las laminillas fueron enjuagadas con PBS durante 3 minutos y se colocaron en buffer Tris-EDTA (10 mM tris, 1 mM EDTA, 0.05% tween 20) pH 9, para

realizar la recuperación antigénica en una olla de presión a 90°C por 15 minutos. Finalizado el tiempo, las laminillas se colocaron en baño maría con agua para llevarlas a temperatura ambiente y se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Posteriormente, el tejido fue permeabilizado con PBS-T (0.05% de tritón, en PBS). Para el bloqueo de la unión inespecífica de anticuerpos, se adicionaron 150 µl de una solución de 0.5% tween 20, 2% BSA, 2% suero de cabra, 1.2 M glicina en PBS. Las laminillas se dejaron incubando con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda; tiempo durante el cual se cubrieron con una capa de parafilm para evitar que se secaran.

Transcurrido el tiempo, se retiró el exceso de la solución de bloqueo y se agregaron 150 µL de la solución de los anticuerpos primarios; PCNA 1:500 (Rabbit, Abcam, EPR3821) y SCP3 1:150 (mouse, Santa Cruz Biotechnology, sc-74569) en solución de bloqueo (0.5% tween 20, 2% BSA, 2% suero de cabra, 1/500 PCNA, 1/150 SCP3 en PBS 1X); de igual forma, se cubrió con una capa de parafilm y se dejó incubar al anticuerpo primario 24 horas a 4 °C en cámara húmeda. El anticuerpo SCP3 se reveló con Alexa Fluor 488 (anti-Mouse, Jackson ImmunoResearch, 115-545-062), el anticuerpo PCNA se reveló con Alexa Fluor 647 (Anti-Rabbit, Jackson ImmunoResearch, 111-605-144). Como control negativo, solamente se le agregó la solución de bloqueo, sin el anticuerpo primario. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno, se retiró el exceso de PBS-T del último lavado y se agregaron 150 µL de la solución con el anticuerpo secundario (0.5% tritón, 1% suero de cabra), 1/800 Alexa Fluor 488, 1/400 Alexa-Fluor 647 en PBS 1X), el tejido fue cubierto con parafilm y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno. Se realizó la contratinción de núcleos con 150 µL de DAPI (1 µg/mL, en PBS 1X) durante 10 minutos, después de los cuales, se enjuago con PBS 1X. Como medio de montaje, se utilizaron 75 µL de Mowiol, se dejó cubierto de la luz y a temperatura ambiente 1 día para su polimerización. Finalmente, las laminillas se guardaron a 4°C hasta su observación en el microscopio.

Las laminillas se observaron en un microscopio confocal (LSM 880 Zeiss), las imágenes se analizaron con ImageJ. Se analizaron 15 túbulos seminíferos por cada individuo, primero se obtuvo el área del túbulo delimitando su pared, posteriormente

para el índice de proliferación celular se contaron las espermatogonias positivas para el anticuerpo PCNA (canal rojo), el número de espermatogonias obtenidas se dividió entre el área de cada túbulo, de igual forma se realizó lo mismo para la progresión meiótica, pero en este caso las células fueron positivas para el anticuerpo SCP3 (canal verde), para ambos conteos se tomó en cuenta las células positivas al anticuerpo primario y a DAPI (canal Azul).

### Análisis estadístico

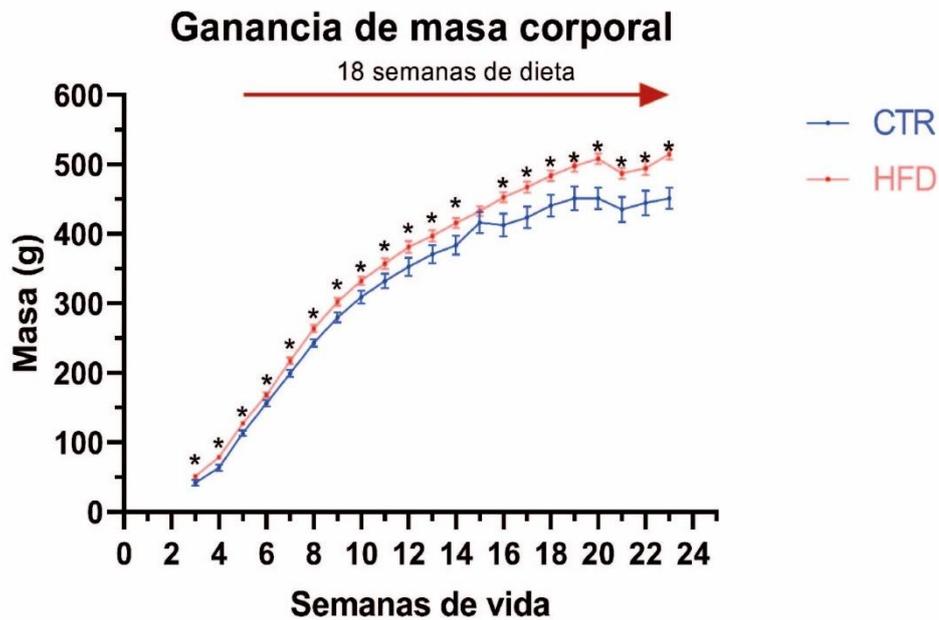
Se determinó si los datos presentaron una distribución normal utilizando como prueba estadística Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. Posteriormente, en caso de presentar una distribución normal se utilizó la prueba t de Student; en caso contrario, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones de los datos fueron estadísticamente diferentes cuando  $p \leq 0.05$ . Todas las pruebas estadísticas se realizaron con GraphPAD. El procesamiento de imágenes se realizó mediante FIJI (Fiji Is Just Imagej) (Schindelin et al., 2012).

## Resultados

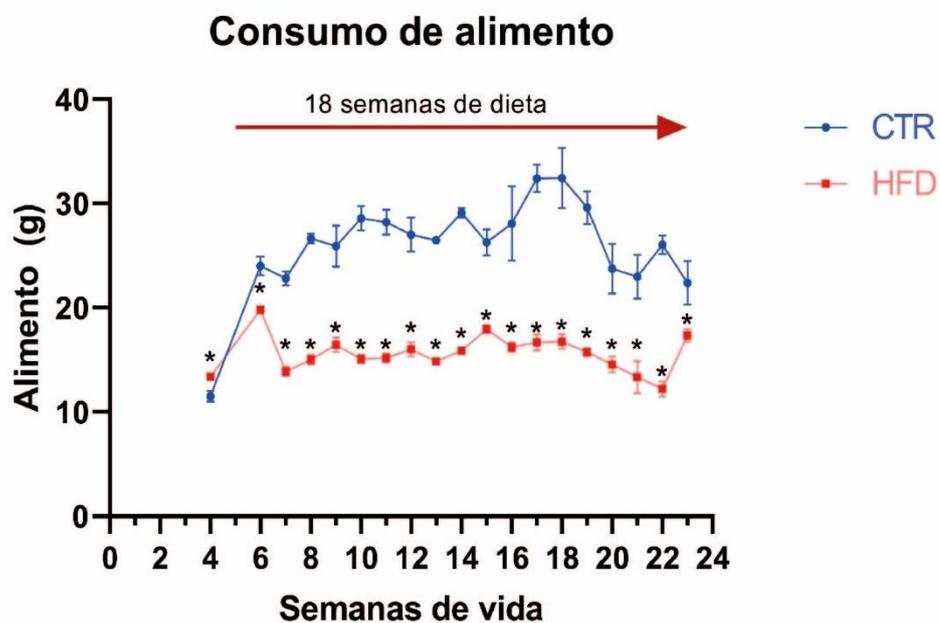
### Ganancia de masa corporal y consumo de alimento

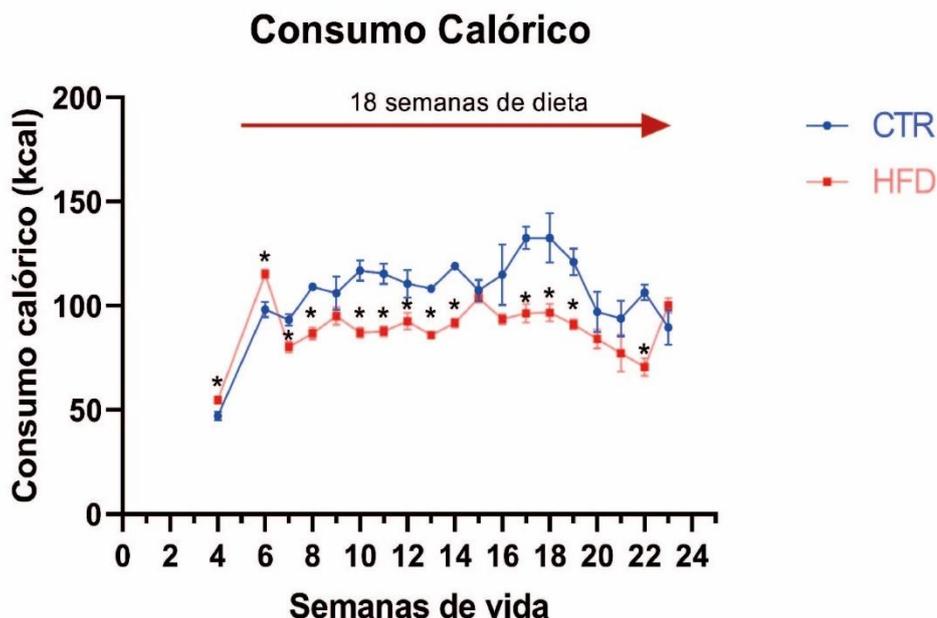
La exposición a la dieta HFD, provocó un aumento de la masa corporal respecto al grupo CTR (**Figura 10A**). Además, las ratas HFD presentaron un menor consumo de alimento (**Figura 10B**) y calórico, en comparación con el grupo CTR (**Figura 10C**).

# A



# B



**C**

**Figura 10. Aumento del peso corporal y consumo de alimento en los grupos CTR y HFD.** A) Curva de crecimiento, se muestra la ganancia de masa corporal en ratas macho alimentadas con HFD durante 18 semanas. B) Cinética de alimento, gramos de alimento consumidos por rata en un día. C) Consumo calórico diario. Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*), \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

### Medidas somatométricas

Se comprobó el efecto de la dieta HFD en el peso y la talla final (23 SPN) de las ratas, por lo que se compararon las medidas somatométricas y se encontró que las ratas del grupo HFD presentaron un aumento de la masa corporal del 13.27 % en relación con el grupo CTR. Además, se mostró una diferencia significativa en los siguientes parámetros; masa final (HFD:  $519.4 \pm 7.9^*$  vs. CTR:  $458.5 \pm 13.9$ ), talla (HFD:  $25.8 \pm 0.3^*$  vs. CTR:  $24.9 \pm 0.4$ ) y perímetro abdominal (HFD:  $22.0^* \pm 0.2$  vs. CTR:  $20.1 \pm 0.6$ ). Sin embargo, tanto el IMC (HFD:  $7.8 \pm 0.1$  vs. CTR:  $7.4 \pm 0.2$ ) como el índice de Lee (HFD:  $0.3 \pm 0.0$  vs. CTR:  $0.3 \pm 0.0$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 2**). \* $p < 0.05$  vs CTR (prueba t de Student).

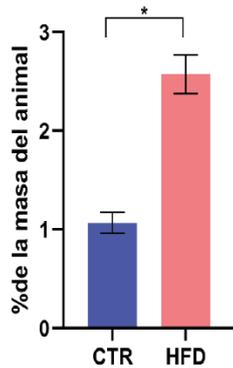
**Tabla 2. Resumen de las medidas somatométricas de los grupos CTR y HFD.** Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM, \*p < 0.05 vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) (n=5) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) (n=8).

Grupo	masa (g)	Talla (cm)	Perímetro abdominal (cm)	IMC	Índice de Lee
CTR	458.5 $\pm$ 13.9	24.9 $\pm$ 0.4	20.1 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.0
HFD	519.4 $\pm$ 7.9*	25.8 $\pm$ 0.3*	22.0 $\pm$ 0.2*	7.8 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0

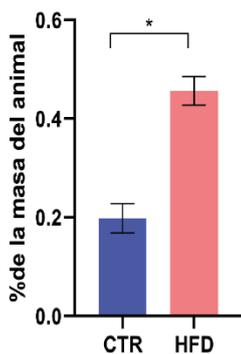
### Tejido adiposo

La obesidad es caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal, por lo que se comparó la masa del tejido adiposo visceral y subcutáneo del grupo HFD contra el grupo CTR. La masa del tejido adiposo visceral (HFD: 5.7 %  $\pm$  0.3\* vs. CTR: 2.5 %  $\pm$  0.2, **Figura 11D**) se compuso de la suma de la masa del tejido retroperitoneal (HFD: 2.6 %  $\pm$  0.2\* vs. CTR: 1.1 %  $\pm$  0.1, **Figura 11A**), tejido peripancreático (HFD: 0.5 %  $\pm$  0.0\* vs. CTR: 0.2 %  $\pm$  0.0, **Figura 11B**) y gonadal (HFD: 2.6 %  $\pm$  0.2\* vs. CTR: 1.2 %  $\pm$  0.1, **Figura 11C**). Se observó un aumento significativo de estos tejidos en el grupo HFD incluyendo el tejido adiposo subcutáneo (HFD: 1.6 %  $\pm$  0.1\* vs. CTR: 1.2 %  $\pm$  0.2, **Figura 11E**). \*p < 0.05 vs. CTR (prueba t de Student).

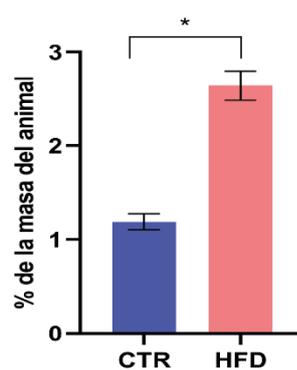
### A Tejido adiposo retroperitoneal



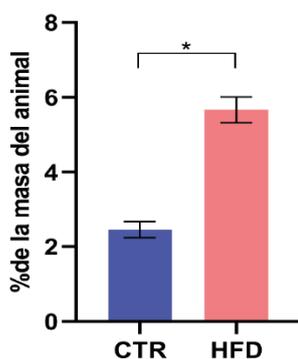
### B Tejido adiposo peripancreático



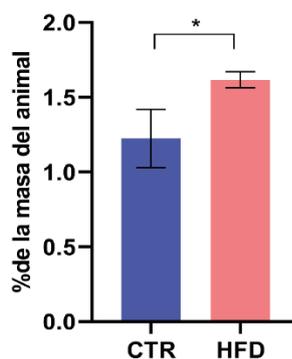
### C Tejido adiposo gonadal



### D Tejido adiposo visceral



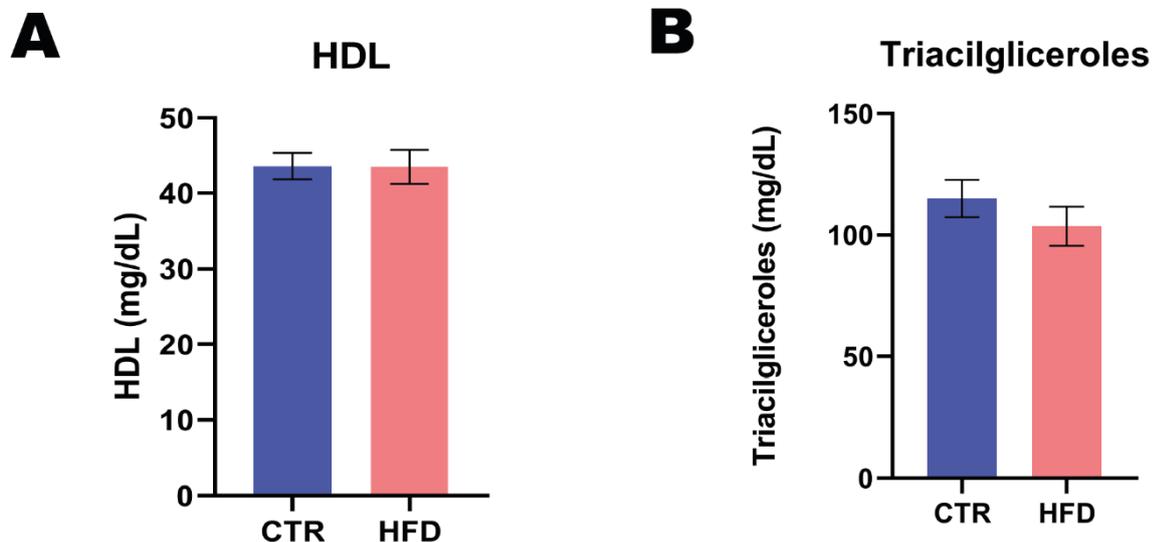
### E Tejido adiposo subcutáneo



**Figura 11. Efecto de la dieta HFD en el tejido visceral y subcutáneo.** A) Tejido adiposo retroperitoneal. B) Tejido adiposo peripancreático. C) Tejido adiposo gonadal. D) Tejido adiposo visceral. E) Tejido adiposo subcutáneo. Los datos que se muestran son el porcentaje de la media aritmética  $\pm$  el porcentaje de la SEM, \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

## Perfil lipídico

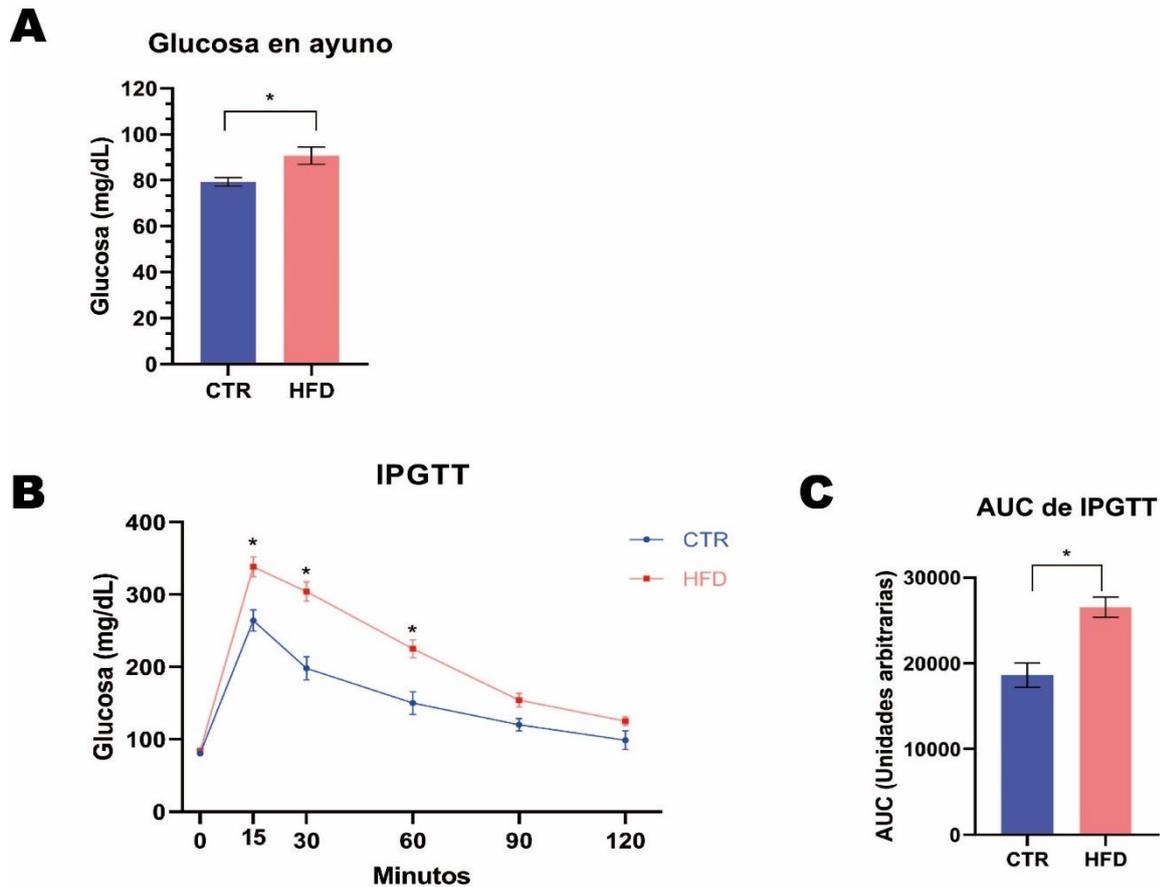
Posteriormente se quiso observar si la obesidad provocó dislipidemia en las ratas, se realizó la cuantificación de HDL (HFD: 43.5 mg/dL  $\pm$  2.3 vs. CTR: 43.6 mg/dL  $\pm$  1.8, **Figura 12A**), también se midió la concentración de triacilgliceroles (HFD: 103.6 mg/dL  $\pm$  8.0 vs. CTR: 115.0 mg/dL  $\pm$  7.7, **Figura 12B**) en ninguno de los dos se encontró diferencia significativa.



**Figura 12. Perfil lipídico de los grupos HFD y CTR.** A) Concentración de HDL en sangre. B) Concentración de Triacilgliceroles en sangre. Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM,  $p > 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

## Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

La obesidad puede ocasionar alteraciones en la glucemia, por lo tanto, se comparó la concentración de glucosa en sangre en las ratas sometidas a ayuno a las 22 SPN y se encontró un aumento de la concentración en el grupo HFD (HFD: 90.7 mg/dL  $\pm$  3.8\* vs. CTR: 79.3 mg/dL  $\pm$  1.9, **Figura 13A**). Posteriormente, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa para detectar cambios patológicos en el metabolismo de la glucosa, el grupo HFD presentó una mayor concentración de glucosa en los tiempos 15 (HFD: 340.1 mg/dL  $\pm$  14.5\* vs. CTR: 264.0 mg/dL  $\pm$  1.91), 30 (HFD: 313.3 mg/dL  $\pm$  16.0\* vs. CTR: 198.0 mg/dL  $\pm$  16.1) y 60 minutos (HFD: 239.1 mg/dL  $\pm$  12.2\* vs. CTR: 150.0 mg/dL  $\pm$  16.0) (**Figura 13B**). Además de mostrar, un aumento en el área bajo la curva (AUC) (HFD: 26553  $\pm$  1161.0\* vs. CTR: 18606.2  $\pm$  1421.5) (**Figura 13C**). \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student).

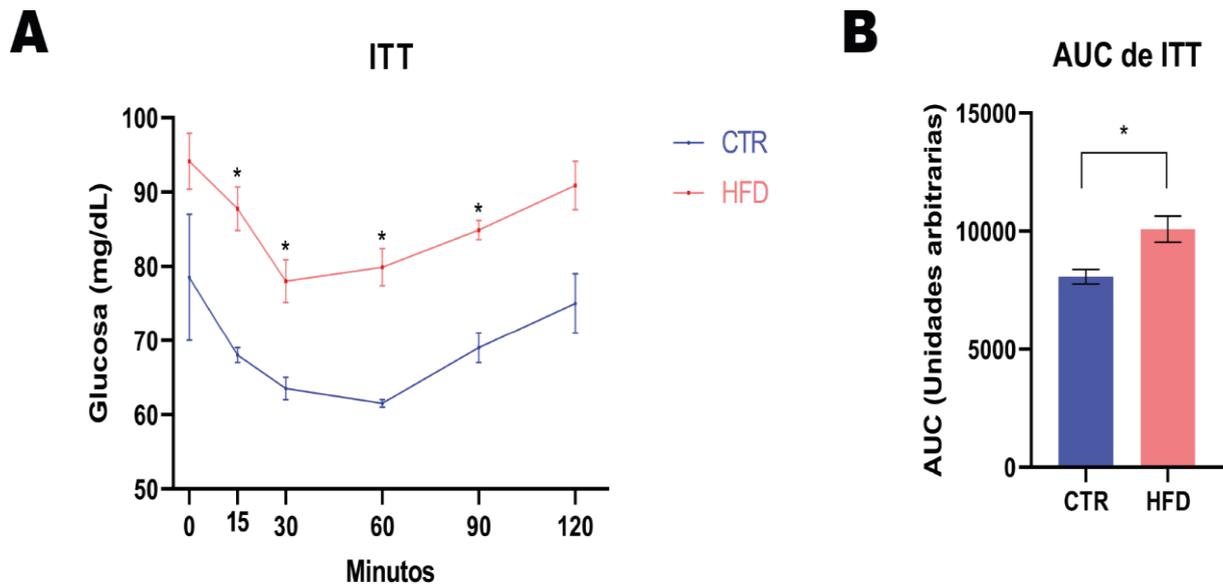


**Figura 13. Efecto de la obesidad en el metabolismo de la glucosa.** A) Concentración de glucosa en sangre en ratas sometidas a ayuno. B) Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. C) Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

### Curva de sensibilidad a la insulina (ITT)

Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa pueden ser ocasionadas por defectos en la secreción, en la acción de la insulina o en ambas. Por lo tanto, se realizó la prueba de sensibilidad a la insulina, para determinar si las alteraciones encontradas en el metabolismo de la glucosa son ocasionadas por la capacidad disminuida de los tejidos para responder a las acciones fisiológicas de la insulina. Los resultados mostraron que hubo una disminución en las concentraciones de glucosa en sangre del grupo HFD en los minutos 15 (HFD: 87.8 mg/dL  $\pm$  3.0\* vs. CTR: 68.0 mg/dL  $\pm$  1.0), 30 (HFD: 78.0 mg/dL  $\pm$  2.9\* vs. CTR: 63.5 mg/dL  $\pm$  1.5), 60 (HFD: 79.9 mg/dL  $\pm$  2.5\* vs. CTR: 61.5 mg/dL  $\pm$  0.5) y 90 (HFD: 84.9 mg/dL  $\pm$  1.3\* vs. CTR: 69.0 mg/dL  $\pm$  2.0) (**Figura 14A**). Para observar un panorama más general se realizó el área bajo la curva, el grupo HFD presentó aumento significativo de la AUC (HFD: 10082.9

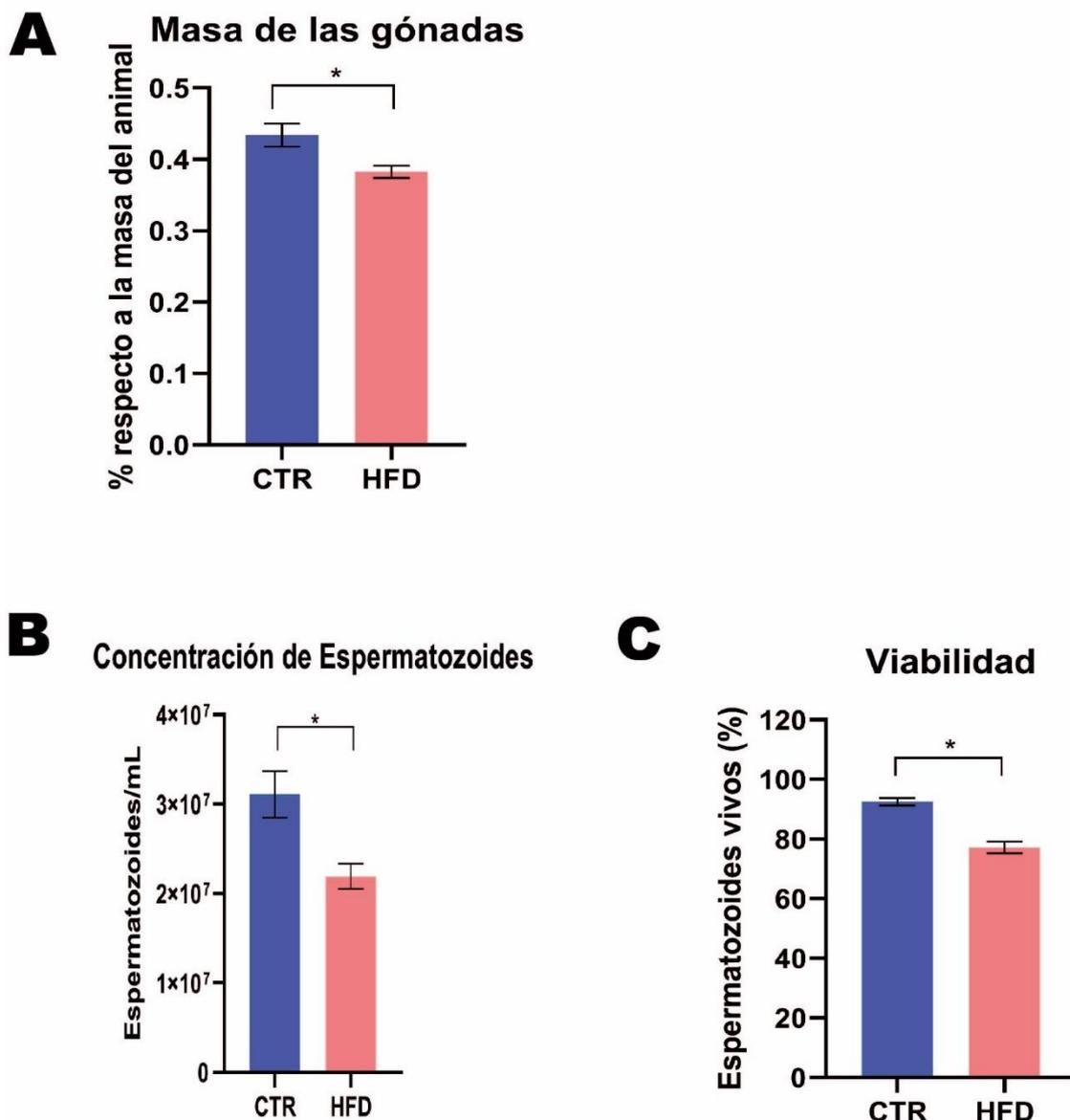
$\pm 194.4^*$  vs. CTR:  $8077.5 \pm 217.5$ , **Figura 14B**). \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student).



**Figura 14. Efecto de la obesidad en la sensibilidad a la insulina.** A) Curva de tolerancia a la insulina. B) Área bajo la curva (AUC) de tolerancia a la insulina. Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=2$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

### Efecto de la obesidad en el espermiograma

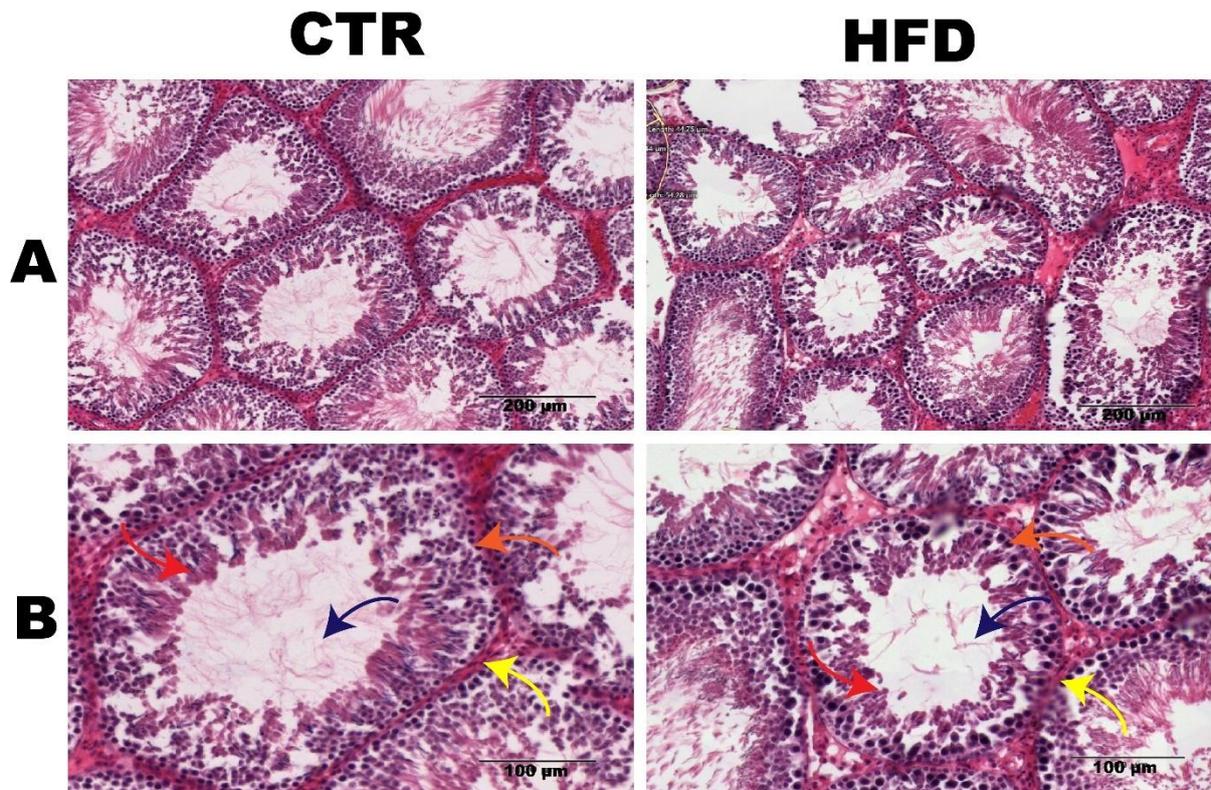
Para investigar si la obesidad no solo ocasionó alteraciones en el metabolismo, sino también cambios en los parámetros relacionados con la fertilidad, se midió el peso gonadal a las 23 SPN. El peso de los testículos en relación con el peso del animal (g de testículo por cada 100 g de peso corporal) del grupo HFD fue menor al del grupo CTR (HFD:  $0.38 \% \pm 0.0^*$  vs CTR:  $0.43 \% \pm 0.0$ , **Figura 15A**). Además, en el grupo HFD la concentración de los espermatozoides (HFD:  $21906250.0 \pm 1434661.4^*$  vs. CTR:  $31080000.0 \pm 2594831.4$ , **Figura 15B**) y el porcentaje de viabilidad se vieron reducidas (HFD:  $77.2 \% \pm 1.9^*$  vs. CTR:  $92.5 \% \pm 1.2$ , **Figura 15C**). \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student).



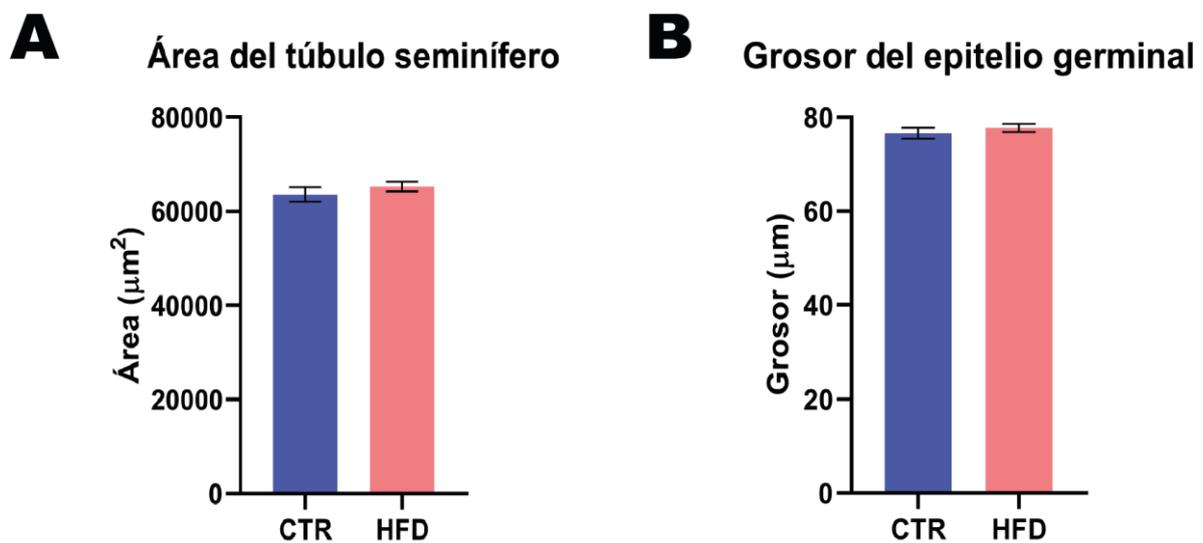
**Figura 15. Efecto de la obesidad en la masa de las gónadas y la calidad del semen.** A) Porcentaje de la masa de las gónadas con relación a la masa corporal. B) Concentración de espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo. C) Porcentaje de espermatozoides vivos con relación al total de espermatozoides/mL. Los datos que se muestran son la media aritmética  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=8$ ).

### Análisis morfométrico del testículo

Además de la masa testicular, también se analizó si existían diferencias entre la morfofisiología de los testículos. Ambos grupos presentaron una citoarquitectura similar (**Figura 16**), el área de los túbulos seminíferos (HFD:  $65264.0 \mu\text{m}^2 \pm 1026.9$  vs CTR:  $63567.0 \mu\text{m}^2 \pm 1563.1$ , **Figura 17**) y el grosor del epitelio germinal (HFD:  $77.8 \mu\text{m} \pm 0.9$  vs CTR:  $76.7 \mu\text{m} \pm 1.2$ , **Figura 17B**) no mostraron diferencias significativas.



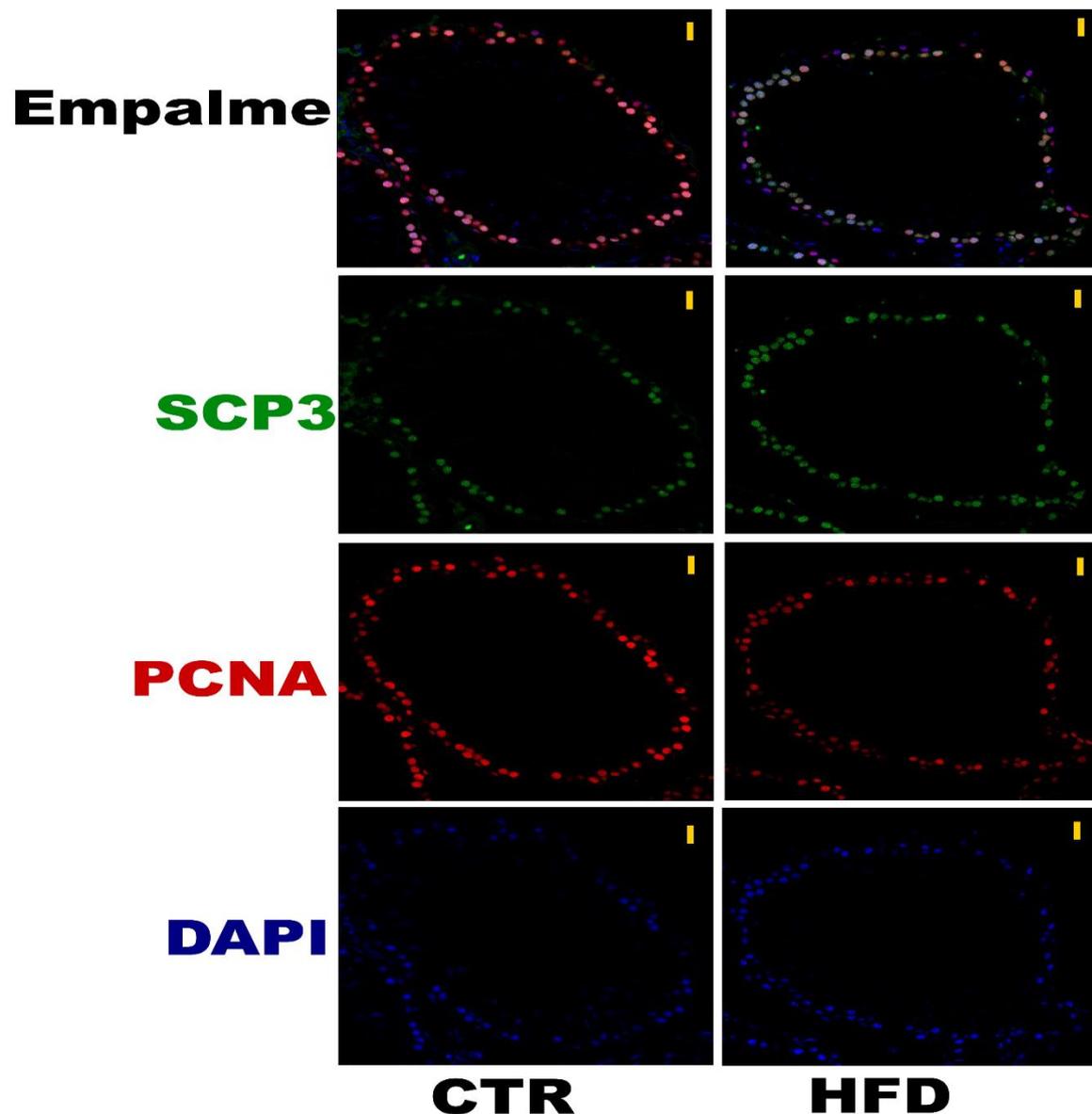
**Figura 16. Fotomicrografías representativas de la tinción con H&E de los túbulos seminíferos.** (A) barra de escala (línea negra) = 200 µm. (B) Barra de escala = 100 µm. Túbulo seminífero (flecha amarilla), espermatogonias (flecha anaranjada), espermatidas (flecha roja), espermatozoides (flecha azul). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=9$ ).



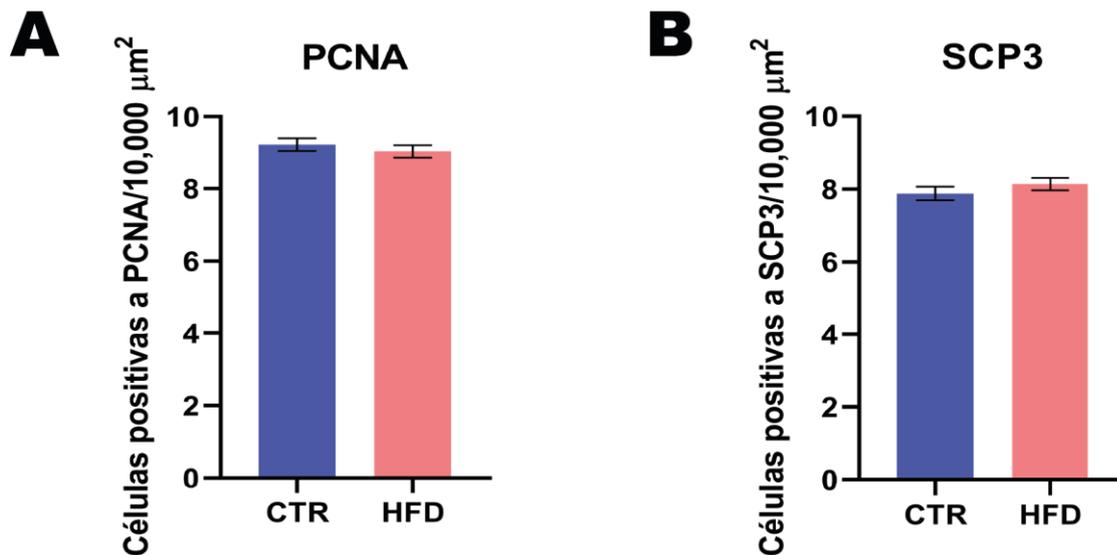
**Figura 17. Análisis de la morfología en testículo.** (A) Área del túbulo seminífero ( $\mu\text{m}^2$ ). (B) grosor del epitelio germinal ( $\mu\text{m}$ ). (A) y (B) Los valores representados son la media aritmética  $\pm$  SEM,  $p > 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=9$ ).

## Caracterización de la gametogénesis

Finalmente, se realizó la caracterización de la gametogénesis, para analizar si la obesidad afecta la expresión de la proteína PCNA (marcador de proliferación) y SCP3 (marcador de meiosis) (**Figura 18**). Los datos demostraron que no existió diferencias significativas en las células positivas a PCNA (HFD:  $9.0 \pm 0.2$  vs CTR:  $9.2 \pm 0.2$ , **Figura 19 A**) ni en SCP3 (HFD:  $8.1 \pm 0.2$  vs CTR:  $7.9 \pm 0.2$ , **Figura 19 B**).



**Figura 18. Fotomicrografías representativas de inmunofluorescencia de los túbulos seminíferos.** Se marcaron las espermatogonias positivas a DAPI (canal azul), PCNA (canal rojo), SCP3 (canal verde), en el empalme están los 3 canales combinados. Barra de escala (línea amarilla) = 20  $\mu$ m. Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=9$ ).



**Figura 19. Análisis de la expresión de PCNA y SCP3 en testículo.** (A) Células positivas a PCNA/10,000  $\mu\text{m}^2$ . (B) Células positivas a SCP3/10,000  $\mu\text{m}^2$ . (A) y (B) Los valores representados son la media aritmética  $\pm$  SEM,  $p > 0.05$  vs. CTR (prueba t de Student). Grupos experimentales: CTR (ratas macho alimentadas con dieta control) ( $n=5$ ) y HFD (ratas macho alimentadas con dieta High Fat Diet) ( $n=9$ ).

## Discusión

### Alteración en las medidas somatométricas y consumo de alimento

La alta ingesta de grasas en la dieta juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad en humanos (Assaad et al. 2014). Para poder estudiar el efecto que esta tiene sobre la fertilidad masculina, se utilizó un modelo HFD en ratas macho Wistar. En el paradigma alimentario, los lípidos proporcionaron el 60% de la energía total; aunque el consumo calórico fue menor, los animales experimentales presentaron aumento en la masa corporal, talla y perímetro abdominal. El aumento excesivo de la masa corporal es consecuencia de la acumulación de grasa en la forma de triacilgliceroles, ya que otras reservas de energía (glucógeno o proteínas) no tienen el potencial del tejido adiposo para exceder los límites de requerimiento (Sikaris 2004).

Las grasas se ingieren principalmente como triacilgliceroles, los cuales son hidrolizados para liberarse en ácidos grasos y monoacilgliceroles en el tracto gastrointestinal para su absorción. Estas gotas de grasa producen micelas, las cuales se adhieren a los enterocitos de la pared intestinal y son absorbidos. Cuando se absorben, se vuelven a ensamblar en triacilgliceroles y se empaquetan junto con el colesterol, y vitaminas en quilomicrones. Los quilomicrones fluyen hacia la circulación a través de los vasos linfáticos. Estos triacilgliceroles se hidrolizan y liberan ácidos grasos y monoacilgliceroles. El transporte de las grasas al interior de las células esta mediado por insulina. Los lípidos son la fuente de energía más lenta, pero a su vez, la forma más eficiente (Malone & Hansen 2019).

### Aumento del tejido adiposo

El aumento en el porcentaje de tejido adiposo en relación con del animal fue consecuencia de un mayor depósito de lípidos (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020). Dicho aumento pudo afectar de forma negativa la fertilidad de las ratas, ya que puede provocar un desequilibrio hormonal con efectos adversos sobre la reproducción (Du Plessis et al., 2010; Fan et al. 2015; Deshpande et al., 2019 ) , aunado al aumento de la temperatura testicular, la cual se asocia con un aumento del daño en el DNA y aumento del estrés oxidativo en los espermatozoides (Davidson et al., 2015).

El exceso de tejido adiposo puede provocar niveles más altos y una mayor actividad de la enzima aromatasa del citocromo P450, responsable de catalizar la conversión de testosterona a estradiol. El aumento de la biodisponibilidad de la aromatasa da como resultado una mayor conversión de andrógenos en estrógenos, lo que produce simultáneamente un aumento de los niveles de estrógeno circulante. Dado que el estrógeno es biológicamente más activo que la testosterona y los niveles anormalmente altos de estrógeno pueden provocar una retroalimentación negativa sobre el eje HPG a través de las neuronas kisspeptina, los altos niveles de estrógeno en los hombres obesos dan como resultado una reducción en la producción de testosterona afectando de forma negativa la espermatogénesis (Davidson et al., 2015).

## Perfil lipídico

El colesterol juega un papel fundamental en la función e integridad celular. Es esencial para la composición de la membrana, la permeabilidad, la fluidez, la endocitosis y la señalización celular. Por lo que su homeostasis es crucial para las funciones celulares óptimas (Maqdasy et al., 2013).

El colesterol asociado a HDL se ha considerado que tiene efectos benéficos para la salud, porque está involucrado en el transporte inverso del colesterol; es decir, lleva a cabo el flujo de colesterol desde la periferia al hígado para la excreción fecal. Sin embargo, en hombres obesos la concentración de HDL se encuentra disminuida (Kjeldsen et al., 2021). Por el contrario, los triacilglicérolos son los lípidos más abundantes en la sangre y sus niveles se encuentran elevados (Padro et al., 2021). Los niveles bajos de HDL y el aumento en triacilglicérolos, se denomina a menudo dislipidemia aterogénica. La cual se caracteriza por la disminución en la eliminación de lipoproteínas ricas en triacilglicérolos, causada por una falta relativa de la lipoproteína lipasa sensible a la insulina.

La lipoproteína lipasa hidroliza los triacilglicérolos de los quilomicrones y las VLDL (del inglés *very-low-density lipoprotein*), lo que provoca la contracción de las partículas y la transferencia de fosfolípidos y apolipoproteínas superficiales a las HDL, lo que aumenta el tamaño de las HDL. Durante la obesidad, se ha demostrado que la respuesta de la actividad de la lipoproteína lipasa a la estimulación de la glucosa se reduce, lo que representa un factor potencial que contribuye a la disminución de HDL en la obesidad (Stadler & Marsche 2020). Además, durante la obesidad hay mayores tasas basales de lipólisis con la liberación subsecuente de ácidos grasos al torrente sanguíneo y disminución de la capacidad de respuesta a la lipólisis estimulada (Edwards & Mohiuddin, 2021). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron alteración en las concentraciones de HDL y triacilglicérolos, una posible explicación a esto, es que las ratas HFD presentaron una mayor cantidad de tejido adiposo. No obstante, el tejido adiposo no era disfuncional aún, ya que el tejido adiposo sano tiene la capacidad de amortiguar la abundancia energética almacenando los lípidos evitando su disponibilidad sistémica excesiva (Bódís & Roden, 2018; Gancheva et al. 2018).

Existe evidencia que el sistema reproductivo masculino depende de la homeostasis del colesterol. El colesterol es el precursor de la síntesis de esteroides. Además, existen datos que resaltan su importancia en la fisiología testicular (Maqdasy et al., 2013).

## Alteración en el metabolismo de la glucosa e insulina

La insulina regula la homeostasis de la glucosa a través del equilibrio entre el almacenamiento y la movilización de las reservas de energía. Además, promueve la síntesis de proteínas y lípidos y el almacenamiento de glucosa como glucógeno en el músculo estriado y el hígado (Ortiz-Huidobro et al., 2021).

Las alteraciones en el metabolismo y la captación de glucosa se comprobaron mediante la determinación de la concentración de glucosa en ayuno, la prueba de tolerancia a la glucosa y la prueba de resistencia a la insulina. Durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal después de la inyección de glucosa, la insulina fue la principal responsable de modular la tasa de aumento y disminución de glucosa plasmática a través de su acción y secreción (Nolfe et al., 2012). Sin embargo, el aumento de las concentraciones de glucosa junto con el aumento en la glucosa en ayuno del grupo HFD, sugieren una alteración en el metabolismo de la glucosa provocado por la resistencia a la insulina. Por lo tanto, se realizó la prueba de sensibilidad a la insulina, en la cual el grado en que la insulina disminuyó las concentraciones de glucosa en el grupo HFD fue menor al del grupo control. Como análisis complementario se sugiere la medición de insulina en ayuno, dado que en la resistencia a la insulina puede existir hiperinsulinemia compensatoria como un intento de contrarrestar la disminución en la capacidad de eliminación de glucosa (Nagy & Einwallner, 2018).

La resistencia a la insulina puede ser consecuencia de alteraciones en la señalización de esta hormona, debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de proteínas efectoras localizadas río abajo del mismo (Gutiérrez et al., 2017). Además, el aumento en el tejido adiposo puede contribuir con la resistencia a la insulina, ya que se ha observado que a medida que aumentan las reservas de grasa y aumenta el tamaño de los adipocitos, las células

parecen responder menos a la presencia de insulina para el transporte de glucosa (Malone & Hansen, 2019).

Además de las acciones metabólicas de la insulina sobre la homeostasis energética también la resistencia a la insulina puede afectar la reproducción masculina al disminuir los niveles de la síntesis de la SHBG, aumentando indirectamente la cantidad de estrógeno disponible (Maqdasy et al., 2013). Así mismo, los niveles altos de insulina plasmática e insulina en plasma seminal en hombres obesos, puede contribuir a la disfunción mitocondrial espermática a través de alteraciones en la entrada de colesterol durante la capacitación y la desregulación de la homeostasis energética de los espermatozoides (McPherson & Lane, 2015).

### Efecto de la dieta en la espermatogénesis

El aumento de la tasa de obesidad ha sido paralelo a los informes de tasas crecientes de mala calidad del esperma e infertilidad masculina (Craig et al., 2017). Sin embargo, existe cierta controversia en estos resultados, posiblemente se deban a las limitaciones relacionadas con los estudios en humanos. Por ejemplo; esta sugerencia está basada en grupos seleccionados de hombres reclutados en clínicas de fertilidad, donde las cohortes de pacientes suelen estar sesgadas hacia hombres subfértiles (Carlsen et al., 1992). Además, estos estudios pueden confundirse con factores del estilo de vida, como el tabaquismo, el consumo de alcohol, el uso de drogas, así como con cofactores como el síndrome metabólico, los cuales pueden afectar la función de los espermatozoides (McPherson & Lane, 2015). Por consiguiente, no hay una explicación clara del porqué; sin embargo, se sugiere que existe una relación inversa entre el aumento del IMC y la fertilidad (MacDonald et al., 2010; Teerds et al., 2011; Aggerholm et al., 2008; Ramlau-Hansen et al., 2010)

Nuestros resultados mostraron que no hubo alteraciones en la proliferación (células positivas a PCNA) y en la progresión meiótica (células positivas a SCP3) de las células germinales, ni en la morfología de los túbulos seminíferos. Sin embargo, se observó una disminución en el tamaño de los testículos y en la concentración y viabilidad de los espermatozoides, por lo que se sugiere que la obesidad tuvo un efecto negativo en la fertilidad. Debido a que la obesidad puede afectar la fertilidad a través de numerosos mecanismos, que incluyen perturbaciones hormonales, niveles

elevados de mediadores inflamatorios, ROS y aumento del calor testicular, que acumulativamente puede tener efectos perjudiciales en la espermatogénesis (Kahn & Brannigan, 2017). Una observación interesante es que la espermatogénesis no está marcadamente alterada en la mayoría de los hombres obesos, aunque puede estarlo en aquellos con obesidad extrema (Pasquali, 2006). En ese sentido el porcentaje de aumento de peso conseguido en nuestro modelo fue solamente del 13.27% en comparación con Verderame et al. (2018) que observó un aumento de peso del 53% junto con alteraciones en las células germinales.

La calidad de los espermatozoides se vio afectada, presentando una menor concentración y viabilidad. La obesidad se considera un estado proinflamatorio crónico con producción de adipocinas y citocinas por parte de los adipocitos que resultan en un aumento de la inflamación sistémica (Kahn & Brannigan, 2017). En el estado de obesidad existe un aumento de las ROS, los espermatozoides son muy susceptibles a los ROS, ya que la mayoría de sus mecanismos de defensa antioxidante se pierden durante el desprendimiento del citoplasma en las etapas finales de la espermiogénesis (McPherson & Lane, 2015). Los niveles elevados de ROS seminales se asocian con una disminución de la concentración, la motilidad y morfología de los espermatozoides y una mayor frecuencia de fragmentación del DNA (Kahn & Brannigan, 2017). Resultados similares referentes a la concentración y viabilidad de los espermatozoides fueron reportados por (Vigueras-Villaseñor et al., 2011) al no encontrar alteraciones en la morfofisiología de los túbulos seminíferos, observaron un aumento de apoptosis mediado por ROS en la cabeza del epidídimo de las ratas. Esto sugiere que las alteraciones que se producen en el epidídimo de los animales HFD podrían ser importantes, debido a que la integridad morfológica y funcional del epidídimo depende de los andrógenos.

En respuesta a la testosterona, las células epiteliales del epidídimo producen diferentes proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y fosfolípidos; componentes del líquido del epidídimo necesarios para la maduración y supervivencia de los espermatozoides. Por lo tanto, la disminución de andrógenos consecuencia de la obesidad puede afectar la integridad y funcionalidad del epidídimo. En ese sentido, para próximos estudios se propone que se determine si existen diferencias entre los pesos del epidídimo respecto al peso total del animal. Además, sería conveniente el

análisis de la morfología del epidídimo para evaluar la integridad del epitelio y la presencia de células degenerativas en la luz tubular, junto con la determinación de la apoptosis. Del mismo modo, la integridad del testículo y los túbulos seminíferos también puede verse afectada si hay disminución en las concentraciones de andrógenos. Aunque en nuestros resultados no se observaron cambios en el grosor ni en la morfofisiología de los tubos seminíferos, posiblemente podría deberse a que las alteraciones en los niveles de testosterona no fueron lo suficientemente altas como para alterar los niveles óptimos de testosterona intratesticular y afectar la estructura del túbulo seminífero, sin embargo, se necesitaría realizar la medición de la concentración de testosterona para futuros estudios.

Existen reportes de la disminución del grosor del epitelio germinal así como en la morfología y organización de los túbulos seminíferos (Zhao et al. 2017; Verderame et al. 2018; Migliaccio et al. 2019; Suleiman et al. 2020; Moradi-Ozarlou et al. 2021). Además, en concordancia con nuestros resultados, se ha reportado la disminución en los pesos testiculares en animales obesos (Deshpande et al. 2019; Anon n.d.; Suleiman et al. 2020; Moradi-Ozarlou et al. 2021;). Es probable que, el aumento del tejido adiposo gonadal contribuyera a la disminución de la viabilidad y concentración de los espermatozoides, ya que el proceso de espermatogénesis es muy sensible al calor y el aumento del calor testicular se llega a asociar con una motilidad reducida de los espermatozoides, un aumento del daño del DNA de los espermatozoides y un aumento del estrés oxidativo de los espermatozoides, como consecuencia del aumento de la adiposidad escrotal (Palmer et al., 2012).

Existen diferentes resultados del efecto de la dieta HFD sobre la expresión de PCNA. El PCNA es una proteína esencial para múltiples vías del ciclo celular, incluida la replicación y reparación del DNA (Alkafafy et al., 2021) Entre los resultados reportados (Verderame et al., 2018; Migliaccio et al., 2019) encontraron que después de 4 semanas de dieta HFD la expresión de PCNA aumento en comparación con los grupos CTR, este aumento puede ser una respuesta a las condiciones de estrés oxidativo y endocrino provocados por la obesidad, además de contrarrestar el efecto pro-apoptótico de los ácidos grasos y proteger la celularidad testicular al mantener su contenido de nucleótidos y proteínas. En adición, Verderame et al., (2018) encontró no solo un aumento de PCNA en las espermatogonias, sino que también en los

espermatoцитos primarios. Por lo que la presencia de PCNA en las células germinales pre meióticas que no proliferan se podría atribuir al papel de PCNA en la reparación del DNA posterior a la replicación. Finalmente, el mismo grupo demostró que un periodo moderadamente corto de ingesta excesiva de grasas saturadas interfiere con la progresión normal de la espermatogénesis al alterar la producción de estrógeno y la actividad de la enzima aromatasa. Por el contrario existe evidencia que señala que después de un periodo de tiempo de 8 a 12 semanas de dieta HFD, la expresión de PCNA disminuyó, lo que indica una disminución en la proliferación de células germinales testiculares y, en última instancia, una disminución en la espermatogénesis ( Zhao et al. 2017); Suleiman et al. 2020; Anon n.d.; Moradi-Ozarlou et al. 2021) .

Moradi-Ozarlou et al. (2021) encontraron que la obesidad disminuye el potencial de esteroidogenesis de las células de Leydig, el nivel de testosterona sérica en paralelo con la supresión de la capacidad antioxidante total testicular (TAC) resultando en daños masivos en el DNA y el RNA. Cabe señalar que la síntesis de proteínas básicamente depende de la transcripción de ARNm y la estabilidad frente a los radicales libres. Por lo tanto, sugirieron que la disminución del TAC testicular (lo que indica un aumento del daño oxidativo) en el grupo obeso, podría disminuir la expresión y/o estabilidad del ARNm y, en consecuencia, suprimir la expresión compensatoria de PCNA.

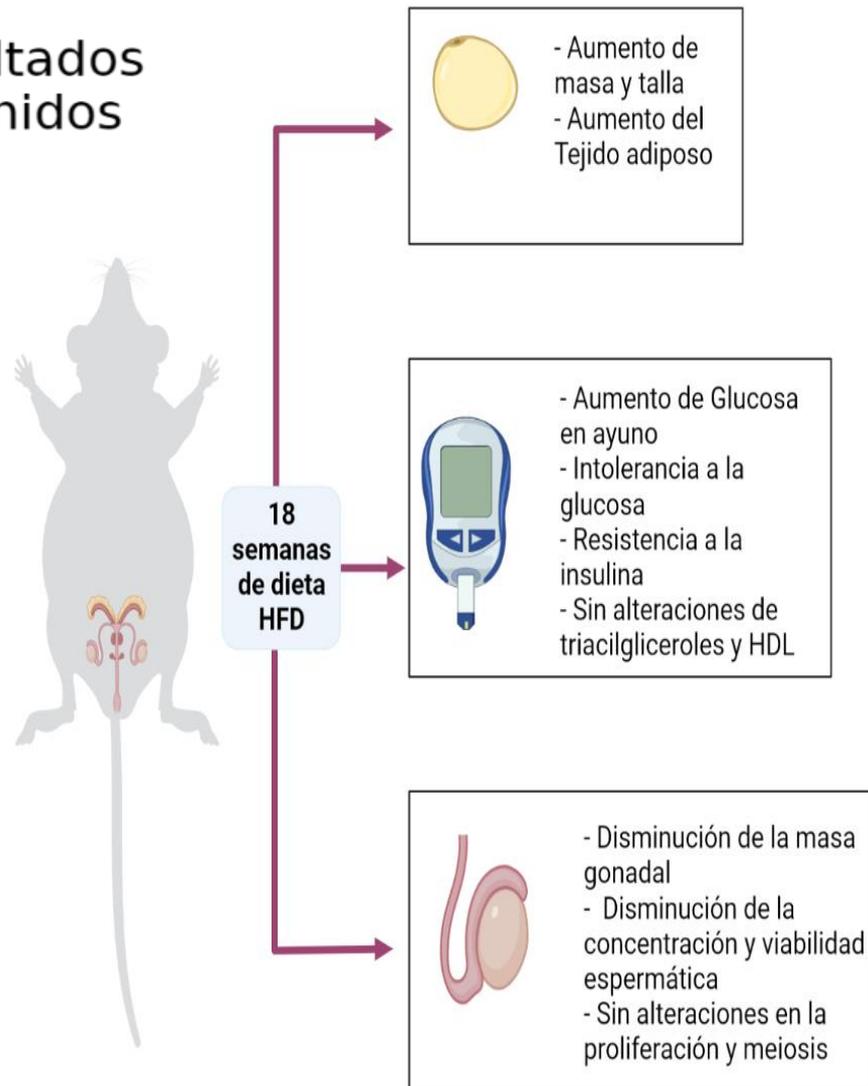
Además del estudio de la proliferación, también se estudió el efecto de la meiosis a través de la expresión del gen SCP3. La meiosis es un proceso de división celular exclusivo de las células germinales, durante la meiosis los cromosomas homólogos se emparejan y recombinan; en este proceso participa el complejo sinaptonémico (SC). En los mamíferos se han caracterizado tres proteínas del complejo sinaptonémico 1, 2 y 3 (SCP1, SCP2 y SCP3) (Yuan et al., 2000). SCP3 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de las cromátidas hermanas juntas o en la segregación, la condensación cromosómica, la reparación de roturas de doble cadena del DNA y la unión de cromosomas homólogos (Ding et al., 2020). La importancia de la expresión del gen SCP3 en la fertilidad masculina fue demostrado por Yuan et al. (2000) en ratones y por Aarabi et al. (2006) en humanos. La ausencia de SCP3 en ratones puede provocar la muerte apoptótica de los

espermatozoides y en humanos es responsable de una proporción de casos de azoospermia no obstructiva. Sin embargo, no hay muchos estudios sobre el efecto de la obesidad ni de una dieta HFD en SCP3. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de SCP3, nuestros resultados coinciden con Deshpande et al. (2019), quienes reportaron que después de 16 semanas de dieta no encontraron cambios en la expresión de SCP3 (**Figura 20**).

## Conclusiones

- Se logró establecer con éxito un modelo de obesidad mediante una dieta alta en grasas (HFD). Al final del tratamiento, las ratas presentaron aumento de peso, talla y perímetro abdominal; además de alteraciones en el metabolismo de la glucosa consecuencia de la resistencia a la insulina.
- La dieta HFD en el modelo murino, no intervino en los mecanismos de proliferación (células positivas a PCNA) y progresión meiótica (células positivas a SCP3) en los túbulos seminíferos.
- La exposición a la dieta HFD afectó la concentración y viabilidad de los espermatozoides.
- La obesidad inhibió la espermatogénesis. Sin embargo, se necesitaría el análisis de más procesos celulares y moleculares, para establecer los mecanismos involucrados.

## Resultados obtenidos



**Figura 20. Resultados obtenidos.** Resumen de los resultados obtenidos en ratas macho Wistar después de 18 semanas de dieta HFD.

## Apéndice

### Preparación de 100 g de dieta HFD

1. En un molino manual se trituraron los pellets de chow (Laboratory Rodent Diet 5001).
2. El chow molido se terminó de pulverizar en un procesador de alimentos y se tamizó.
3. Se pesaron 49.5 g del chow molido y se mezclaron con 15 g de caseína.
4. Se mezclaron 17.75 g de manteca de cerdo con 17.75 g de aceite de oliva.
5. Se incorporó la mezcla de chow molido y la caseína con la mezcla de manteca de cerdo y aceite de oliva hasta formar una pasta homogénea.
6. El alimento se almacenó en envases etiquetados a 4°C hasta su uso.

### Protocolo de tinción para hematoxilina de Gill y eosina amarillenta

1. Las laminillas con el tejido embebidas en parafina se calentaron en una parrilla a 60°C por 10 minutos.
2. Se desparafinaron los tejidos con los siguientes lavados:
  - Xilol por 5 minutos
  - Xilol por 2 minutos
3. Se hidrataron los tejidos como se indica a continuación:
  - Alcohol 100% por 2 minutos
  - Alcohol 100% por 2 minutos
  - Alcohol 96% por 2 minutos
  - Alcohol 96% por 2 minutos
  - Agua
4. Se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Gill por 2 minutos.
5. El exceso de hematoxilina fue removido con agua.
6. Se viraron las laminillas con carbonato de litio 1% por 10 segundos.
7. Se lavaron las laminillas con agua para retirar el exceso de Carbonato.

8. Se tiñó el citoplasma con eosina amarillenta por 30 segundos.
9. Se deshidrataron los tejidos con los siguientes lavados:
  - Alcohol 96% 2 minutos
  - Alcohol 96% por 2 minutos
  - Alcohol 100% por 2 minutos
  - Alcohol 100% por 2 minutos
10. Para el aclaramiento se realizaron 2 lavados con xilol de 2 minutos cada uno.

### Viabilidad espermática

1. Se mezclaron 10  $\mu$ L de eosina Y al 10% con 10  $\mu$ L de la solución de espermatozoides y PBS 1X incubada por 15 minutos a 37 °C.
2. La mezcla se dejó reposar 15 segundos.
3. Se cargaron 20  $\mu$ L de la solución y se colocaron en un portaobjetos y realizó un frotis sobre un portaobjetos limpio.
4. Se dejó secar y se montó con resina.

### Protocolo de inmunofluorescencia

1. Las laminillas con el tejido embebidas en parafina se calentaron en una parrilla a 60°C por 10 minutos.
2. Las laminillas se colocaron en vasos coplin y se realizaron los siguientes cambios seriados de 5 minutos cada uno:
  - Xilol
  - Alcohol 100%
  - Alcohol 100%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol 96%
  - Alcohol 70%
  - Alcohol 50%
3. Las laminillas se enjuagaron con PBS 1X durante 3 minutos y se colocaron en buffer Tris-EDTA (10 mM tris, 1 mM EDTA, 0.05% tween 20) pH 9.

4. Se colocaron las laminillas en una olla de presión a 90°C por 15 minutos.
5. Se pusieron en baño maría con agua hasta que estuvieran a temperatura ambiente.
6. Se realizó un lavado con PBS 1X por 5 minutos.
7. Se permeabilizó con PBS-T (0.05% de tritón, en PBS 1X).
8. Se adicionaron 150 µL de una solución de 0.5% tween 20, 2% BSA, 2% suero de cabra, 1.2 M glicina en PBS 1X.
9. Las laminillas se dejaron incubando 1 hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda, cubiertas con Parafilm.
10. Se retiró el exceso de la solución de bloqueo y se agregaron 150 µL de la solución de los anticuerpos primarios; PCNA 1:150 y SCP3 1:150 en solución de bloqueo (0.5% tween 20, 2% BSA, 2% suero de cabra, 1/500 PCNA, 1/150 SCP3 en PBS 1X), al control negativo solo se le agrego la solución de bloqueo, se cubrieron con Parafilm y se dejaron incubando 24 horas a 4 °C en la cámara húmeda.
11. Se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno.
12. Se agregaron 150 µL de la solución con el anticuerpo secundario (0.5% tritón, 1% suero de cabra), 1/800 Alexa Fluor 488, 1/400 Alexa-Fluor 647 en PBS 1X), se cubrió con Parafilm y se incubo 1 hora a temperatura ambiente.
13. Se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno.
14. Se realizó la contratinción de núcleos con 150 µm de DAPI (1 ug/mL, en PBS 1X) durante 10 minutos.
15. Se enjuagaron las laminillas con PBS 1X.
16. Para el montaje se utilizaron 75 µm de Mowiol, se dejaron cubiertos de la luz y a temperatura ambiente durante 1 día.
17. Las laminillas se guardaron a 4°C hasta su observación en el microscopio.

### Preparación de MOWIOL

1. Se mezclaron 2.4 g de Mowiol con 6 gr de glicerol por una hora a temperatura ambiente.
2. Se adicionaron 6 mL de agua desionizada y se mezclaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

3. Se adicionaron 12 mL de TRIS 0.2 M (pH de 8.5).
4. La solución fue calentada a 50°C durante 15 minutos.
5. La solución fue centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos.
6. Finalmente, se hicieron alícuotas de 2 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## Referencias

1. Aarabi, M., Modarressi, M. H., Soltanghoreae, H., Behjati, R., Amirjannati, N., & Akhondi, M. M. (2006). Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 86(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.12.070>
2. Aggerholm, A. S., Thulstrup, A. M., Toft, G., Ramlau-Hansen, C. H., & Bonde, J. P. (2008). Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and Sterility*, 90(3), 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1292>
3. Alkafafy, E. M., Ahmed, M. M., Sayed, M. S., El-Shehawi, M. A., Farouk, S., Alotaibi, S. S. & El-Shazly, A. S. (2021) Ameliorating Effect of Pineapple Juice on the Obesity-Induced Testicular Impairment in Male Wistar Rat. DOI: 10.3923/pjbs.2021.1130.1137
4. Assaad, H., Yao, K., Tekwe, C. D., Feng, S., Bazer, F. W., Zhou, L., Carroll, R. J., Meininger, C. J., & Wu, G. (2014). Analysis of energy expenditure in diet-induced obese rats. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 19, 967–985. <https://doi.org/10.2741/4261>
5. Bódis, K., & Roden, M. (2018). Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(11), e13017. <https://doi.org/10.1111/eci.13017>
6. Boron, W., & Boulpapep, E. (2012). *The Male Reproductive System. Medical Physiology*. (3rd ed., pp. 1092-1107). Elsevier
7. Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
8. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 305(6854), 609–613. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609>
9. Craig, J. R., Jenkins, T. G., Carrell, D. T., & Hotaling, J. M. (2017). Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertility and Sterility*, 107(4), 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.115>

10. Davidson, L. M., Millar, K., Jones, C., Fatum, M., & Coward, K. (2015). Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 18(3), 184–193. <https://doi.org/10.3109/14647273.2015.1070438>
11. Deshpande, S. S., Nemani, H., Pothani, S., Khambata, K., Kumar, A., Kallamadi, P. R., & Balasinor, N. H. (2019). Genetically Inherited Obesity and High-Fat Diet-Induced Obesity Differentially Alter Spermatogenesis in Adult Male Rats. *Endocrinology*, 160(1), 220–234. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00569>
12. Diario Oficial de la Federación. Secretaria de Salud. (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
13. Ding, N., Zhang, X., Zhang, X. D., Jing, J., Liu, S. S., Mu, Y. P., Peng, L. L., Yan, Y. J., Xiao, G. M., Bi, X. Y., Chen, H., Li, F. H., Yao, B., & Zhao, A. Z. (2020). Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. *Gut*, 69(9), 1608–1619. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319127>
14. Du Plessis, S. S., Cabler, S., McAlister, D. A., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2010). The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 7(3), 153–161. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.6>
15. Edwards, M., & Mohiuddin, S. S. (2021). Biochemistry, Lipolysis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
16. Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G., Fan, W., Xu, Y., & Ding, Z. (2015). Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *Plos One*, 10(4), e0120775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120775>
17. Forti, G., Vannelli, G. B., Barni, T., Orlando, C., Balboni, G. C., & Serio, M. (1988). Androgen-binding protein and other Sertoli cell proteins in human testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 538, 167–172. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb48862.x>
18. Fox, S. (2014). Reproducción. Fisiología humana. (13a ed., pp. 700-752) McGraw-Hill Interamericana
19. Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Los colores del tejido adiposo. *Gaceta de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/GMM.20005541>

20. Gancheva, S., Jelenik, T., Álvarez-Hernández, E., & Roden, M. (2018). Interorgan metabolic crosstalk in human insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(3), 1371–1415. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2017>
21. Garg, R., Heinzle, E., & Noor, F. (2018). Hepatocytes of Wistar and Sprague Dawley rats differ significantly in their central metabolism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 909–917. <https://doi.org/10.1002/jcb.26255>
22. Ghosh, S., & Mukherjee, S. (2018). Testicular germ cell apoptosis and sperm defects in mice upon long-term high fat diet feeding. *Journal of Cellular Physiology*, 233(10), 6896–6909. <https://doi.org/10.1002/jcp.26581>
23. Gutiérrez, R. C., Roura, G. A., & Olivares, R. J. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la insulina: Una Actualizacion. *Gaceta Médica de México*, 2017;153:214-28
24. Haslam, D. W., & James, W. P. T. (2005). Obesity. *The Lancet*, 366(9492), 1197–1209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67483-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67483-1)
25. Jia, Y.-F., Feng, Q., Ge, Z.-Y., Guo, Y., Zhou, F., Zhang, K.-S., Wang, X.-W., Lu, W.-H., Liang, X.-W., & Gu, Y.-Q. (2018). Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urology*, 18(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12894-018-0360-5>
26. Kahn, B. E., & Brannigan, R. E. (2017). Obesity and male infertility. *Current Opinion in Urology*, 27(5), 441–445. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000417>
27. Kjeldsen, E. W., Nordestgaard, L. T., & Frikke-Schmidt, R. (2021). HDL Cholesterol and Non-Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094547>
28. Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.005>
29. Lewis, R., & Downes, N. (2019). Male Reproductive System. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research* (1 st ed., pp. 207-2179. Elsevier
30. Li, Z., Tian, J., Cui, G., Wang, M., & Yu, D. (2015). Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat

- testes. *Reproduction, Fertility, and Development*.  
<https://doi.org/10.1071/RD14370>
31. Liu, Y., & Ding, Z. (2017). Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction*, 154(4), R123–R131.  
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0161>
32. MacDonald, A. A., Herbison, G. P., Showell, M., & Farquhar, C. M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(3), 293–311. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp047>
33. Malik, I. A., Durairajanayagam, D., & Singh, H. J. (2019). Leptin and its actions on reproduction in males. *Asian Journal of Andrology*, 21(3), 296–299.  
[https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_98\\_18](https://doi.org/10.4103/aja.aja_98_18)
34. Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2019). Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatric Diabetes*, 20(1), 5–9.  
<https://doi.org/10.1111/pedi.12787>
35. Maqdasy, S., Baptissart, M., Vega, A., Baron, S., Lobaccaro, J.-M. A., & Volle, D. H. (2013). Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 368(1–2), 30–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>
36. McPherson, N. O., & Lane, M. (2015). Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian Journal of Andrology*, 17(3), 450–458.  
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.148076>
37. Migliaccio, V., Sica, R., Scudiero, R., Simoniello, P., Putti, R., & Lionetti, L. (2019). Physiological Adaptation to Simultaneous Chronic Exposure to High-Fat Diet and Dichlorodiphenylethylene (DDE) in Wistar Rat Testis. *Cells*, 8(5).  
<https://doi.org/10.3390/cells8050443>
38. Moradi-Ozarlou, M., Moshari, S., Rezaei Agdam, H., Nomanzadeh, A., Shahmohamadolou, S., & Razi, M. (2021). High-fat diet-induced obesity amplifies HSP70-2a and HSP90 expression in testicular tissue; correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Life Sciences*, 279, 119633.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119633>
39. Nagy, C., & Einwallner, E. (2018). Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin

- Tolerance Test (ITT). *Journal of Visualized Experiments*, 131. <https://doi.org/10.3791/56672>
40. Nolfé, G., Spreghini, M. R., Sforza, R. W., Morino, G., & Manco, M. (2012). Beyond the morphology of the glucose curve following an oral glucose tolerance test in obese youth. *European Journal of Endocrinology*, 166(1), 107–114. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0827>
  41. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Clasificación Internacional de Enfermedades*, (11a ed) (CIE-11).
  42. Ortiz-Huidobro, R. I., Velasco, M., Larqué, C., Escalona, R., & Hiriart, M. (2021). Molecular insulin actions are sexually dimorphic in lipid metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 690484. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.690484>
  43. Ou, X.-H., Zhu, C.-C., & Sun, S.-C. (2019). Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 7847–7855. <https://doi.org/10.1002/jcp.27847>
  44. Padro, T., Muñoz-García, N., & Badimon, L. (2021). The role of triglycerides in the origin and progression of atherosclerosis. *Clinica e Investigación En Arteriosclerosis: Publicación Oficial de La Sociedad Española de Arteriosclerosis*, 33 Suppl 2, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2021.02.007>
  45. Palmer, N. O., Bakos, H. W., Fullston, T., & Lane, M. (2012). Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*, 2(4), 253–263. <https://doi.org/10.4161/spmg.21362>
  46. Pasquali, R. (2006). Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*, 54(4), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2006.04.018>
  47. Raad, G., Hazzouri, M., Bottini, S., Trabucchi, M., Azoury, J., & Grandjean, V. (2017). Paternal obesity: how bad is it for sperm quality and progeny health? *Basic and Clinical Andrology*, 27, 20. <https://doi.org/10.1186/s12610-017-0064-9>
  48. Ramlau-Hansen, C. H., Hansen, M., Jensen, C. R., Olsen, J., Bonde, J. P., & Thulstrup, A. M. (2010). Semen quality and reproductive hormones according to birthweight and body mass index in childhood and adult life: two decades of follow-up. *Fertility and Sterility*, 94(2), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.142>

49. Rattigan, S., Bussey, C. T., Ross, R. M., & Richards, S. M. (2007). Obesity, insulin resistance, and capillary recruitment. *Microcirculation*, 14(4–5), 299–309. <https://doi.org/10.1080/10739680701282796>
50. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
51. Shamah, T., Vielma, E., Heredia, O., Romero, M., Mojica, J., Cuevas, L., Santaella, A., & Rivera, J., (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_informe\\_final.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf)
52. Sikaris, Kenneth Andrew. (2007). The clinical biochemistry of obesity-more than skin deep. *Heart, Lung & Circulation*, 16 Suppl 3, S45-50. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2007.05.001>
53. Sikaris, Ken A. (2004). The clinical biochemistry of obesity. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 25(3), 165–181.
54. Sliwowska, J. H., Fergani, C., Gawalek, M., Skowronska, B., Fichna, P., & Lehman, M. N. (2014). Insulin: its role in the central control of reproduction. *Physiology & Behavior*, 133, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.021>
55. Smith, L. B., & Walker, W. H. (2015). Hormone signaling in the testis. In Knobil and neill's physiology of reproduction (pp. 637–690). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00016-8>
56. Stadler, J. T., & Marsche, G. (2020). Obesity-Related Changes in High-Density Lipoprotein Metabolism and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21238985>
57. Suleiman, J. B., Nna, V. U., Zakaria, Z., Othman, Z. A., Eleazu, C. O., Abu Bakar, A. B., Ahmad, A., Usman, U. Z., Abdul Rahman, W. F. W., & Mohamed, M. (2020). Protective effects of bee bread on testicular oxidative stress, NF-κB-mediated inflammation, apoptosis and lactate transport decline in obese male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)*, 131, 110781. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110781>
58. Teerds, K. J., de Rooij, D. G., & Keijer, J. (2011). Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models.

- Human Reproduction Update*, 17(5), 667–683.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmr017>
59. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
60. Vecchié, A., Dallegri, F., Carbone, F., Bonaventura, A., Liberale, L., Portincasa, P., Frühbeck, G., & Montecucco, F. (2018). Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *European Journal of Internal Medicine*, 48, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.020>
61. Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>
62. Verderame, M., Migliaccio, V., & Scudiero, R. (2018). Role of estrogen receptors, P450 aromatase, PCNA and p53 in high-fat-induced impairment of spermatogenesis in rats. *Comptes Rendus Biologies*, 341(7–8), 371–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2018.07.002>
63. Viguera-Villaseñor, R. M., Rojas-Castañeda, J. C., Chávez-Saldaña, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Reyes-Romero, M. M., & Zambrano, E. (2011). Alterations in the spermatid function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica*, 113(2), 214–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.10.004>
64. Wang, C.-Y., & Liao, J. K. (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in Molecular Biology*, 821, 421–433.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8_27)
65. Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., & Höög, C. (2000). The murine Scp3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*, 5(1), 73–83.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80404-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80404-9)
66. Zhao, L., Gu, Q., Xiang, L., Dong, X., Li, H., Ni, J., Wan, L., Cai, G., & Chen, G. (2017). Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 13, 1099–1105.  
<https://doi.org/10.2147/TCRM.S141738>