



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemia en la Reacción Acrosomal del  
espermatozoide humano.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

Q.F.B. Aída Guadalupe Díaz Martel

Dirigido por:

D.C. Ana Alicia Sánchez Tusie.

Comité tutorial:

D.C. Hebert Luis Hernández Montiel.

D.C. Ana Gabriela Hernandez Puga.

D.C. Nicolás Camacho Calderón.

D.C. Ma. Elena Villagrán.

Marzo 2021. Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Contenido	
Índice de Tablas.....	3
Índice de Figuras.....	4
Abreviaturas y siglas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	11
ANTECEDENTES.....	13
Sobrepeso, obesidad y dislipidemias.....	13
Sobrepeso, obesidad e infertilidad.....	16
Infertilidad y Reacción Acrosomal.....	22
Efecto del sobrepeso, la obesidad y las dislipidemias sobre la RA.....	25
Importancia de la cuantificación de la RA.....	25
Evaluación de la RA.....	26
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
METODOLOGÍA.....	28
Tipo de estudio y Tamaño de la Muestra.....	28
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	29
Consideraciones Éticas.....	29
Métodos.....	29
Historial Clínico.....	30
Obtención de muestra de sangre.....	30
Recolección de la muestra se semen.....	30
Espermiograma.....	31
Examen macroscópico.....	31
Licuefacción:.....	31
Aspecto:.....	31
Volumen y viscosidad:.....	31
pH:.....	32

<b>Análisis Microscópico:</b> .....	32
<b>Motilidad:</b> .....	32
<b>Concentración espermática:</b> .....	33
<b>Vitalidad:</b> .....	34
<b>Morfología:</b> .....	34
<b>Separación de espermatozoides por Swim Up</b> .....	35
<b>Inducción de la Reacción Acrosomal.</b> .....	36
<b>Tinción con el colorante Azul de Coomassie y evaluación de la Reacción Acrosomal.</b> .....	37
<b>Análisis estadístico.</b> .....	38
<b>Resultados</b> .....	39
<b>Discusiones</b> .....	55
<b>Conclusiones.</b> .....	60
<b>Bibliografía</b> .....	61
<b>ANEXOS</b> .....	67
<b>Anexo 1. Consentimiento informado.</b> .....	67
<b>Anexo 2. Historial clínico</b> .....	71

## Índice de Tablas.

Tabla 1. Características Antropométricas y Parámetros Espermáticos.....	39
Tabla 2. Bioquímica Sanguínea y perfil de lípidos.....	40
Tabla 3. Asociaciones encontradas entre perfil bioquímico, lipídico y parámetros espermáticos.....	50

## Índice de Figuras.

- Figura 1. Porcentaje de obesidad por sexo del año 2017 en países pertenecientes a la OECD en población mayor de 15 años.** El gráfico incluye porcentajes de sobrepeso y obesidad, se observa que un 72.5% de la población mexicana presenta sobrepeso/ obesidad. Las barras del lado derecho reportan datos medidos, las del lado izquierdo datos auto informados. La barra color rojo indica el promedio de sobrepeso/ obesidad calculado por la OECD. Figura tomada de OECD (2019), OECD Health Statistics 2019. .... 14
- Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población mexicana mayor de 20 años de edad.** En la imagen se observa una comparación de los porcentajes de sobrepeso y obesidad estimados por la ENSANUT en sus publicaciones del 2012 y 2018. Imagen tomada de ENSANUT 2019. .... 15
- Figura 3. Reacción Acrosomal y fusión de las membranas espermáticas y liberación de enzimas hidrolíticas.** En amarillo se observa el acrosoma del espermatozoide. La imagen del lado derecho muestra una cabeza de espermatozoide con un acrosoma intacto, en la imagen del centro se muestra la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal, así como la liberación del contenido del acrosoma, en la imagen del lado derecho se ilustra una cabeza de espermatozoide post RA. Figura modificada de: Stuart Ira Fox, Fisiología Humana 14 Edición. AccesMedicina.com. .... 22
- Figura 4. Vías de señalización en la RA.** La Pg y las proteínas de la ZP inducen la RA de forma fisiológica. Las proteínas de ZP y la Pg se unen a su receptor, incrementan la entrada de  $Ca^{2+}$  al espacio intracelular y a su vez activan los Receptores  $IP_3$ , permitiendo la salida de  $Ca^{2+}$  del acrosoma. Figura modificada de Simons et al., 2018..... 23
- Figura 5. Cascadas de señalización y mecanismos moleculares implicados en la fusión de membranas espermáticas en la RA.** Al unirse el ligando al receptor acoplado a la proteína G se activa la enzima PLC que hidroliza a  $PIP_2$  obteniendo DAG Y  $IP_3$ . El  $IP_3$  promueve la liberación de  $Ca^{2+}$  del acrosoma y activa una segunda entrada de  $Ca^{2+}$  al espacio intracelular. DAG activa a PKC y actúa favoreciendo el incremento intracelular de  $Ca^{2+}$ . El receptor acoplado a la proteína G promueve el aumenta la producción de ACs y se activa a PKA, misma que promueve la fosforilación de proteínas de la membrana. El receptor acoplado a proteína G activa canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VOOC) permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. La despolarización de la membrana activa un canal iónico de  $Na^{2+}$  e  $H^+$ , que produce una alcalinización del pH intracelular. Figura modificada de Gupta et al., 2011. .... 24
- Figura 6. RA en espermatozoide de llama evaluada con el colorante Azul de Coomassie.** A) En la imagen se observa un espermatozoide no reaccionado, la coloración azul uniforme permite observar que la cabeza y membranas del espermatozoide se encuentran intactas. B) En la imagen se observa un espermatozoide que presenta RA, en la cabeza del espermatozoide se observan dos tonalidades de azul, que permiten observar la RA. La tonalidad azul más fuerte solo tiñe el núcleo del espermatozoide. La tonalidad más baja de azul nos indica la ausencia de las membranas plasmática y acrosomal, esto como resultado de la RA. Figura modificada de Famuso y colaboradores 2014. ... 27
- Figura 7. Preparación del frotis para la tinción de identificación morfológica de los espermatozoides.** La gota de semen se distribuye sobre el filo inferior del portaobjetos inclinado y se arrastra sobre el otro portaobjetos para formar una extensión. Figura tomada del Manual de la OMS para el examen del semen y la interacción entre el semen y el moco cervical. 5ta edición..... 34
- Figura 8. Técnica de separación de espermatozoides por Swim Up y capacitación espermática.** Se colocan 500 $\mu$ L de la muestra de semen en un tubo falcón, se le agregan 500 $\mu$ L de medio Ham's

suplementado con BSA y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , enseguida se coloca el tubo en un ángulo de  $45^\circ$  y se incuba durante una hora con a  $37^\circ\text{C}$ , en condiciones de una atmosfera del 95% de aire y 5 %de  $\text{CO}_2$ . Posterior a la incubación se toman  $10\mu\text{L}$  de la muestra de la superficie del tubo, enseguida se colocan en la cámara de Neubauer para contar y ajustar la concentración de espermatozoides a  $10 \times 10^6$  cel/mililitro. Una vez ajustada la concentración se incuba de nuevo el tubo que contiene la muestra durante 3 h a las condiciones antes descritas, con el objetivo de capacitar la muestra de semen. .... 36

**Figura 9. Metodología de inducción de la RA.** La RA se indujo por separado, en alícuotas de  $50\mu\text{L}$  de la muestra de semen. Utilizando como inductor Pg..... 37

**Figura 10. Estadío de niveles de la Química Sanguínea y el perfil de lípidos respecto a sus valores de referencia correspondientes.** HDL: Lipoproteínas de alta densidad.; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad..... 41

**Figura 11. Matriz de correlación entre parámetros espermáticos y características antropométricas.** Las correlaciones positivas se muestran en colores cálidos y las correlaciones negativas en colores fríos..... 42

**Figura 12. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y grasa visceral.** Al ir incrementando la grasa visceral en el organismo el porcentaje de RA espontánea aumenta, lo que nos indica una asociación positiva entre ambas variables. .... 43

**Figura 13. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y el IMC.** Al aumentar el IMC se presenta un notorio aumento en los porcentajes de RA espontánea. .... 44

**Figura 14. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y el % de grasa corporal..... 45**

**Figura 15. Relación entre el IMC y el porcentaje de RA inducida.** Se percibe una marcada disminución en los porcentajes de RA que se induce al aumentar el IMC. .... 46

**Figura 16. Relación entre el porcentaje de RA inducida y la grasa visceral.** Se observa una correlación negativa entre el aumento de la grasa visceral y la disminución del porcentaje de RA inducida..... 47

**Figura 17. Relación entre el porcentaje de la RA inducida y el peso de los individuos.** Se observa una disminución en el porcentaje de RA inducida al aumentar el peso..... 48

**Figura 18. Relación entre el porcentaje de ARPC y el IMC.** Se observa que al incrementarse el IMC se disminuye el porcentaje de espermatozoides que reaccionan a la progesterona (ARPC) por lo que se ilustra una asociación negativa entre ambas variables..... 49

**Figura 19. Relación entre el porcentaje de motilidad No Progresiva de los espermatozoides y los niveles de colesterol de los participantes.** Es posible observar un aumento en el porcentaje de espermatozoides con una motilidad NP al elevarse las concentraciones de colesterol..... 51

**Figura 20. Relación entre el porcentaje de Motilidad NP de los espermatozoides y la concentración de triglicéridos de los participantes..... 52**

**Figura 21. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y la concentración de Triglicéridos de los participantes.** Al aumentar la concentración de triglicéridos, se presenta un aumento en el porcentaje de espermatozoides que presentan un acrosoma reaccionado espontáneamente..... 53

**Figura 22. Relación entre el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva y las concentraciones de VLDL.** VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad. .... 54

**Figura 23. Relación entre el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva y la concentración de Ácido Úrico de los participantes ..... 54**

## Abreviaturas y siglas.

ARPC: Porcentaje de espermatozoides que reaccionan a la progesterona

ATP: Adenosín trifosfato

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

Cm: Centímetros

Co<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CC: Circunferencia de cintura

DAG: Diacilglicerol

FFA: Ácidos grasos libres

FSH: Hormona folículo estimulante

FIV: Fertilización *in vitro*

GnRh: Hormona liberadora de gonadotropinas

H<sup>+</sup>: Hidrógeno

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

h: Horas

IMC: Índice de masa corporal

IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LH: Hormona leutenizante

PBS; Buffer fosfato salino

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil Inositol difosfato

PKA: Proteína Kinasa A

min: Minutos

mL: Mililitros

Mm: Milimolar

Na<sup>+</sup>: Sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud.

pH: Potencial de iones hidrogeniones

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

RA: Reacción acrosomal

Rpm: Revoluciones por minuto

S: Segundos

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

ZP: Zona pelúcida

ZRK: Receptor de la proteína de la zona pelúcida

ZP3: Proteína de la zona pelúcida 3

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## Resumen.

El sobrepeso y la obesidad generalmente están asociados a dislipidemias, así como otras patologías. Varios estudios han evidenciado que el sobrepeso y la obesidad son factores que provocan problemas de infertilidad en mujeres, reportes recientes han demostrado que también son factores que potencian la infertilidad masculina. La infertilidad es una condición patológica de origen multifactorial que afecta entre un 2.5 y un 12 % de la población masculina. Algunos estudios han correlacionado las dislipidemias, el sobrepeso y la obesidad con algunos parámetros espermáticos, sin embargo, la evidencia del impacto en estas patologías sobre pruebas de función espermática como lo es la prueba de Reacción Acrosomal (RA) es muy limitada. La RA es un evento de exocitosis donde se fusionan las membranas del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, liberando enzimas líticas que permiten al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo. Por lo que la RA es considerada un evento fundamental para lograr que el espermatozoide realice una fecundación exitosa. Por tales razones, el objetivo del presente trabajo es determinar los efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemias sobre RA del espermatozoide humano. Para cumplir dicho objetivo se realizó un estudio transversal, exploratorio, con una muestra de 25 hombres de 18 a 45 años. Se recabó el historial médico, se obtuvo el índice de masa corporal (IMC), muestras de sangre y semen del participante. En el suero sanguíneo se evaluó la concentración de glucosa, urea, creatinina, testosterona, así como el perfil lipídico. La muestra de semen se evaluó a través de un espermiograma, y se indujo RA con Progesterona (Pg). Se evaluó la RA mediante tinciones con el colorante azul de Coomassie. Resultados: En nuestro estudio encontramos asociaciones positivas entre el porcentaje de RA espontánea y parámetros como grasa visceral, el porcentaje de grasa, el IMC y el peso. Así como una correlación negativa entre la concentración de triglicéridos y los porcentajes de RA espontánea y espermatozoides con motilidad no progresiva, así mismo, se encontraron asociaciones positivas entre los niveles de colesterol, VLDL, ácido úrico y el porcentaje de motilidad no progresivo. Se encontraron asociaciones negativas entre el porcentaje de espermatozoides que responden a la estimulación con Pg (ARPC) y el IMC. Es importante mencionar que no se encontraron asociaciones entre el aumento de IMC y los parámetros

espermáticos evaluados en el espermiograma. Conclusiones: Las dislipidemias, el sobrepeso y la obesidad afectan negativamente la Reacción Acrosomal del espermatozoide humano.

**Palabras clave:** Dislipidemia, Sobrepeso, Obesidad, Infertilidad masculina, Reacción Acrosomal.

## **Abstract.**

Overweight and obesity are generally associated with dyslipidemias, as well as other pathologies. Several studies have shown that overweight and obesity are factors that cause infertility problems in women, recent reports have shown that they are also factors that enhance male infertility. Infertility is a multifactorial disease condition that affects between 2.5 and 12% of the male population. Some studies have correlated dyslipidemias, overweight and obesity with some sperm parameters, however, the evidence of the impact of these pathologies on sperm function tests such as the Acrosomal Reaction (AR) test is very limited. RA is an exocytosis event where the acrosome membranes fuse with the sperm plasma membrane, releasing lytic enzymes that allow the sperm to pass through the outer layers of the egg. For this reason, RA is considered a fundamental event for the sperm to carry out a successful fertilization. For these reasons, the objective of the present work is to determine the effects of overweight, obesity and dyslipidemia on AR of human sperm. To meet this objective, a cross-sectional, exploratory study was carried out with a sample of 25 men aged 18 to 45 years. The medical history was collected, the body mass index (BMI), blood samples and semen of the participant were obtained. In the blood serum the concentration of glucose, urea, creatinine, testosterone, as well as the lipid profile were evaluated. The semen sample was evaluated through a spermogram, and RA was induced with Progesterone (Pg). RA was evaluated by staining with Coomassie blue stain. Results: In our study we found positive associations between the percentage of spontaneous AR and parameters such as visceral fat, the percentage of fat, the BMI and the weight. As well as a negative correlation between the triglyceride concentration and the percentages of spontaneous AR and sperm with non-progressive motility, likewise, positive associations were found between the levels of cholesterol, VLDL, uric acid, and the percentage of non-progressive motility. Negative associations were found between the percentage of sperm that respond to stimulation with

Pg (ARPC) and BMI. It is important to mention that no associations were found between the increase in BMI and the sperm parameters evaluated in the spermiogram. Conclusions: Dyslipidemias, overweight and obesity negatively affect the Acrosomal Reaction of human sperm

Keywords: Dyslipidemia, Overweight, Obesity, Male Infertility, Acrosome Reaction

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## **Introducción.**

La obesidad es un grave problema de salud pública que se ha convertido en una epidemia mundial, en los últimos años a aumentando exponencialmente el número de personas con sobrepeso y obesidad a nivel mundial (Di Cesare et al., 2016; Rastrelli et al., 2019). Distintos factores están implicados en el incremento del sobrepeso y la obesidad en la población (Meledrum et al., 2017, Manna & Jain., 2015). El sobrepeso y la obesidad comúnmente se acompañan de desregulaciones lipídicas o dislipidemia, éstas se caracterizan por presentar una elevada concentración de triglicéridos y una disminución en el colesterol HDL. Aunado a lo anterior, frecuentemente el sobrepeso y la obesidad tienden a predisponer a las personas que los padecen a desarrollar distintas afecciones como lo son enfermedades cardiacas, Diabetes Mellitus tipo II, hipertensión y problemas de infertilidad, entre otras (Klop et al., 2013). El incremento en las tasas de sobrepeso y obesidad ha ido creciendo a la par de las tasas de infertilidad masculina (Craig et al., 2017). En los últimos años se ha estudiado el impacto que ejercen el sobrepeso y la obesidad en la fertilidad masculina y a la fecha no se ha logrado obtener una conclusión puntual, ya que los resultados mostrados por los diferentes estudios no presentan concordancia entre ellos. En el 2010 MacDonald y colaboradores reportaron no haber encontrado resultados estadísticamente significativos entre las variables antes mencionadas. Lo que se contrapone a lo expuesto por los más recientes estudios que han manifestado existe una relación entre el sobrepeso, obesidad y la infertilidad masculina, mostrando una disminución en parámetros como la motilidad, concentración y el volumen total en el eyaculado evaluado en los espermogramas realizados a hombres con sobrepeso y obesidad (Shrem et al., 2019; Skurla et al., 2018; Eisenberg et al., 2014; Hammoud et al., 2008). Cabe destacar que los parámetros evaluados en los espermogramas no son contundentes para predecir el potencial de fertilización de los espermatozoides, para esto es necesario implementar pruebas de funcionalidad espermática como la prueba de RA, la cual, evalúa el estado del acrosoma, una vesícula ácida ubicada en la cabeza del espermatozoide. La RA es un evento de exocitosis donde se fusionan las membranas del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, liberando enzimas líticas que permitirán al espermatozoide atravesar las capas externas del óvulo. Es

importante resaltar que la RA es un evento fundamental para lograr que el espermatozoide realice una fecundación exitosa (Darszon, Nishigaki, Beltran, & Treviño, 2011).

A la fecha, el único estudio que se ha desarrollado e involucra el análisis de la RA en participantes que presentaban obesidad mórbida mostró una disminución significativa en la RA de los espermatozoides de hombres con obesidad mórbida en comparación con el grupo control conformado por sujetos normopeso (Samavat et al., 2014). Respecto al impacto de las dislipidemia en la fertilidad masculina, algunos estudios han indicado que elevados porcentajes de hombres infértiles presentan altos niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (Ramírez – Torres et al., 2000). Por otro lado, Schisterman y colaboradores reportaron que hombres con niveles elevados de colesterol y triglicéridos presentan una disminución en los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intactos, así como una reducción en la concentración espermática (Schisterman et al., 2014).

Con lo descrito anteriormente, hoy en día se reconoce que el sobrepeso y la obesidad afectan algunos parámetros espermáticos. De igual manera, también se ha demostrado que las dislipidemias provocan afectaciones en los espermatozoides. Sin embargo, el impacto de estos factores sobre la fertilidad masculina se ha estudiado de forma independiente, y con una evaluación limitada a los parámetros espermáticos que se examinan en los espermigramas. Por tales razones, en el presente estudio se evaluó el impacto que causan en conjunto las dislipidemias, el sobrepeso y la obesidad en la infertilidad masculina, además de valorar los parámetros espermáticos de rutina, complementamos nuestro estudio evaluando el impacto que generan estos factores en una prueba de función espermática, como lo es la RA, en dicha prueba evaluamos tanto el estado del acrosoma, como la RA. De esta forma determinamos el grado de impacto que ejercen la dislipidemia, el sobrepeso y la obesidad en una de los eventos determinantes para lograr una fecundación, como lo es la RA.

## **ANTECEDENTES.**

### **Sobrepeso, obesidad y dislipidemias.**

La obesidad es un grave problema de salud pública que se ha convertido en una epidemia mundial, afectando a países desarrollados, así como a los que se encuentran en vías de desarrollo. El crecimiento exponencial del sobrepeso y la obesidad ocasiona importantes problemas de salud afectando de forma individual y en conjunto a la sociedad (Rastrelli et al., 2019). En el año 2013 la Asociación Médica Americana declaró a la obesidad como una enfermedad (AMA., 2013). La organización mundial de la salud (OMS) ha definido al sobrepeso y la obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”. El diagnóstico del sobrepeso y la obesidad se determina calculando el índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene al dividir el peso del individuo en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros. Se considera sobrepeso cuando se tiene un  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$  y obesidad cuando el IMC es  $\geq 30$  (WHO 2019). A través de la grasa abdominal, obtenida por la medición de la circunferencia de cintura (CC) también es posible diagnosticar obesidad, en este parámetro se considera obesidad cuando se presenta una CC  $\geq 102$  cm en hombres y CC  $\geq 88$  cm en mujeres (Okosun, Tedders, Choi, & Dever, 2000).

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad en la población mundial durante las últimas décadas se ha mantenido al alza, así lo demuestran en el estudio Global Burden Of Disease publicado en el año 2016. En dicho estudio evalúan la tendencia del IMC en 195 países, durante un lapso de tiempo que comprendió del año 1974 al 2014, los resultados denotan que en 1974 existían alrededor de 105 millones de personas obesas en el mundo, en contraste en el 2014 el promedio aumentó significativamente a 641 millones (Di Cesare et al., 2016; Stefan, Häring, Hu, & Schulze, 2013).

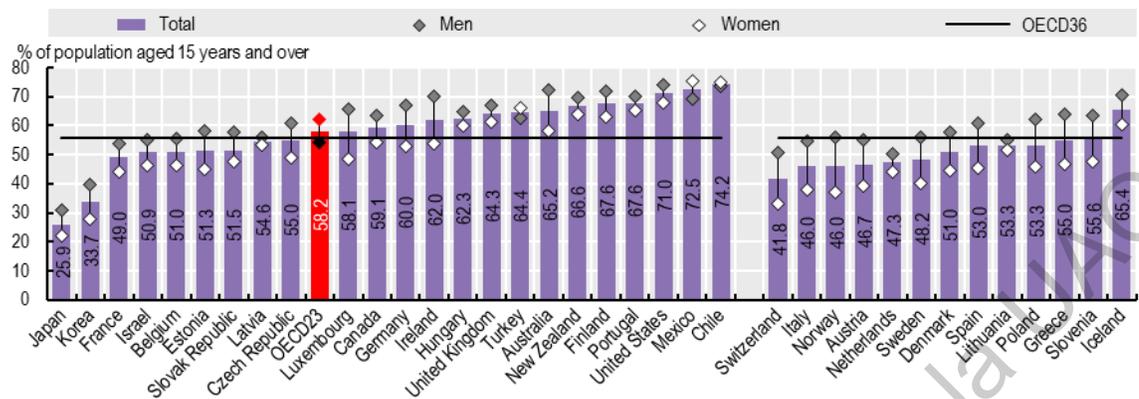


Figura 1. Porcentaje de obesidad por sexo del año 2017 en países pertenecientes a la OECD en población mayor de 15 años. El gráfico incluye porcentajes de sobrepeso y obesidad, se observa que un 72.5% de la población mexicana presenta sobrepeso/ obesidad. Las barras del lado derecho reportan datos medidos, las del lado izquierdo datos auto informados. La barra color rojo indica el promedio de sobrepeso/ obesidad calculado por la OECD. Figura tomada de OECD (2019), OECD Health Statistics 2019.

En el año 2019, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) a través de su última actualización estadística de obesidad indicó que México es el segundo país a nivel mundial con mayor número de población con sobrepeso y obesidad como se observa en la figura 1 (OECD., 2019). En México, las estadísticas de sobrepeso y obesidad publicadas por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el año 2019 señalan que la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de un 75.2% globalmente, específicamente un 39.1 % de la población presenta sobrepeso y un 36.1 % obesidad. Categorizada por sexo se observa que la prevalencia de sobrepeso y obesidad es más alta en mujeres (76.8%) que en hombres (73%) (Fig. 2.) (ENSANUT, 2019).

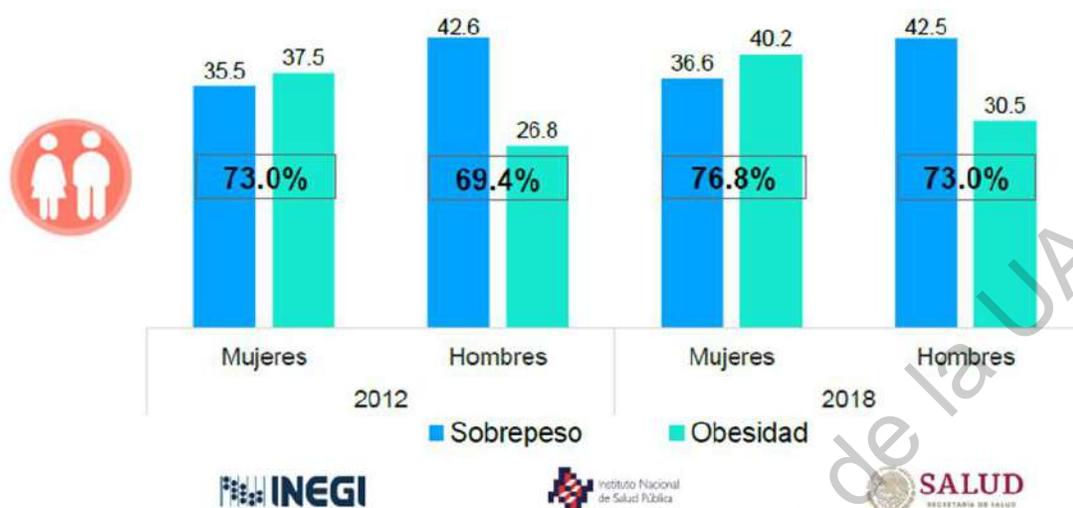


Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población mexicana mayor de 20 años de edad. En la imagen se observa una comparación de los porcentajes de sobrepeso y obesidad estimados por la ENSANUT en sus publicaciones del 2012 y 2018. Imagen tomada de ENSANUT 2019.

Diversos factores contribuyen al desarrollo del sobrepeso y la obesidad, el gran desequilibrio energético entre la energía consumida y la energía gastada es considerado como el primer factor que predispone su desarrollo, seguido de un incremento en la ingesta de alimentos ricos en grasas y azúcares, así como el estilo de vida, patrones de actividad física, cultura, factores genéticos y ambientales (Meldrum et al., 2017; Manna & Jain, 2015; Cabler et al., 2010). Frecuentemente de la mano del sobrepeso y la obesidad se presentan cuadros de dislipidemias, esto en respuesta a las dietas altas en grasas y azúcares. Estos cuadros se caracterizan por presentar desequilibrios en los lípidos sanguíneos, como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia (Saez, 2019). Sin embargo, los desajustes lipídicos no es la única comorbilidad que se presenta, patologías como la Diabetes Mellitus tipo II, enfermedades cardíacas, disfunciones hepáticas y renales, problemas respiratorios, apnea obstructiva del sueño e infertilidad son algunas de las enfermedades que se ha demostrado se desarrollan al presentar sobrepeso y obesidad (Rastrelli et al., 2019; Manna & Jain., 2015; Schisterman et al., 2014).

## **Sobrepeso, obesidad e infertilidad.**

Distintos estudios han evidenciado que las mujeres con sobrepeso y obesidad tienen una mayor tendencia a desarrollar subfertilidad e infertilidad, ya que presentan comúnmente alteraciones ovulatorias y menstruales, así como una mayor tendencia a desarrollar diversas patologías endometriales, por lo que es frecuente que presenten problemas de infertilidad (Broughton & Moley, 2017; Macdonald, Herbison, Showell, & Farquhar, 2010; Talmor & Obstetrics, 2014). Sin embargo, la obesidad no solo afecta la fertilidad femenina, recientes estudios han evidenciado que ocasiona problemas de infertilidad masculina, manifestado que existe relación entre la obesidad y algunos parámetros del semen (Eisenberg et al., 2014; Shrem et al., 2019; Wallach et al., 2008). El incremento de las tasas de sobrepeso y obesidad ha ido creciendo a la par de las tasas de infertilidad masculina, a través de diversos estudios se ha logrado reunir evidencia que relaciona estrechamente el sobrepeso y la obesidad con la infertilidad masculina (Craig et al., 2017).

La infertilidad ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud como “una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por el hecho de no lograr un embarazo después de 12 meses o más de mantener relaciones sexuales sin protección” (OMS, 2006). Aproximadamente 186 millones de parejas en edad reproductiva presentan problemas de infertilidad, se estima que la infertilidad masculina es la causa total o parcial de infertilidad en un 20 a 50% de los casos de la infertilidad en las parejas (Hwang et al., 2013). En particular, la infertilidad masculina es considerada una condición patológica de origen multifactorial que afecta entre un 2.5% y un 12% de la población masculina (Agarwal, Mulgund, Hamada, & Chyatte, 2015).

Si bien, la fertilidad masculina depende de diferentes factores, que van desde el desarrollo de procesos específicos como lo son la espermatogénesis y la maduración espermática, hasta el obtener un número adecuado de espermatozoides de alta calidad para lograr la fecundación. No obstante, el hecho que la obesidad y el subconjunto de comorbilidades que esta desarrolla afectan la fertilidad masculina es cada vez más palpable. Al ser la dislipidemia una de las principales comorbilidades del sobrepeso y la obesidad, se ha reportado que esta triada interfiere en la formación de la estructura física y molecular de

las células espermáticas durante la espermatogénesis, en la maduración espermática y principalmente en el proceso de capacitación del espermatozoide, lo que promueve una reducción en la calidad de los espermatozoides e induce a el desarrollo de una posible infertilidad.

El espermatozoide es una célula que presenta una alta sensibilidad a los cambios en su entorno, y algunas patologías llegan a propiciarlos, un ejemplo de ello son las dislipidemias, caracterizadas por presentar concentraciones elevadas de ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos y colesterol LDL, así como una marcada disminución de colesterol HDL, logrando así inducir disfunciones en los espermatozoides (Klop et al., 2013; Saez, 2019). La conformación y el funcionamiento adecuado de la membrana plasmática del espermatozoide depende de sus componentes lipídicos (Glander, Lammert, Paasch, Glasow, & Kratzsch, 2002). En el proceso conocido como capacitación espermática, los espermatozoides experimentan procesos de modificaciones en la arquitectura de los lípidos de la membrana plasmática (Darszon et al., 2011). La integridad de la membrana del espermatozoide es esencial para que se logre una fecundación exitosa, frecuentemente hombres que tienen problemas de fertilidad presentan espermatozoides con membranas con una integridad deficiente (Glander et al., 2002). Por otro lado, en el 2009 Ergun y colaboradores reportaron haber encontrado alteraciones en la conformación de ácidos grasos y lípidos de la membrana plasmática en espermatozoides de hombres con infertilidad, esto con respecto a células de hombres fértiles (Ergün et al., 2007).

Existen reportes que indican que hasta el 65% de los hombres que padecen infertilidad presentan niveles elevados de colesterol y triglicéridos (Ramírez- Torres et al., 2000). En distintos estudios desarrollados en modelos de ratón y conejo, han implementado dietas ricas en grasas saturadas, en ellos se observó un incremento en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, por consiguiente, al realizar la evaluación de los parámetros espermáticos reportaron una disminución en la concentración y la motilidad en los espermatozoides de estos animales (Bataineh et al., 2005; Purohit et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). En el estudio realizado por Yamamoto y colaboradores evaluaron el potencial de fertilización en espermatozoides de conejos que presentaban hipercolesterolemia, para dicha evaluación emplearon ovocitos de conejo hembra, ambos gametos se sometieron a un proceso de

fertilización *in vitro* (FIV), en los resultados muestran que los espermatozoides del grupo de conejos con hipercolesterolemia obtuvieron un porcentaje significativamente menor de ovocitos fertilizados en comparación con el grupo control (Yamamoto & Sofikitis, 1999). En recientes estudios desarrollados en conejos, al grupo control se le proporcionaba una dieta normal y al grupo experimental se le dio una dieta alta en colesterol, en sus resultados se observa que el grupo experimental presentó niveles plasmáticos elevados de colesterol, en lo que corresponde a los parámetros espermáticos, la morfología de los espermatozoides presentó alteraciones, una motilidad disminuida, así como una marcada disminución en el volumen de semen eyaculado.

Por otro lado, en el 2014 Schisterman y colaboradores realizaron un estudio en el que evaluaron los niveles de colesterol y lípidos en suero sanguíneo de 501 hombres, estudiaron el efecto de estos en algunos parámetros espermáticos, ellos muestran en sus resultados que las concentraciones elevadas de colesterol y triglicéridos se correlacionan positivamente con porcentajes más bajos de espermatozoides con acrosoma intacto y con perímetros de cabeza más reducidos. Además, también reportan que las concentraciones elevadas de colesterol total se relacionan con una menor cantidad en el volumen del eyaculado, así como una disminución en el recuento espermático (Schisterman et al., 2014). A pesar de no conocer con claridad los mecanismos exactos por los que las dislipidemias afectan a los parámetros y la funcionalidad espermática la evidencia antes descrita pone en manifiesto la afección que sufren las células espermáticas, tanto de animales como en humanos.

Los estragos que ocasionan el sobrepeso y obesidad sobre la fertilidad masculina han salido a la luz en los últimos años. Sin embargo, la fisiopatología exacta de cómo influye negativamente en la fertilidad masculina aún no se conoce con precisión, ya que distintos factores y mecanismos se encuentran involucrados. El exceso de grasa corporal ligado al sobrepeso y la obesidad se ha relacionado con diversas alteraciones endocrinas que se han asociado con la infertilidad masculina. El principal mecanismo relacionado con ello es la característica desregulación que se presenta en el eje Hipotálamo – Hipófisis- Gonadal de los hombres con sobrepeso y obesidad. El aumento excesivo del tejido adiposo blanco potencia una alta actividad de la enzima aromatasa, lo cual, provoca una desmedida conversión de andrógenos a estrógenos. La alta concentración de estrógenos afecta en primera instancia el

pulso de liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas en el hipotálamo, en la hipófisis afecta la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH), lo que conlleva a una drástica disminución en los niveles de Testosterona, que a su vez afecta la función de las células de Leydig y de Sertoli, alterando así directamente la espermatogénesis y los procesos de maduración espermática (Liu & Ding, 2017; Mintziori et al., 2020; Wang, Huang, Du, Yao, & Sun, 2017).

Aunado a lo anterior, en distintos estudios han reportado la presencia de alteraciones en los parámetros de hormonas sexuales en varones que tiene un IMC  $>25$  Kg/m<sup>2</sup>, estas alteraciones se caracterizan por presentar una marcada disminución en los niveles de Testosterona total y libre, de la Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales (SHBG), Inhibina, FSH y LH, así como un aumento significativo en los niveles séricos de Estradiol y Leptina (Amjad, Baig, Zahid, Tariq, & Rehman, 2018; Lainez & Coss, 2019; Liu & Ding, 2017; Mah & Wittert, 2010; Vincenzo, Busetto, Vettor, & Rossato, 2018). La leptina es una hormona sintetizada principalmente por el tejido adiposo blanco, interviene en algunas funciones neuroendocrinas del organismo, es una hormona clave en la fertilidad masculina. Participa en la modulación del eje hipotálamo hipófisis gonadal tanto de forma indirecta en la liberación de la GnRh, LH, y FSH, como de manera directa actuando sobre las células de Leydig y Sertoli. Se ha reportado anteriormente un aumento de hasta 4 veces mayor en los niveles séricos de leptina en hombres con sobrepeso y obesidad, en comparación con los que presentan un IMC normal, esto en respuesta a un aumento tanto en número como en el tamaño de los adipocitos que conforman el tejido adiposo blanco (Almabhouh, Hafidz, Ifrah, & Malik, 2019; Amjad et al., 2018; Khodamoradi, Parmar, & Khosravizadeh, 2020).

El aumento en los niveles séricos de leptina en hombres con sobrepeso y obesidad desencadena un mecanismo de resistencia, es decir un estado en el que la persona es insensible a los niveles séricos de leptina, en respuesta a ello se presentan algunas modificaciones en las funciones fisiológicas de dicha hormona, en este estado la resistencia a la leptina modifica el funcionamiento como del eje HHG. Con base en lo reportado en la literatura, se ha demostrado que el incremento en el tejido adiposo produce en el organismo un estado de inflamación, acompañado de una elevada concentración de estrógenos y una resistencia a la leptina, al no detectar los niveles de leptina las neuronas kisspeptina

disminuyen la secreción de kisspeptina, lo cual repercute aguas abajo, al disminuir los pulsos de secreción de GnRh y por consiguiente FSH y LH, lo que produce un impacto negativo en la fertilidad masculina (Almabhouh et al., 2019; Khodamoradi et al., 2020; Syriou, Papanikolaou, Kozyraki, & Goulis, 2018). El desarrollo de investigaciones realizadas con el objetivo de conocer más a detalle la fisiopatología de la infertilidad masculina ha evidenciado como diferentes factores relacionados con el sobrepeso y la obesidad impactan negativamente en ella, principalmente exponiendo el impacto generado sobre los parámetros espermáticos comúnmente estudiados en los espermioigramas.

Al ser un IMC un puntual indicador de sobrepeso y obesidad, se han realizado distintos estudios donde se evalúa el impacto del IMC en la fertilidad masculina. Thulstrup y colaboradores en el 2007 reportaron que existe una relación entre el aumento del IMC y la infertilidad masculina, indicaron que por cada incremento de 3 puntos de un IMC mayor a 25 existe un marcado deterioro en la fertilidad masculina (Nguyen, Wilcox, Skjærven, & Baird, 2007; Thulstrup, Nohr, Bonde, Sørensen, & Olsen, 2007). Sin embargo, los resultados de distintos estudios que evalúan la relación entre el IMC y los parámetros espermáticos no son concisos. En un meta análisis publicado por MacDonald y colaboradores en el año 2010 evaluaron el impacto del índice IMC en los parámetros del semen y las hormonas sexuales con un total de 6,793 datos, reportan que no encontraron una asociación significativa entre el aumento del IMC y los distintos parámetros que evaluaron como la concentración media de espermatozoides, el recuento total de espermatozoides y el volumen del semen. Cabe mencionar que en este meta análisis reportan una asociación negativa entre el IMC y las concentraciones de testosterona y SHBG (Macdonald et al., 2010).

En contraste con los datos publicados por el meta análisis anterior, existen diferentes estudios que presentan resultados que se contraponen, en el 2013 Sermondade y colaboradores evaluaron la relación entre el IMC y el conteo de espermatozoides, publicaron los resultados obtenidos de su meta análisis, en el cual incluyeron una población de 13,077 varones, los resultados que ellos obtienen muestran que existe una asociación entre el IMC y el recuento anormal de espermatozoides, es decir, ellos reportaron que hombres con un IMC bajo y bajo peso presentan mayor riesgo de presentar oligozoospermia o azoospermia con un Odds ratios (IC 95%) de 1.15, 1.11 para hombres con sobrepeso, 1.28 para hombres que

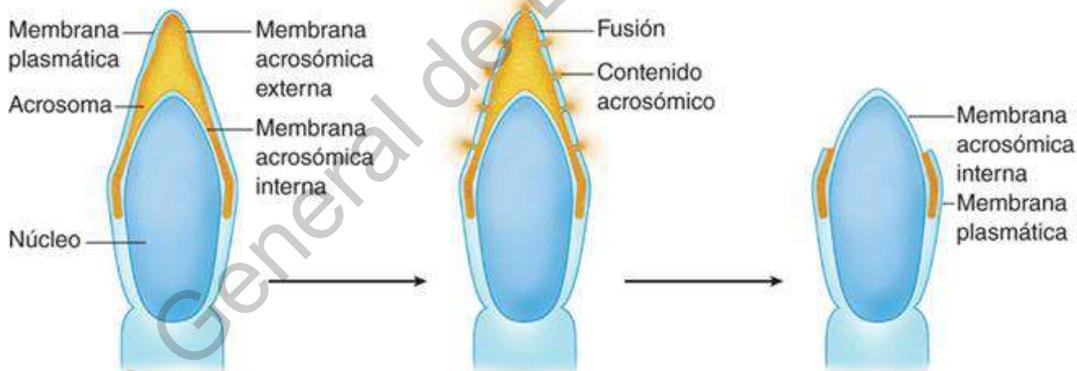
presentaban obesidad y 2.04 para hombres con obesidad mórbida, reportando que los hombres con sobrepeso y obesidad presentan un riesgo significativo de presentar oligozoospermia o azoospermia (Sermondade et al., 2013).

Estudios publicados más recientemente tienen resultados que concuerdan con los publicados en el meta análisis de Sermondade y colaboradores, es decir, reportan asociaciones significativas entre el IMC y el recuento total de espermatozoides, la motilidad y concentración, presentando concentraciones más bajas en los parámetros antes mencionados en hombres con sobrepeso y obesidad en comparación con hombres con un IMC normal (Eisenberg et al., 2014; Guo et al., 2017; Wang et al., 2017). Los estragos que causa la obesidad en los parámetros espermáticos se hacen evidentes con los resultados que muestran las investigaciones recientes, Vincenzo y colaboradores han evaluado los parámetros espermáticos de personas con obesidad mórbida antes y después de someterse a cirugías bariátrica, realizaron comparaciones en los parámetros espermáticos antes y después de la cirugía, los resultados que arrojan indican que los parámetros presentan cambios significativos después de realizarse la cirugía, mostrando un aumento en el recuento de espermatozoides, en la motilidad y en el volumen de eyaculación (Vincenzo et al., 2018).

Frecuentemente los estudios que evalúan el impacto del sobrepeso y la obesidad en la infertilidad masculina lo hacen a través de los parámetros espermáticos. Sin embargo, los valores cualitativos y cuantitativos que brindan los espermiogramas no son suficientes para predecir el potencial de fertilización de los espermatozoides. Recientemente se han implementado el desarrollo de pruebas funcionales de espermatozoide, como la prueba de RA en procesos de reproducción asistida. Los resultados muestran que la RA es un parámetro importante de evaluar, ya que se correlaciona positivamente con la tasa de fertilización (Oehninger, Franken, Sayed, Barroso, & Kolm, 2000; Tello-mora, Hernández-cadena, Pedraza, & López-bayghen, 2018). El estudio de la RA en el impacto que generan la obesidad y el sobrepeso sobre la infertilidad masculina aporta mayor información sobre las afecciones que presentan los espermatozoides de hombres con sobrepeso y obesidad.

### Infertilidad y Reacción Acrosomal.

La RA es considerada un evento fundamental para que el espermatozoide logre fecundar al óvulo. En esta prueba se evalúa el estado del acrosoma del espermatozoide, posterior de haber sido inducida la RA. El acrosoma es un orgánulo membranoso que está conformado por una bicapa lipídica, se localiza en la región anterior del espermatozoide y presenta forma de capuchón, en su interior contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina y la hialuronidasa (Ugarelli, Evangelista-vargas, & Santiani, 2017). Al presentarse la RA se fusionan la membrana citoplasmática y la membrana externa del acrosoma en la zona superior de la cabeza del espermatozoide (Fig. 3), enseguida son liberadas paulatinamente las enzimas contenidas en el acrosoma (proteasas, acrosina/proacrosina, hialuronidasas y algunas proteínas de la matriz) (Cardona et al., 2005; Xu F. et al., 2018). Estas enzimas hidrolíticas permiten que el espermatozoide atraviese las capas externas del óvulo (Yanagimachi, 2011).



**Figura 3. Reacción Acrosomal y fusión de las membranas espermáticas y liberación de enzimas hidrolíticas.** En amarillo se observa el acrosoma del espermatozoide. La imagen del lado derecho muestra una cabeza de espermatozoide con un acrosoma intacto, en la imagen del centro se muestra la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal, así como la liberación del contenido del acrosoma, en la imagen del lado derecho se ilustra una cabeza de espermatozoide post RA. Figura modificada de: Stuart Ira Fox, Fisiología Humana 14 Edición. AccesMedicina.com.

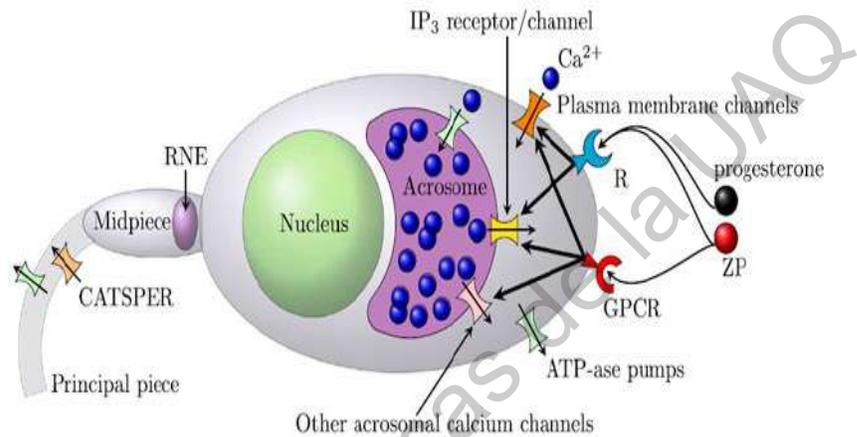
A pesar de que la RA se describió en la década de los 60's hoy en día se desconoce el inductor principal de la RA y las vías de señalización de este proceso (Fig. 4). Uno de los mecanismos

propuestos indica que, al interactuar el espermatozoide con la ZP, la proteína de la zona pelúcida 3 (ZP3) se une a su receptor para la zona pelúcida 3 (ZRK) y a

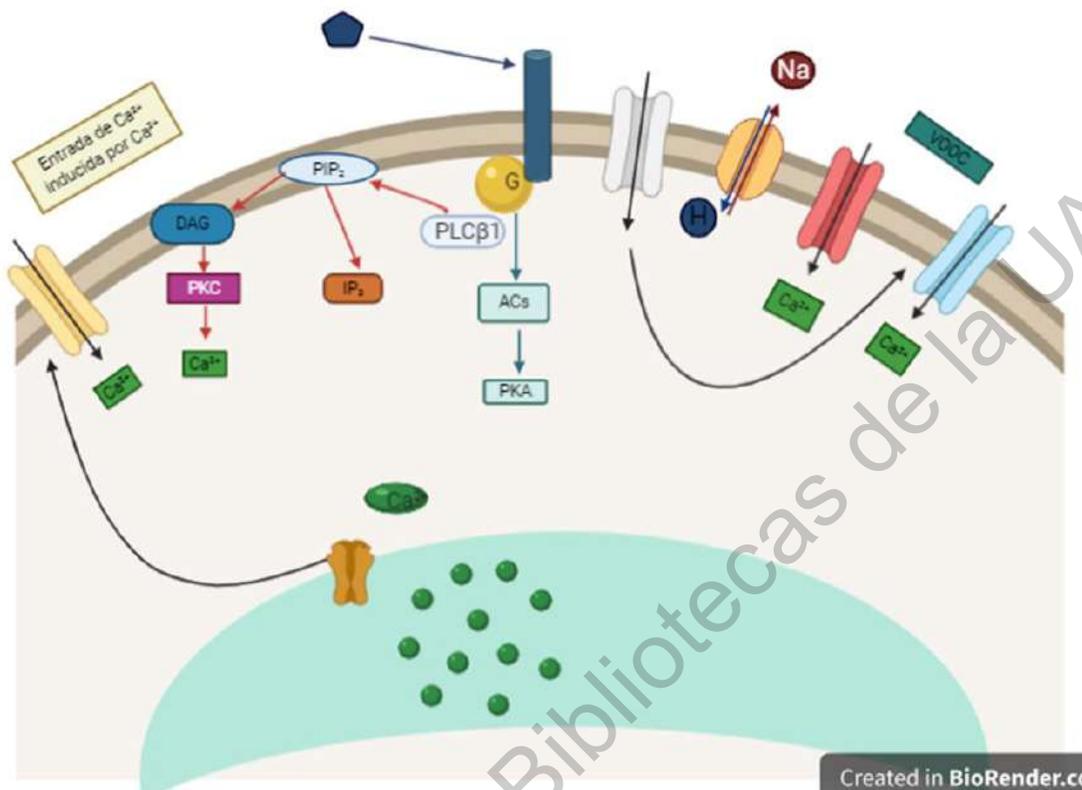
la proteína G, que en conjunto activan la enzima fosfolipasa C (PLC) que a su vez produce

la hidroxilación del fosfatidil inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) obteniendo como resultado la producción de

inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) como se observa en la figura 5. La producción de DAG lleva a la activación de la proteína quinasa C (PKC) abriendo un canal en la membrana plasmática dependiente de voltaje a través del cual se permite el ingreso a grandes concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. En respuesta a ello, conjuntamente la proteína quinasa A (PKA) y el IP<sub>3</sub>, estimulan la apertura de canales en la membrana acrosomal, contrarrestando las altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el acrosoma. Esta acción activa una entrada capacitante de Ca<sup>2+</sup> que se localiza en la membrana plasmática (Darszon et al., 2011).



**Figura 4. Vías de señalización en la RA.** La Pg y las proteínas de la ZP inducen la RA de forma fisiológica. Las proteínas de ZP y la Pg se unen a su receptor, incrementan la entrada de Ca<sup>2+</sup> al espacio intracelular y a su vez activan los Receptores IP<sub>3</sub>, permitiendo la salida de Ca<sup>2+</sup> del acrosoma. Figura modificada de Simons et al., 2018.



*Figura 5. Cascadas de señalización y mecanismos moleculares implicados en la fusión de membranas espermáticas en la RA. Al unirse el ligando al receptor acoplado a la proteína G se activa la enzima PLC que hidroliza a PIP<sub>2</sub> obteniendo DAG Y IP<sub>3</sub>. El IP<sub>3</sub> promueve la liberación de Ca<sup>2+</sup> del acrosoma y activa una segunda entrada de Ca<sup>2+</sup> al espacio intracelular. DAG activa a PKC y actúa favoreciendo el incremento intracelular de Ca<sup>2+</sup>. El receptor acoplado a la proteína G promueve el aumento la producción de ACs y se activa a PKA, misma que promueve la fosforilación de proteínas de la membrana. El receptor acoplado a proteína G activa canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (VOOC) permitiendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula. La despolarización de la membrana activa un canal iónico de Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>, que produce una alcalinización del pH intracelular. Figura modificada de Gupta et al., 2011.*

La proteína G, a su vez activa un intercambiador de sodio/hidrogeno (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) en la membrana plasmática, estimulando la alcalinización del pH en el citosol. El Ca<sup>2+</sup> autorregula su salida de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal a través de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de ATP y de los intercambiadores de H<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup>. La PKA fosforila los residuos de serina de las proteínas y estas a la vez fosforilan los residuos de tirosina de las proteínas del citosol, que en conjunto con el aumento de Ca<sup>2+</sup> y de pH favorecerán la fusión de la membrana citoplasmática y la membrana acrosomal externa, liberando el contenido enzimático del acrosoma (Gupta & Bhandari, 2011). Solamente los espermatozoides que

presentan la RA son los que tienen la capacidad de atravesar las capas externas del óvulo fusionarse con membrana plasmática del ovocito y llevar a cabo la fecundación (Oehninger et al., 2014).

### **Efecto del sobrepeso, la obesidad y las dislipidemias sobre la RA.**

En la actualidad la cantidad de estudios que evalúan la relación entre el sobrepeso y la obesidad en asociación con las pruebas de funcionalidad espermática es muy limitado. Uno de los pocos estudios reportados, que se han desarrollado en humanos es el publicado en el año 2014 por Samavat y colaboradores, en dicho estudio evaluaron la RA inducida con Pg en espermatozoides de hombres que presentan obesidad mórbida ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ), en sus resultados reportan que estos espermatozoides presentan una capacidad significativamente reducida para responder a la Pg como estimulante en de la RA, así mismo informan que los espermatozoides mostraron niveles significativamente más altos de RA espontánea, es decir sin la presencia del inductor Pg, en comparación con los hombres delgados ( $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ) (Samavat et al., 2014).

En modelo murino Fan y colaboradores en el 2015 indujeron obesidad a un grupo de ratones administrando una dieta alta en grasas, indujeron la RA utilizando el ionóforo de calcio A23187 y evaluaron la RA utilizando dos tinciones, una de ellas fue con el colorante Azul de Coomassie y la otra por la tinción con FITC-PNA. En la evaluación de la RA los resultados de ambas tinciones fueron concordantes, ambas evaluaciones mostraron que al grupo de ratones a los que indujeron obesidad presentaron un porcentaje significativamente menor de RA en comparación con el grupo control (Fan et al., 2015).

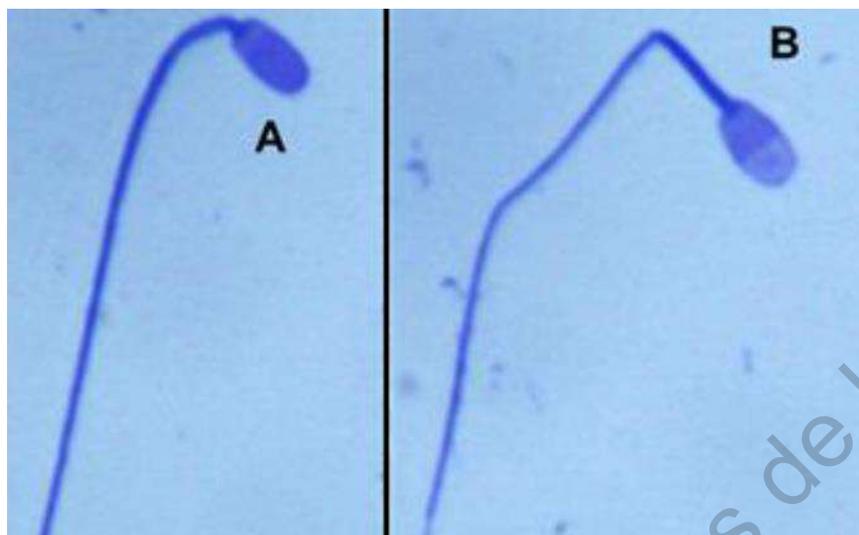
### **Importancia de la cuantificación de la RA.**

En la actualidad existen diversas pruebas que permiten evaluar la funcionalidad del espermatozoide, se les conoce como ensayos funcionales de espermatozoide. La Organización Mundial de la Salud ha clasificado estas pruebas como pruebas de investigación (Franken & Oehninger, 2012). El objetivo de estas pruebas es predecir el potencial de fertilización del gameto masculino, una de las pruebas funcionales desarrolladas es la prueba de RA (Oehninger et al., 2000; Talwar & Hayatnagarkar, 2015). En un meta

análisis publicado por Oehninger en el año 2000 se observó que las pruebas de RA presentan una correlación significativa de .458 con la tasa de fertilización y un poder predictivo con una sensibilidad del 80% referente a la capacidad que tiene el espermatozoide para fecundar al óvulo maduro en un procedimiento *in vitro*. Diversos estudios han demostrado que la morfología adecuada del acrosoma y una RA correcta son indispensables para lograr una fertilización exitosa. Respaldo lo antes mencionado, algunos estudios indican que hombres infértiles comúnmente presentan altos porcentajes de espermatozoides con morfología acrosomal anormal (Chen et al., 2019; Tello-Mora et al., 2018).

### **Evaluación de la RA.**

Existen técnicas que permiten evaluar el estado de la RA , entre ellas se encuentran: (1) el marcaje con lectinas fluorescentes como la lectina *Pisum sativum* aglutinina marcada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) para la cual es necesario usar un microscopio de fluorescencia (Cross, Morales, Overstreet, & Hanson, 1986) y (2) el uso de anticuerpos monoclonales (anti-CD46 o anti-GB24) para proteínas específicas de la membrana interna del acrosoma empleando la microscopía electrónica o citometría de flujo (Talwar & Hayatnagarkar, 2015). El uso de dichas técnicas se utiliza principalmente en las áreas de investigación, ya que requieren de equipos y reactivos de alto costo, siendo esto una limitante que impide implementar la prueba de RA en laboratorios de baja complejidad. Por las limitaciones que presentan las técnicas mencionadas anteriormente, se ha implementado un método confiable y económico que permite determinar el estado acrosomal a través de una tinción con el colorante azul de Coomassie (Larson & Miller, 1999). En el año 2014 Fumuso y colaboradores indujeron RA en espermatozoides de llama y evaluaron la reacción usando la tinción de Azul de Coomassie cómo es posible observarla en la figura 6 (Fumuso et al., 2014).



*Figura 6. RA en espermatozoide de llama evaluada con el colorante Azul de Coomassie. A) En la imagen se observa un espermatozoide no reaccionado, la coloración azul uniforme permite observar que la cabeza y membranas del espermatozoide se encuentran intactas. B) En la imagen se observa un espermatozoide que presenta RA, en la cabeza del espermatozoide se observan dos tonalidades de azul, que permiten observar la RA. La tonalidad azul más fuerte solo tiñe el núcleo del espermatozoide. La tonalidad más baja de azul nos indica la ausencia de las membranas plasmática y acrosomal, esto como resultado de la RA. Figura modificada de Famuso y colaboradores 2014.*

En la tinción del acrosoma por azul de Coomassie, el colorante se impregna mediante interacciones electrostáticas de los grupos sulfónicos del tinte a los grupos cargados de proteínas, produciendo una coloración sobre el acrosoma. El colorante azul de Coomassie es un pigmento a base de trifenilmetano, que se reacciona uniéndose por enlaces no covalentes a los residuos de lisina de las proteínas y da como resultado la formación de un complejo azul (Brum M. et al., 2006).

## **HIPOTESIS.**

El porcentaje de la RA espontánea aumentará en hombres que presenten dislipidemias, sobrepeso y obesidad mientras que la RA inducida por Pg disminuirá en espermatozoides de hombres con dislipidemia, sobrepeso y obesidad.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Determinar los efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemias sobre la RA del espermatozoide humano.

### **Objetivos específicos.**

1. Determinar los efectos que producen en conjunto las dislipidemias, el sobrepeso y la obesidad en los parámetros espermáticos evaluados en el espermiograma.
2. Estandarizar la tinción con el colorante Azul de Coomassie para la cuantificación de la RA en espermatozoides humanos.
3. Determinar el porcentaje de RA inducida por 15  $\mu$ M de Pg en espermatozoides de hombres con dislipidemias, sobrepeso y obesidad.

## **METODOLOGÍA.**

### **Tipo de estudio y Tamaño de la Muestra.**

El presente estudio es un estudio transversal, exploratorio. A través de una convocatoria dirigida a la población masculina se invitó a participar en el estudio. El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa OpenEpi versión 3. Considerando un intervalo de confianza del 90% y un margen de error del 10% se calculó una muestra de 68 participantes. Sin embargo, al ser un estudio dirigido no probabilístico, no se tiene la certeza de contar con todos los participantes. Por ello, se determinó el tamaño de la muestra a conveniencia, logrando reclutar un total de 25 participantes.

### **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.**

Dentro de los criterios de inclusión se especificó que los participantes deben tener un rango de edad de 18 a 45 años, como un requisito indispensable se solicitó firmar el consentimiento informado. Así mismo, se les solicitó a los participantes que al momento de obtener la muestra de semen presentaran un rango de 2 a 7 días de previa abstinencia sexual. Se excluyeron muestras de semen provenientes de donadores que no cumplieran con un mínimo de 48 horas de abstinencia. De igual manera, se excluyó la participación de hombres que informaron el consumir de algún tipo de droga o que expresaron el padecer alguna enfermedad de transmisión sexual. No se permitió participar en el estudio a hombres que no aceptaron firmar el consentimiento informado.

### **Consideraciones Éticas.**

El proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. En el desarrollo de la investigación se emplearon muestras biológicas de sangre y semen por lo que se les explicó a los participantes meticulosamente el uso de la muestra. Se dejó claramente establecido que no se extraería ni procesaría el ADN de las respectivas muestras.

### **Métodos.**

Este proyecto fue realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro y fue aprobado por el comité de Investigación y Posgrado de la facultad antes mencionada.

En primera instancia se lanzó una convocatoria abierta al público en general, así como también fue difundida entre la población estudiantil de la Facultad de Medicina.

Al aceptar participar en el proyecto, se le explicó al participante detalladamente en que consiste el proyecto, el área que se estudia y los beneficios que obtendría de participar en él. Una vez establecido lo anterior se le solicitó al participante una firma de conformidad en la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

Enseguida se establecieron las próximas citas para armar el historial clínico del participante, toma de medidas antropométricas, así como la obtención de muestras de sangre y semen.

### **Historial Clínico.**

Se citó al participante en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Celular localizado en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se les aplicó a los participantes un formato de historial clínica, que contenía preguntas relacionadas con temas de fertilidad, antecedentes familiares, antecedentes médicos, así como preguntas relacionadas con el estilo de vida (Anexo 2). Enseguida se pesó al participante, obteniendo su peso en kilogramos, así mismo también se le realizaron medidas antropométricas para obtener su estatura, la circunferencia de su cintura y cadera, todas estas medidas fueron obtenidas en centímetros (cm), con el objetivo de calcular el IMC.

### **Obtención de muestra de sangre.**

Se solicitó al participante se presentara con un ayuno de 8 h, para realizar la toma de muestra sanguínea. Enseguida se colocó el torniquete en la parte superior del antebrazo, se localizó la vena, y se realizó la sepsis en el área con una torunda impregnada de alcohol. Posteriormente se realizó la toma de muestra por Vacutainer, los tubos empleados fueron tubos de tapa amarilla (BD Vacutainer SST, 6.0 mL). Al llenarse el tubo, se retiró inmediatamente el torniquete y la aguja se sacó de la vena cuidadosamente. Después de obtener la muestra de sangre se dejó reposar hasta su coagulación (30 min aproximadamente). Una vez coagulada la muestra de sangre se procedió a centrifugarla por un lapso de tiempo de 10 min a una velocidad de 2000 rpm. Al terminar la centrifugación se obtuvo el suero (Aproximadamente 3 mL) y se dividió en 2 alícuotas de 1.5mL, ambas alícuotas se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -80 °C hasta su análisis.

### **Recolección de la muestra se semen.**

En la primera sesión solamente se obtuvo la información del historial clínico y la muestra de sangre, por lo que se agendó la segunda cita, en la que el participante entregó la

muestra de semen. Se le proporcionó al participante un frasco de toma de muestra nuevo y completamente estéril, se le hizo el recordatorio de cumplir como mínimo con 48 h de abstinencia al momento de obtener la muestra de semen, y que debía transportar la muestra pegada al cuerpo durante el tiempo que demora en llegar a entregarla, también se le recordó que de preferencia no debía de pasar más de 60 min del momento de la toma de muestra hasta el momento de entregarla. Una vez obtenida la muestra de semen, se rotuló correctamente y se inició con el espermiograma.

### **Espermiograma.**

#### **Examen macroscópico.**

Se realizó el examen microscópico inicial siguiendo los parámetros que indica la OMS en el manual para el análisis de semen.

#### **Licuefacción:**

Se mezcló la muestra del semen en el recipiente donde se recolectó con ayuda de una pipeta paster y se midió el tiempo que tardó en licuar, es decir, en pasar de una consistencia viscosa a una más líquida.

#### **Aspecto:**

Se examinó la coloración que presentó la muestra de semen siguiendo los siguientes lineamientos, si la coloración se tornó gris opalescente se consideró una muestra con aspecto normal, en cambio si la coloración era gris opaco se consideró una muestra con baja concentración de espermatozoides, si la muestra se tornaba color marrón esto era indicativo de contenido de glóbulos rojos, y si la coloración era amarilla esto nos indica ictericia o un alto consumo de vitaminas. Después de evaluar el aspecto de la muestra de semen, proseguimos a evaluar el volumen de la muestra.

#### **Volumen y viscosidad:**

Con una pipeta estéril de 5 mL aspiramos la muestra y medimos el volumen, enseguida se dejó caer unas gotas de la muestra en caída libre, con el fin de valorar la

viscosidad de la muestra, si la viscosidad de la muestra es normal, se observan gotas pequeñas, en cambio, cuando las muestras forman filamentos mayores a 2 cm se considera muestra viscosa.

#### **pH:**

Se evaluó el pH de la muestra de semen, para ello se colocó una gota de semen en una tira reactiva de pH, se esperó 30 s aproximadamente hasta que se presentó el cambio de coloración en la tira reactiva, posteriormente se comparó la coloración de la tira reactiva con la cartilla indicadora de pH. Con la evaluación de pH se concluyó la evaluación macroscópica de la muestra de semen y se prosiguió con la evaluación microscópica.

#### **Análisis Microscópico:**

Se realizó el análisis microscópico siguiendo los parámetros que indica la OMS en el manual de laboratorios para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical 5ta edición.

#### **Motilidad:**

Se mezcló correctamente la muestra y se tomaron 10  $\mu$ L de semen con una micropipeta, enseguida se colocó la muestra en un portaobjetos de 22mm por 22mm y se colocó el cubreobjetos, se analizó la movilidad en un estudio microscópico, para lo cual se utilizó un microscopio óptico, se enfocó la muestra en un objetivo de 10x y posteriormente en el de 40x, se evaluaron 5 campos con la finalidad de contabilizar cuantos espermatozoides se observaban en total. Al terminar de contabilizar los 5 campos, se inició un nuevo conteo para evaluar la motilidad de los espermatozoides, para ello se contó un total de 200 células, al ir contando los espermatozoides se clasificaron de acuerdo a la motilidad que presentaron según las siguientes categorías:

- Motilidad progresiva: Espermatozoides que se mueven activamente, de forma lineal o circular, independientemente de la velocidad de desplazamiento.

- Motilidad no progresiva: Espermatozoides que presenta distintos patrones de motilidad con ausencia de progresión, por ejemplo: nadar en círculos pequeños, la fuerza flagelar mueve muy poco la cabeza o solamente se aprecia un latido flagelar.
- Inmotilidad: espermatozoides que no presentan movimiento.

### **Concentración espermática:**

Dependiendo del número de espermatozoides contados en la evaluación de 5 campos se diluyó la muestra a la concentración adecuada:

- ✚ >101 = 1:20 o 50  $\mu\text{L}$  de muestra – 950  $\mu\text{L}$  de fijativo.
- ✚ 16-100 = 1:5 o 50  $\mu\text{L}$  de muestra - 200  $\mu\text{L}$  de fijativo.
- ✚ 2-15 = 1:2 o 50  $\mu\text{L}$  de muestra – 50  $\mu\text{L}$  de fijativo.

La determinación de la concentración espermática se evaluó utilizando el Hemocitómetro de Neubauer, por lo que antes de comenzar se limpió el hemocitómetro con alcohol al 70% y una gasa estéril. Se colocó el cubreobjetos del hemocitómetro y posteriormente se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida y se colocó en el hemocitómetro, se dejó reposar la muestra con la finalidad de que se asienten las células. Enseguida se colocó el hemocitómetro en el microscopio óptico y se enfocó con el objetivo de 40x, para realizar el conteo correspondiente primero se determina cuantos cuadrantes de la cámara se tienen que contar, en relación a cuantos espermatozoides se ven por cuadrante:

- ✚ Si la muestra tiene menos de 10 espermatozoides por cuadrante se analizan los 25 cuadrantes
- ✚ Si se tienen de 10 a 40, contabilizar 10 cuadrantes.
- ✚ Si se tienen más de 40 espermatozoides, contabilizar 5 cuadrantes.
- ✚ Si un espermatozoide se encuentra entre la línea divisora entre los dos cuadrantes solo se contabiliza en alguno de los cuadrantes.

La muestra se contabilizó por duplicado y se obtuvo un promedio de ambos conteos, para calcular la concentración espermática en la muestra original de semen en millones/

mililitros se dividió el promedio obtenido por el factor de conversión correspondiente que indica el manual de la OMS.

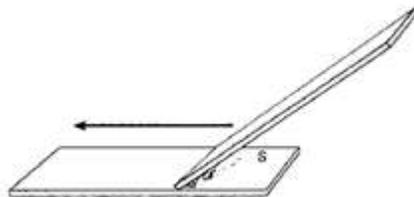
### **Vitalidad:**

La vitalidad de las células espermáticas se determinó por el porcentaje de espermatozoides que están vivos, esto se determinó por la capacidad de exclusión de algún colorante vital, como colorante se empleó el azul de tripan.

Se realizó el siguiente procedimiento: Se colocaron 90  $\mu\text{L}$  del colorante azul de tripan en un cuadro de papel para film, se le agregó 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen, se mezcló la suspensión cuidadosamente utilizando una micropipeta. Una vez mezclado se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de mezcla y se colocaron en el hemocitómetro, se dejó reposar por un lapso de 1-2 min y enseguida se prosiguió con el conteo. Los espermatozoides muertos se tiñen de color azul, mientras que los vivos no se tiñen, se contabilizó un total de 200 células entre los dos parámetros Se reportó el porcentaje de células vivas y muertas.

### **Morfología:**

Para evaluar la morfología del espermatozoide se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen y se colocaron en el extremo de un portaobjetos, enseguida se colocó un segundo portaobjetos a un Angulo de  $45^\circ$  y se arrastró la gota de semen sobre el portaobjetos como se observa en la figura 7. Se dejó secar la muestra al aire libre, una vez seca, se sumergió el portaobjetos que contiene la muestra en metanol durante 15 s con el objetivo de fijar las células, enseguida se sumergió durante 10 s en eosina y para finalizar la tinción se sumergió por 5 s en hematoxilina, se eliminó el exceso de colorantes con agua y posteriormente se dejó secar al aire libre.



*Figura 7. Preparación del frotis para la tinción de identificación morfológica de los espermatozoides. La gota de semen se distribuye sobre el filo inferior del portaobjetos inclinado y se arrastra sobre el otro portaobjetos para formar una*

extensión. Figura tomada del Manual de la OMS para el examen del semen y la interacción entre el semen y el moco cervical. 5ta edición.

Posteriormente se colocó el portaobjetos sobre el microscopio, se enfocó en el objetivo de 100x y se contabilizó un total de 200 células, entre células con morfología normal y anormal. Se consideró un espermatozoide con morfología normal cuando:

- ✚ El espermatozoide presenta una cabeza de contorno regular de forma ovalada, con un rango del 40 al 70 % correspondiente al acrosoma. Sin vacuolas grandes.
- ✚ El espermatozoide presenta una pieza media delgada y regular, del mismo tamaño de la cabeza sin residuo citoplasmático o si lo tiene que sea menor a 1/3 parte del tamaño de la pieza media.
- ✚ El espermatozoide presenta una pieza principal uniforme y más delgada que la pieza media.

En caso de no cumplir con los lineamientos anteriores se consideró que el espermatozoide presentó algún tipo de defecto en su morfología.

### **Separación de espermatozoides por Swim Up.**

En un tubo de vidrio previamente esterilizado se agregó 500  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen y 500  $\mu\text{L}$  de medio HAM's F-10 suplementado con 2mM de Calcio y 5 mg/mL de BSA. Se colocó el tubo formando un ángulo de  $45^\circ$  en una gradilla como se observa en la figura 8, se incubó por una hora a  $37^\circ\text{C}$  en una atmosfera con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire, una vez ya transcurrida la hora de incubación se tomó 600  $\mu\text{L}$  de la fase superior, se colocó en otro tubo y se homogenizó la muestra. Enseguida se tomaron 3 alícuotas 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y se colocaron en el Hemocitómetro de Neubauer, se realizó el recuento espermático de cada una de las 3 alícuotas y se calculó el promedio para ajustar la concentración espermática a 10 millones / mL. Al ajustar la concentración se prepararon los tubos que contenían 1 mL de la muestra de semen y medio HAM's suplementado, se incubaron de nuevo por un lapso de tiempo de 4 h para inducir la capacitación espermática *in vitro*.

La capacitación espermática es un proceso al que se someten los espermatozoides al pasar por el tracto reproductivo femenino, indispensable para que el espermatozoide logre la

fecundación. La capacitación se caracteriza por una serie de cambios moleculares en el espermatozoide, como lo son cambios en el flujo de iones, eliminación de colesterol, redistribución de lípidos y de proteínas en la membrana plasmática, así como activaciones de las proteínas cinasas y cambios en la permeabilidad del calcio en el espermatozoide.



**Figura 8. Técnica de separación de espermatozoides por Swim Up y capacitación espermática.** Se colocan 500µL de la muestra de semen en un tubo falcón, se le agregan 500µL de medio Ham's suplementado con BSA y Cl<sub>2</sub>Ca, enseguida se coloca el tubo en un ángulo de 45° y se incuba durante una hora con a 37°C, en condiciones de una atmósfera del 95% de aire y 5 %de CO<sub>2</sub>. Posterior a la incubación se toman 10µL de la muestra de la superficie del tubo, enseguida se colocan en la cámara de Neubauer para contar y ajustar la concentración de espermatozoides a 10x10<sup>6</sup> cel/mililitro. Una vez ajustada la concentración se incuba de nuevo el tubo que contiene la muestra durante 3 h a las condiciones antes descritas, con el objetivo de capacitar la muestra de semen.

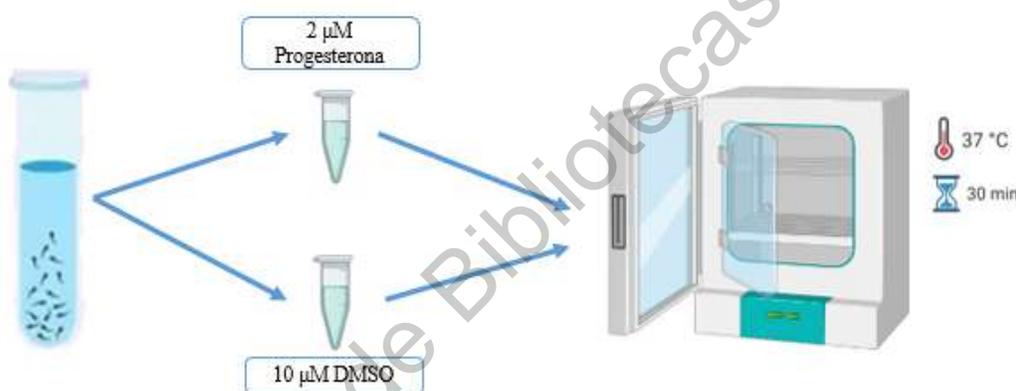
### Inducción de la Reacción Acrosomal.

Al finalizar la capacitación espermática se indujo la RA en los espermatozoides, se usó como inductor Pg, esta es uno de los inductores que la OMS permite utilizar ya que la morfología que se observa al inducir la RA con ella es muy similar a la que se presenta cuando se lleva a cabo en condiciones fisiológicas (OMS., 2010; Xu. et al., 2018). La Pg es considerada un inductor fisiológico de la RA, al activar los canales de CatSper lo que provoca un aumento en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Kirkman-brown, Emma, Barratt, & Publicover, 2002; Patrat, Serres, & Jouannet, 2000).

La metodología empleada para inducir la RA es la siguiente:

1. La suspensión de espermatozoides se dividió en alícuotas de 50µL y se incubaron en tubos de Eppendorf como se muestra en la figura 8.

2. Se hicieron alícuotas tanto de control positivo, como de control negativo. El control positivo se le agrega Pg y al control negativo se le agregó DMSO.
3. A la alícuota de control positivo se le agregaron 2  $\mu\text{M}$  de Pg.
4. A la alícuota de control negativo se le agregó 10  $\mu\text{M}$  de DMSO.
5. Se incubaron las alícuotas de control positivo y negativo durante 30 min a una temperatura de 37°C.



*Figura 9. Metodología de inducción de la RA. La RA se indujo por separado, en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen. Utilizando como inductor Pg.*

### **Tinción con el colorante Azul de Coomassie y evaluación de la Reacción Acrosomal.**

Se fijaron los espermatozoides con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugaron durante 4 min a 4,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se le añadió 1.5 mL de acetato de amonio a una concentración de 100 mM, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se eliminó el sobrenadante, el sedimento se re suspendió en 1mL de PBS y se homogenizó

suavemente. Con una micropipeta se tomaron 10 $\mu$ L de la suspensión, se colocaron en un portaobjetos y se dejó secar la muestra. Posteriormente se incubó el portaobjetos con la muestra en el colorante Azul de Coomassie (0.22% Coomassie Blue G-250) durante 4 min, se eliminó el exceso de colorante con agua destilada y se dejó secar. Al estar ya completamente seco se observó al microscopio óptico enfocado en el objetivo de 100x. Enseguida se contó el número de espermatozoides que presentaron RA inducida por Pg, así como la RA que se presentó en las muestras que no se les agregó ningún inductor, posteriormente se calculó el porcentaje de RA en cada uno de los 4 grupos.

### **Análisis estadístico.**

Se analizaron los datos para obtener la estadística descriptiva y se realizaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov –Smirnov y Shapiro Wilk) para determinar la distribución de los datos en cada una de las variables estudiadas. Se buscaron asociaciones entre las diferentes variables evaluadas a través de la prueba de correlación de Pearson ( $p < 0.01$ , CI = 95%). Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS v.15.

## Resultados

Los resultados que se presentan a continuación son los obtenidos del análisis estadístico realizado con un total de 25 participantes con una edad promedio de  $23.92 \pm 4.58$  años, con un intervalo de 18 a 36. En la tabla 1 se muestra la estadística descriptiva de las variables antropométricas evaluadas, así como las variables evaluadas a través del espermograma. De los 25 participantes 12 de ellos conformaron el grupo control o normopeso, 11 presentaron sobrepeso y solamente 2 de ellos obesidad.

*Tabla 1. Características Antropométricas y Parámetros Espermáticos.*

Parámetro	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
Edad (Años)	25	18	36.0	23.9	4.5
Peso (Kg)	25	59.5	100.0	77.9	10.8
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25	19.3	32.1	25.5	3.2
Volumen (mL)	25	.6	4.1	2.5	1.0
Motilidad progresiva	25	21	76.0	52.5	14.3
Motilidad NP	25	10	33.0	18.7	5.7
Inmotilidad	25	9.0	66.0	28.6	15.6
Concentración	25	9.4	160.0	71.0	36.6
Concentración Total	25	7.5	464.0	184.1	112.7
RA Espontánea	25	10	42.0	21.3	8.1
RA Inducida	25	13	39.0	28.5	7.7
Morfología Normal	25	8	41.0	18.8	7.3
Morfología Anormal	25	59	92.0	80.7	7.7
Grasa	25	9.2	38.0	21.0	6.1
Grasa Visceral	25	1	14.0	5.0	3.1
ARPC	25	-28	22.0	7.2	13.7

En la tabla número 2 se ilustran los parámetros evaluados en la Bioquímica Sanguínea y perfil lipídico, así como sus medidas de tendencia central. Dentro del análisis bioquímico, solamente se contó con 24 muestras, ya que una de las muestras no fue suficiente para su análisis.

Tabla 2. Bioquímica Sanguínea y perfil de lípidos.

Parámetro	Mínimo	Máximo	Media	DS
Glucosa 70 -100 mg/dL	77.0	107.00	90.00	7.56
Urea 10 – 50 mg/dL	20.0	47.00	30.29	7.98
Creatinina 0.5 – 1 mg/dL	0.60	1.40	1.008	0.24
Ácido Úrico 2.5 -6.2 mg/dL	4.90	9.30	6.62	1.25
Colesterol 0 – 200 mg/dL Recomendable 200 – 239 mg/dL Límitrofe ≥240 mg/dL Alto riesgo	98	237	168.79	39.04
HDL 35 - 75 mg/dL Recomendable < 35 mg/dL Alto riesgo	29	50	41.20	5.54
LDL 0 – 130 mg/dL Recomendable 130 - 159 mg/ dL Límitrofe ≥ 160 mg / dL Alto riesgo ≥ 190 mg/ dL Muy alto riesgo	41.80	175.60	103.12	35.65
VLDL 0 – 30 mg/dL recomendable	8.20	95.40	24.45	17.88
Índice Aterogénico ≤ 4 Recomendable	2	6	4.08	1.05
Triglicéridos 0 – 150 mg/dL Recomendable 150-200 mg/dL Límitrofe > 200 mg / dL Alto riesgo > 1000 mg/dL Muy alto riesgo	41	477.00	122.29	89.41
Testosterona 0.47 – 9.8 ng/mL Recomendable	2.43	6.97	4.56	1.25

En la figura 10 se ilustran los niveles encontrados tanto en la química sanguínea como en el perfil de lípidos de los participantes, respecto a los niveles de referencia reportados en población mexicana. Reportamos que 15 de los participantes presentaron niveles superiores

a los referenciados en ácido úrico, 12 para creatinina, 9 para el índice aterogénico, 7 para colesterol y LDL, 3 para VLDL y glucosa, 1 para triglicéridos. De igual forma, se encontraron niveles por debajo de los valores de referencia de HDL en 3 participantes.

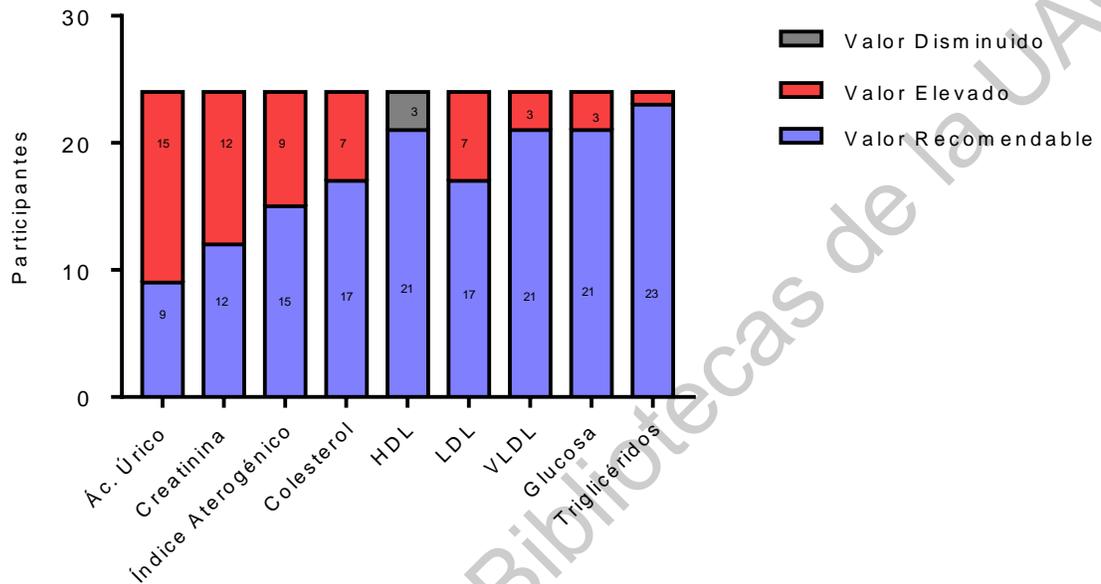


Figura 10. Estado de niveles de la Química Sanguínea y el perfil de lípidos respecto a sus valores de referencia correspondientes. HDL: Lipoproteínas de alta densidad.; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico nos muestran correlaciones positivas entre el aumento de porcentajes de RA espontánea con el incremento de variables antropométricas como el peso, IMC, porcentaje de grasa y grasa visceral.

Así mismo, se observa una correlación negativa entre la disminución de las variables antropométricas antes mencionadas y los porcentajes de la RA inducida, en la figura 11 se ilustran estos resultados.

Dentro de las correlaciones positivas encontradas, la correlación estadísticamente más fuerte es la que asocia el aumento de la grasa visceral con el incremento del porcentaje de RA espontánea. Esta correlación presenta una  $R^2$  lineal = 0.626,  $P=$  que es posible observar en la figura 12. El resultado nos indica que, al aumentar el nivel de grasa visceral en el individuo, los porcentajes de RA espontáneo también se incrementan. En la gráfica se aprecia

que al presentarse un aumento de dos niveles de grasa visceral se eleva hasta en un 10% la RA espontánea.

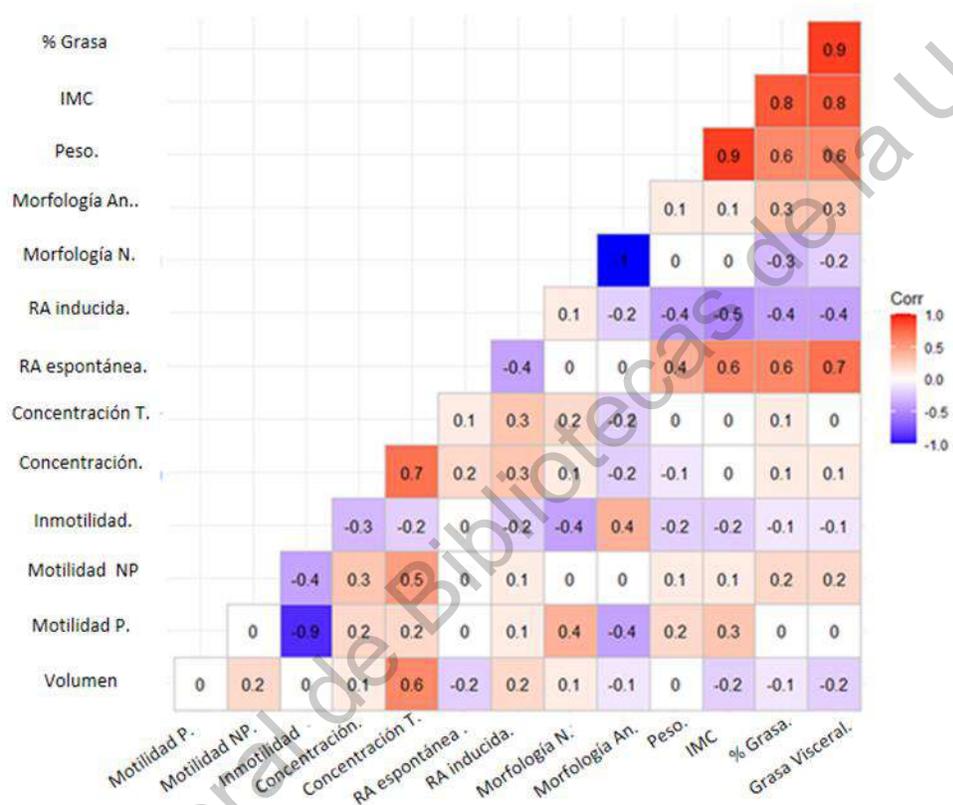


Figura 11. Matriz de correlación entre parámetros espermáticos y características antropométricas. Las correlaciones positivas se muestran en colores cálidos y las correlaciones negativas en colores fríos.

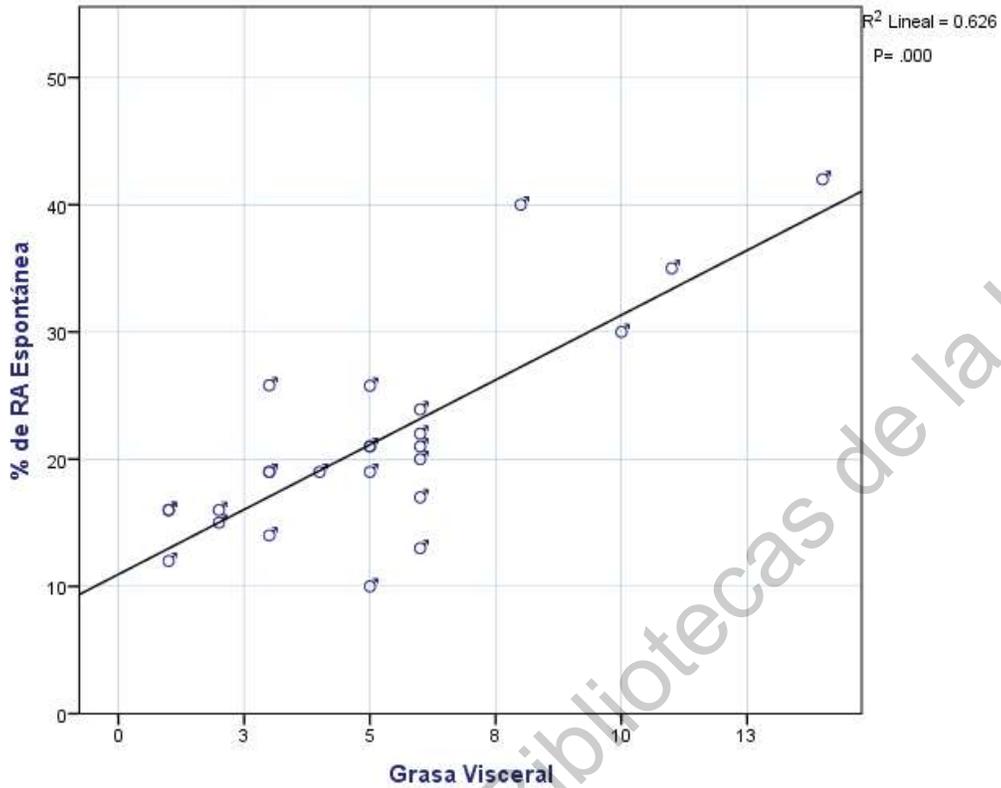


Figura 12. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y grasa visceral. Al ir incrementando la grasa visceral en el organismo el porcentaje de RA espontánea aumenta, lo que nos indica una asociación positiva entre ambas variables.

En los resultados que se han mostrado significativos estadísticamente en el análisis, se ha encontrado una correlación positiva entre el aumento del IMC y la RA espontánea. En la figura 13 es posible observar estos resultados. Así mismo, el gráfico nos muestra que cuanto más elevado es el IMC los porcentajes de RA espontánea son más elevados, esto en comparación con los porcentajes que corresponden a un IMC que indican normo peso.

Al analizar la relación entre los porcentajes de grasa corporal de los individuos y la RA espontánea encontramos que existe una importante correlación positiva entre ambos parámetros. En la figura 14, es posible observar que conforme aumentan los porcentajes de grasa se mantiene una tendencia a aumentar en los porcentajes de RA espontánea, esta tendencia es más palpable a partir del 30% de grasa, además, es posible observar en la gráfica que se mantiene cierta tendencia de similitud entre los porcentajes de grasa y los porcentajes de RA espontánea.

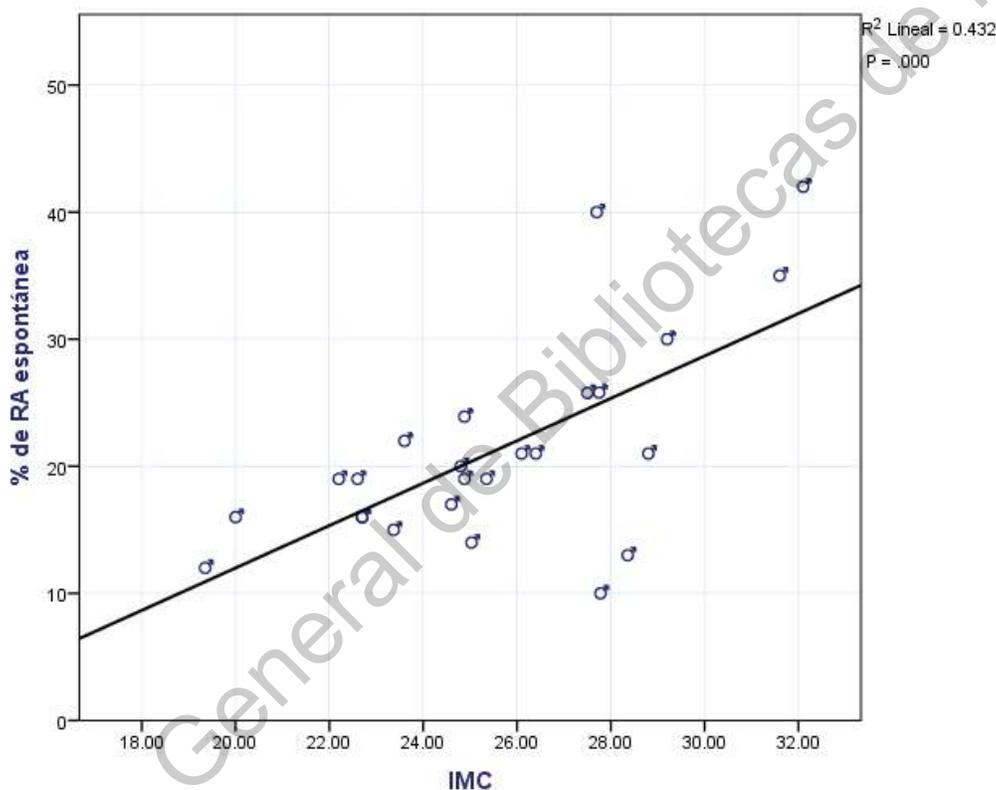


Figura 13. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y el IMC. Al aumentar el IMC se presenta un notorio aumento en los porcentajes de RA espontánea.

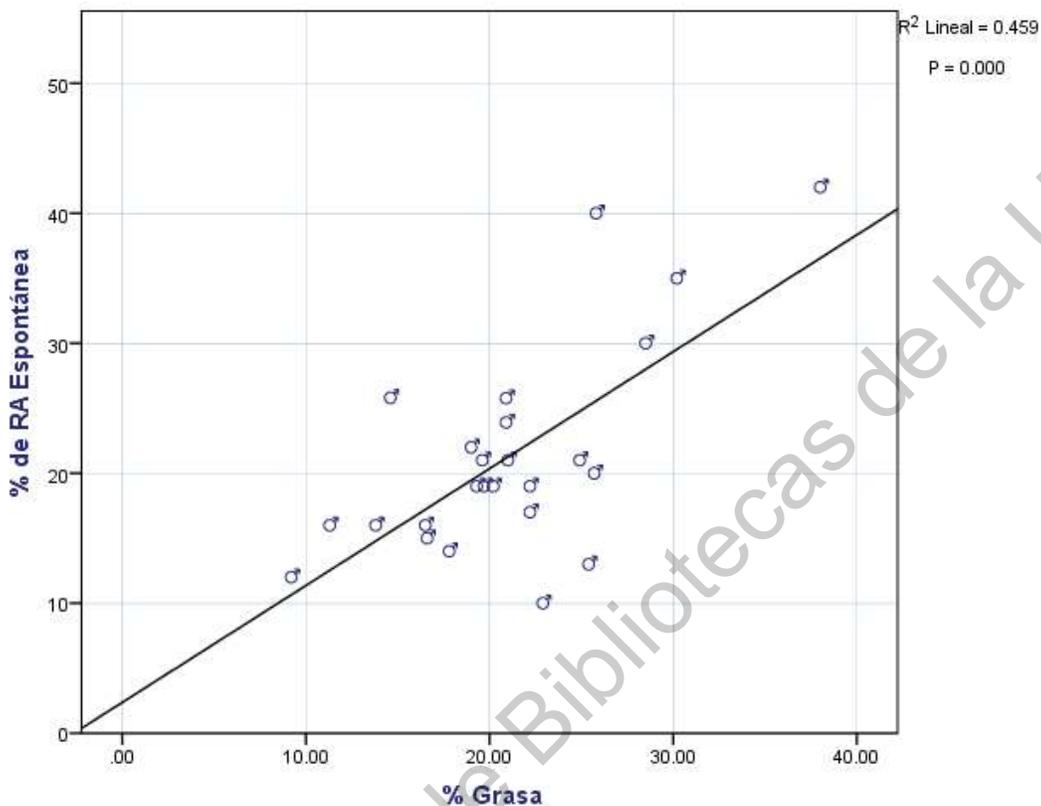
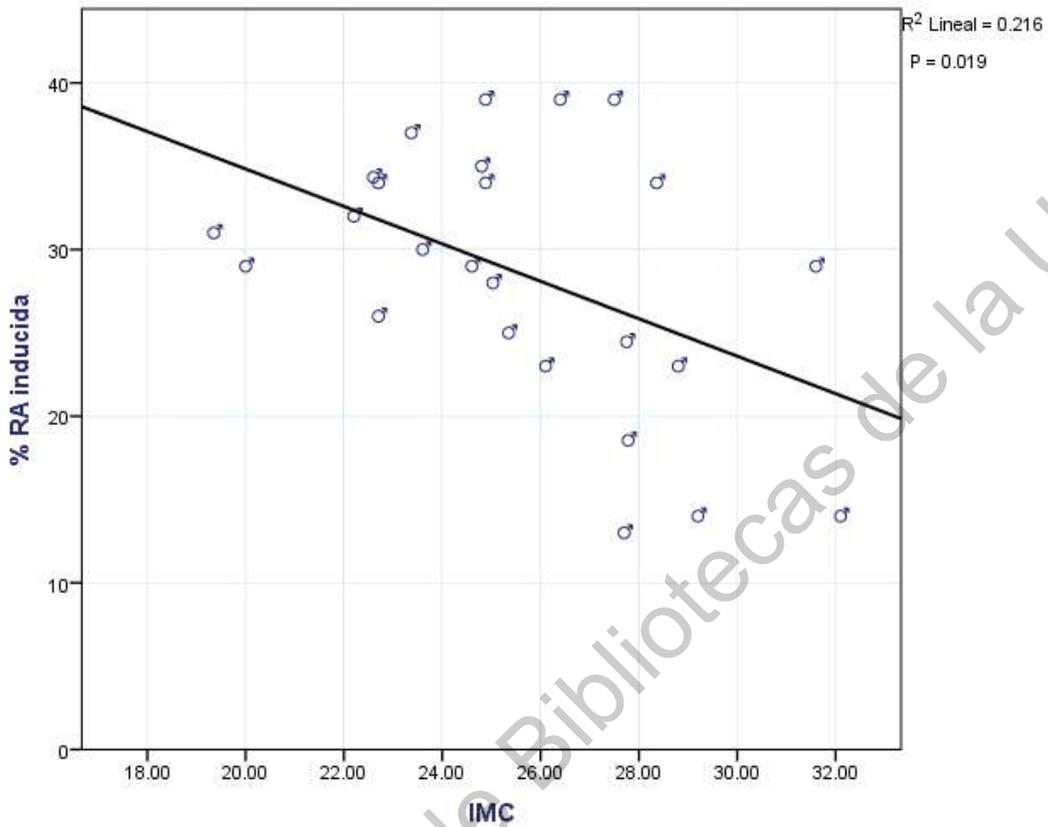


Figura 14. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y el % de grasa corporal.

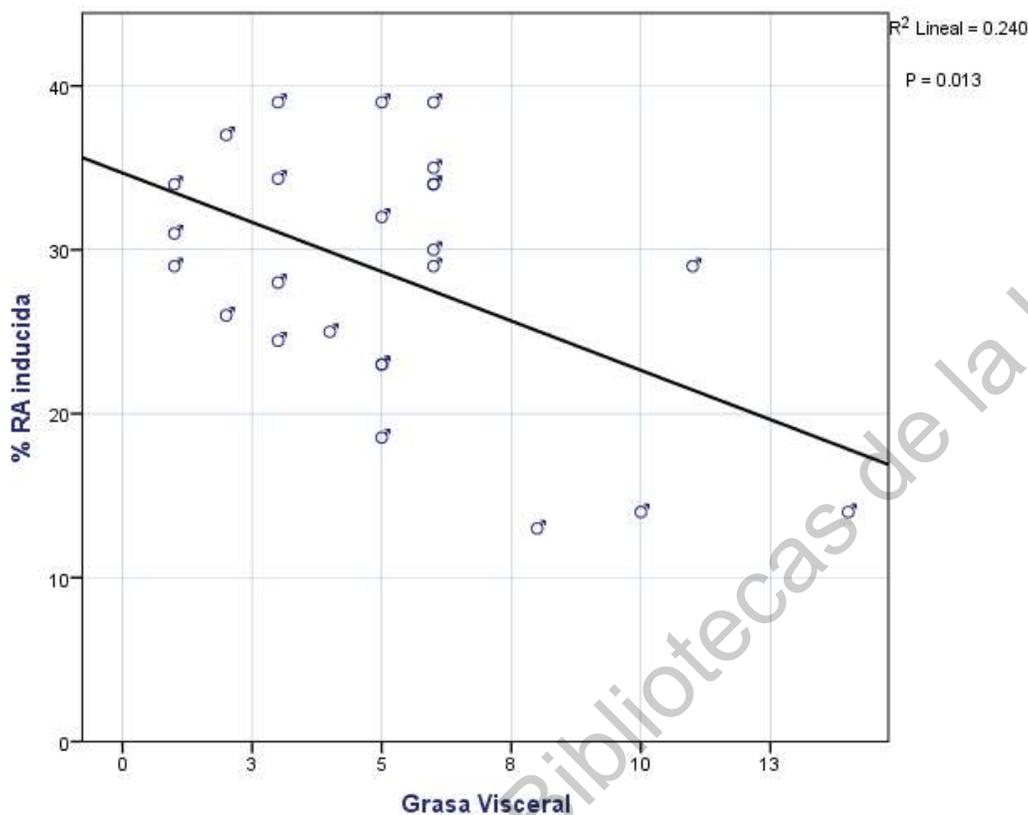
Dentro del análisis realizado, encontramos estadísticos que nos indican correlaciones negativas entre algunos parámetros, si bien, estas correlaciones no son tan fuertes como las expuestas anteriormente, son estadísticamente significativas.

La correlación negativa estadísticamente significativa más fuerte que se encontró es la que indican una correlación entre el IMC y el porcentaje de RA espontáneo ( $R^2$  lineal = 0.216;  $P=0.019$ ). En la figura 15, es posible observar que al aumentar el IMC se presenta una marcada disminución en los porcentajes de RA inducida. Se percibe una disminución de hasta el 20% de RA inducida dentro de los valores del IMC que tienden al sobrepeso y a la obesidad en comparación con los valores de normo peso.



*Figura 15. Relación entre el IMC y el porcentaje de RA inducida. Se percibe una marcada disminución en los porcentajes de RA que se induce al aumentar el IMC.*

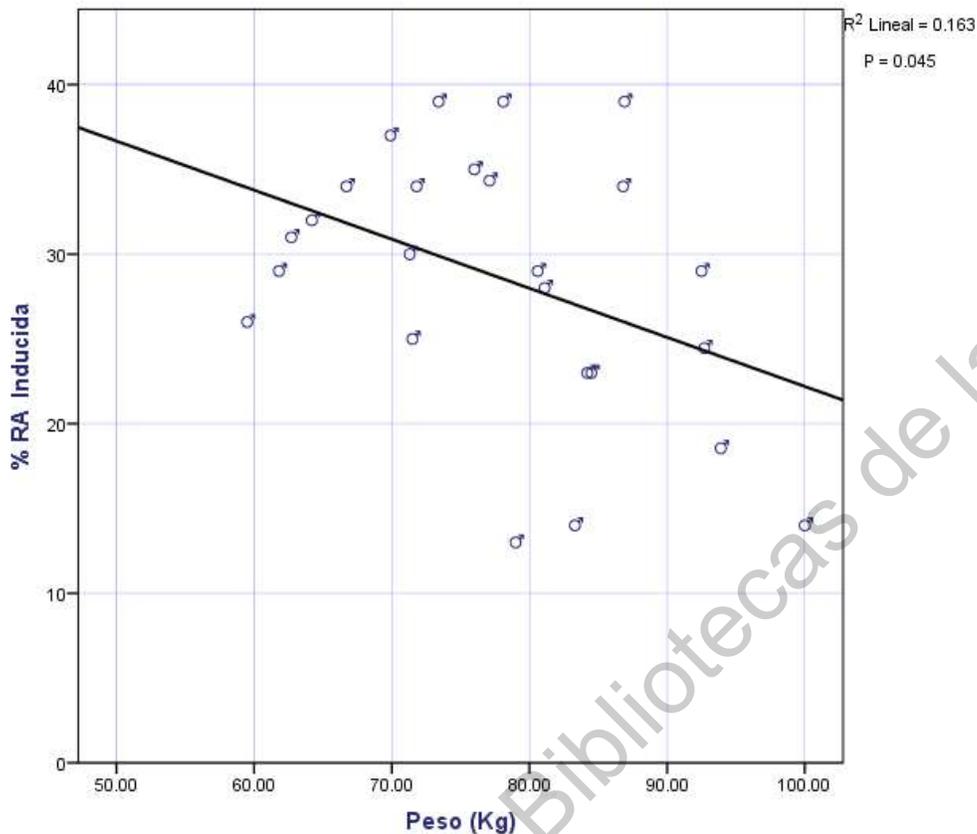
Al evaluar la correlación existente entre la grasa visceral y el porcentaje de RA inducida se encontró una correlación negativa entre ambas variables ( $R^2$  lineal = - 0.490;  $P = 0.013$ ), observando que conforme se presenta un aumento en la grasa visceral los porcentajes de RA inducida tienden a disminuir notablemente, como se observa en la figura 16.



*Figura 16. Relación entre el porcentaje de RA inducida y la grasa visceral. Se observa una correlación negativa entre el aumento de la grasa visceral y la disminución del porcentaje de RA inducida.*

Por otro lado, se encontró una asociación negativa entre el porcentaje de RA inducida y el aumento del peso corporal ( $R^2$  lineal = 0.163;  $P = 0.045$ ). Como es posible observarlo en la figura 17, conforme se aumenta el peso, se presenta una disminución en los porcentajes de RA inducido.

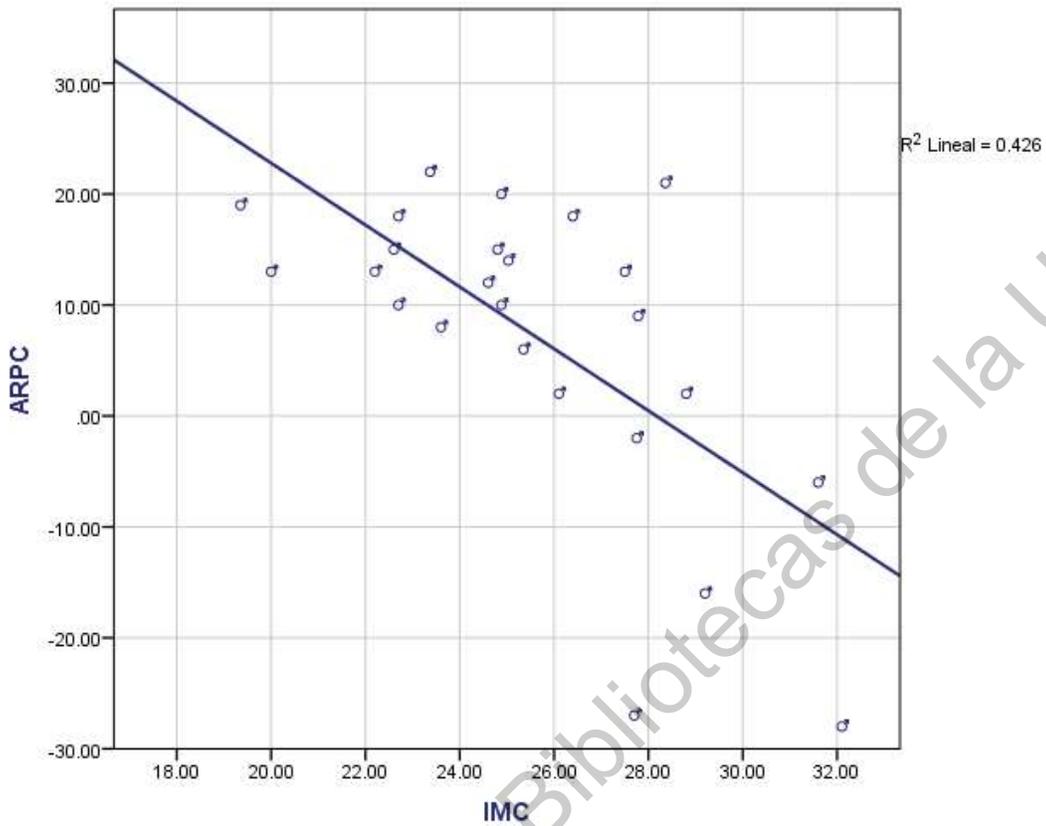
Al determinar el ARPC restando el porcentaje de RA espontáneo al porcentaje de RA inducido por progesterona se encontró una correlación negativa entre el porcentaje de ARPC y el IMC del individuo. Como se observa en la figura 18, al ir aumentando el IMC los porcentajes de ARPC disminuyen, presentando una notable disminución en los porcentajes de ARPC al acercarse a un IMC de 30. En la gráfica es posible observar que los porcentajes de ARPC más altos se localizan en los IMC que la OMS considera indican el normopeso.



*Figura 17. Relación entre el porcentaje de la RA inducida y el peso de los individuos. Se observa una disminución en el porcentaje de RA inducida al aumentar el peso.*

En los gráficos mostrados hasta este punto, se han presentado las correlaciones encontradas entre las variables espermáticas y las diferentes características antropométricas empleadas en nuestro estudio.

Enseguida se presentan los diferentes gráficos obtenidos a partir del análisis estadístico correspondiente a las variables espermáticas, química sanguínea y perfil de lípidos. Los resultados producto del análisis de las variables antes mencionadas nos arrojaron diversas correlaciones positivas estadísticamente significativas, en la tabla número 3 se muestran las diferentes correlaciones encontradas.

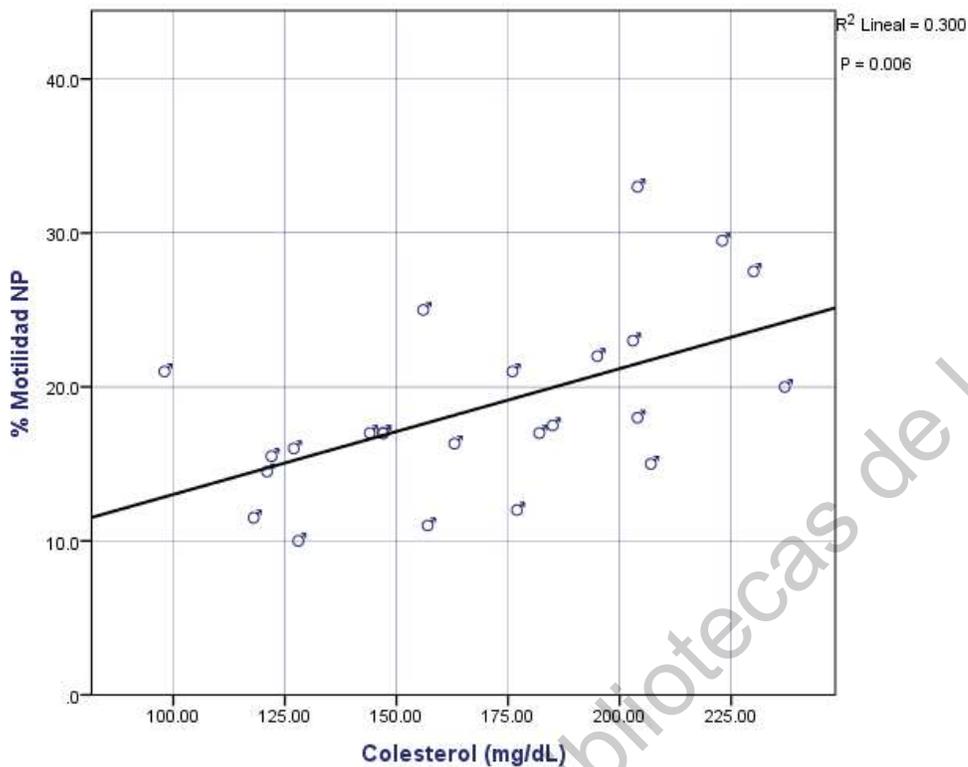


*Figura 18. Relación entre el porcentaje de ARPC y el IMC. Se observa que al incrementarse el IMC se disminuye el porcentaje de espermatozoides que reaccionan a la progesterona (ARPC) por lo que se ilustra una asociación negativa entre ambas variables.*

La asociación que manifiesta la correlación estadísticamente más fuerte es la que asocia al porcentaje de motilidad espermática no progresiva y al nivel de colesterol. Esta correlación positiva presenta una  $R^2$  lineal de 0.300 y una  $P = 0.006$ , esto es posible observarlo en la figura 19. Así mismo, en esta gráfica es posible observar que, al presentarse un aumento en las concentraciones de colesterol, a la par, se produce un incremento en el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva.

Tabla 3. Asociaciones encontradas entre perfil bioquímico, lipídico y parámetros espermáticos.

		Vol.	Mot. Prog	Mot. NP	Inm	Con.	Con. Total	RA Esp.	RA. Ind	Mor. Nor	Mor. An.
<b>Glucosa</b>	r	-.061	.171	.148	.104	-.062	-.069	-.011	.162	.009	-.009
	p	.776	.424	.491	.627	.774	.750	.960	.450	.968	.968
<b>Urea</b>	r	.103	.113	.156	-.163	-.196	-.054	.038	-.020	.165	-.165
	p	.633	.599	.465	.446	.358	.802	.861	.927	.442	.442
<b>Creatinina</b>	r	.383	.110	.356	-.237	.062	.402	-.115	.358	.245	-.245
	p	.065	.609	.088	.265	.772	.052	.594	.086	.249	.249
<b>Ác. Úrico</b>	r	.091	.020	.439*	-.140	.316	.286	.273	-.006	.150	-.150
	p	.671	.926	.032	.515	.133	.175	.196	.976	.485	.485
<b>Colesterol</b>	r	.110	.162	.548*	-.055	.228	.099	.108	.138	.108	-.108
	p	.607	.450	.006	.797	.284	.647	.616	.519	.617	.617
<b>HDL</b>	r	.136	.188	-.143	.225	-.359	-.250	-.300	.121	.189	-.189
	p	.527	.379	.505	.291	.085	.238	.155	.573	.376	.376
<b>LDL</b>	r	.087	-.088	.365	-.057	.065	-.027	-.052	.210	.137	.137
	p	.686	.684	.079	.790	.765	.899	.808	.325	.523	.523
<b>VLDL</b>	r	.110	.120	.513	-.076	.481	.347	.433*	-.154	-.097	.097
	p	.609	.576	.010	.723	.017	.096	.034	.472	.653	.653
<b>Índice Aterogénico</b>	r	.116	-.016	.579**	-.202	.451	-.293	.185	.100	.060	-.060
	p	.589	.943	.003	.343	.027	.164	.387	.641	.779	.780
<b>Triglicéridos</b>	r	.110	.120	.513*	-.076	.481	.347	.433*	-.154	-.097	.097
	p	.609	.576	.010	.723	.017	.096	.034	.472	.653	.653
<b>Testosterona</b>	r	.162	-.093	-.188	.147	-.220	-.156	-.264	.026	.299	-.299
	p	.449	.665	.378	.494	.302	.465	.212	.905	.156	.156



*Figura 19. Relación entre el porcentaje de motilidad No Progresiva de los espermatozoides y los niveles de colesterol de los participantes. Es posible observar un aumento en el porcentaje de espermatozoides con una motilidad NP al elevarse las concentraciones de colesterol.*

Se encontraron algunas correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los niveles de Triglicéridos y algunos parámetros espermáticos. Dentro de las correlaciones encontradas, la más fuerte de ellas presenta una  $R^2$  lineal de .263 ( $P = 0.010$ ) y pertenece a la correlación entre el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva y la concentración de triglicéridos, esto se observa en la figura 20.

Así mismo, se encontró que los triglicéridos presentan una correlación positiva con el porcentaje de RA espontánea ( $R^2$  lineal: 0.188;  $P = 0.034$ ), lo cual es posible observar en la figura 21.

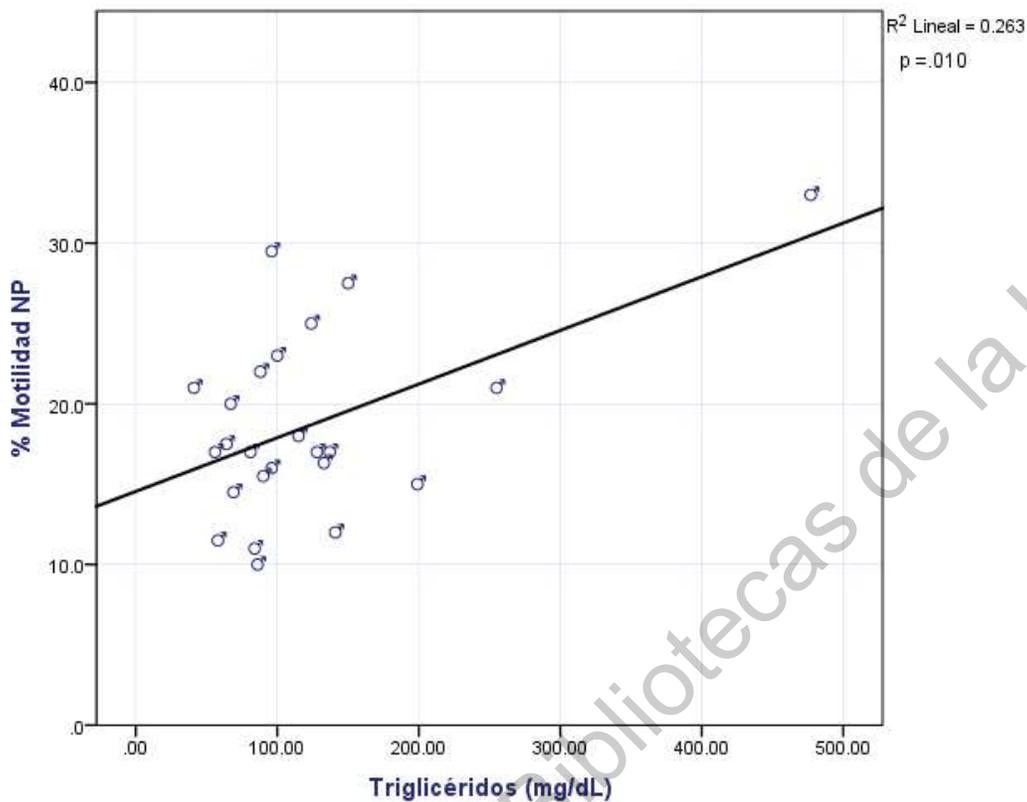
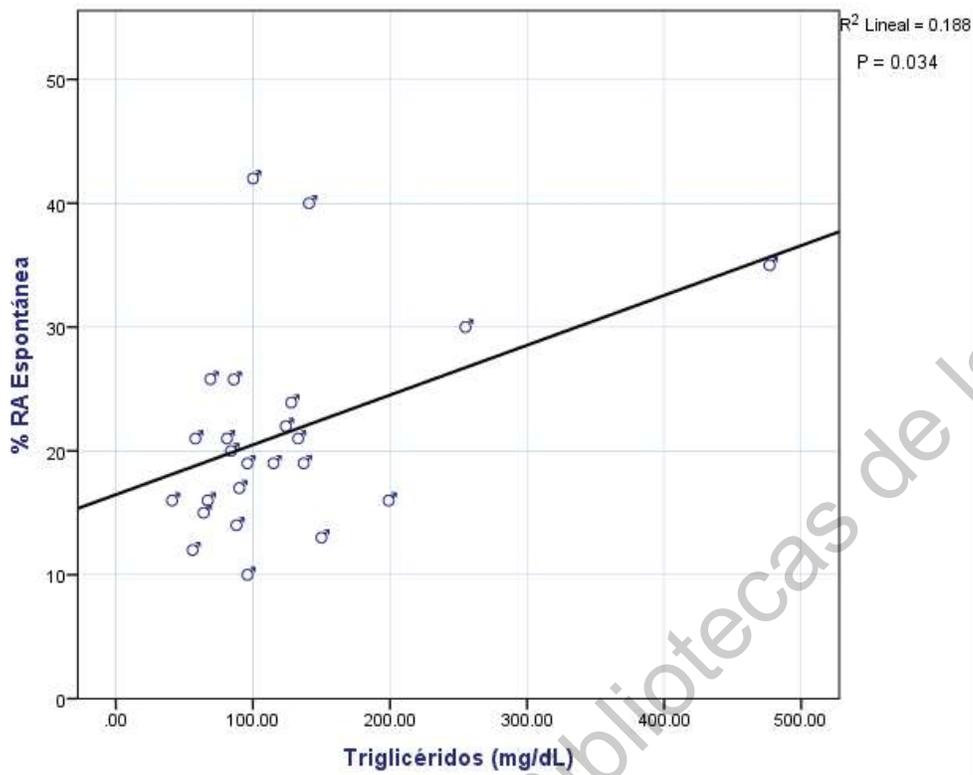


Figura 20. Relación entre el porcentaje de Motilidad NP de los espermatozoides y la concentración de triglicéridos de los participantes.

Con relación a los niveles de Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encontraron asociaciones positivas con el porcentaje de espermatozoides con Motilidad NP ( $R^2$  lineal=0.263;  $P = .010$ ), y con los porcentajes de RA espontánea ( $R^2$  lineal = 0.188;  $P = 0.034$ ) esto se observa en las figuras 22 y 23 respectivamente.

Respecto a otras asociaciones encontradas con significancia estadística, reportamos una asociación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con motilidad no progresiva y la concentración de Ácido Úrico ( $R^2$  lineal = .193;  $P = 0.032$ ).

Así mismo, se encontraron fuertes asociaciones entre el índice aterogénico y los porcentajes de espermatozoides con motilidad no progresiva.



*Figura 21. Relación entre el porcentaje de RA espontánea y la concentración de Triglicéridos de los participantes. Al aumentar la concentración de triglicéridos, se presenta un aumento en el porcentaje de espermatozoides que presentan un acrosoma reaccionado espontáneamente.*

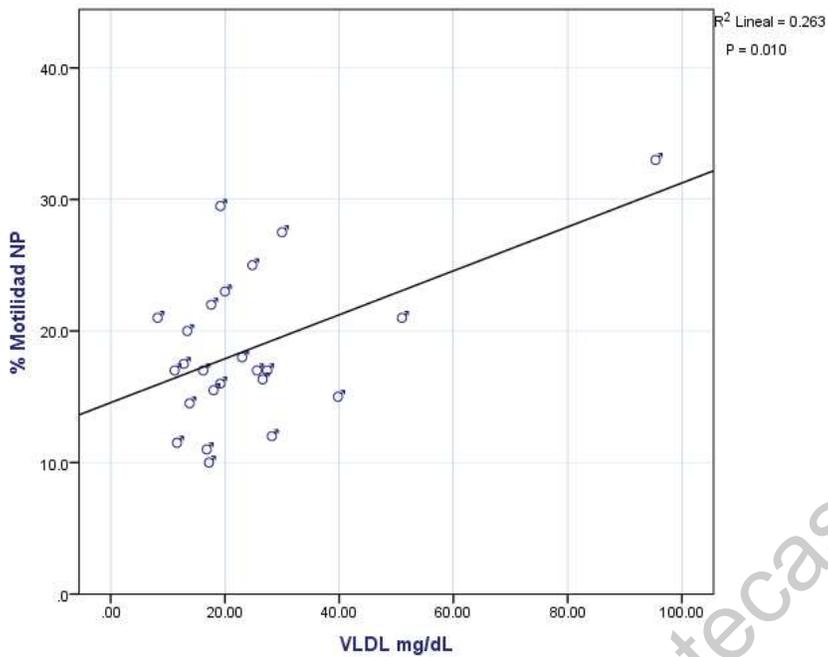


Figura 22. Relación entre el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva y las concentraciones de VLDL. VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

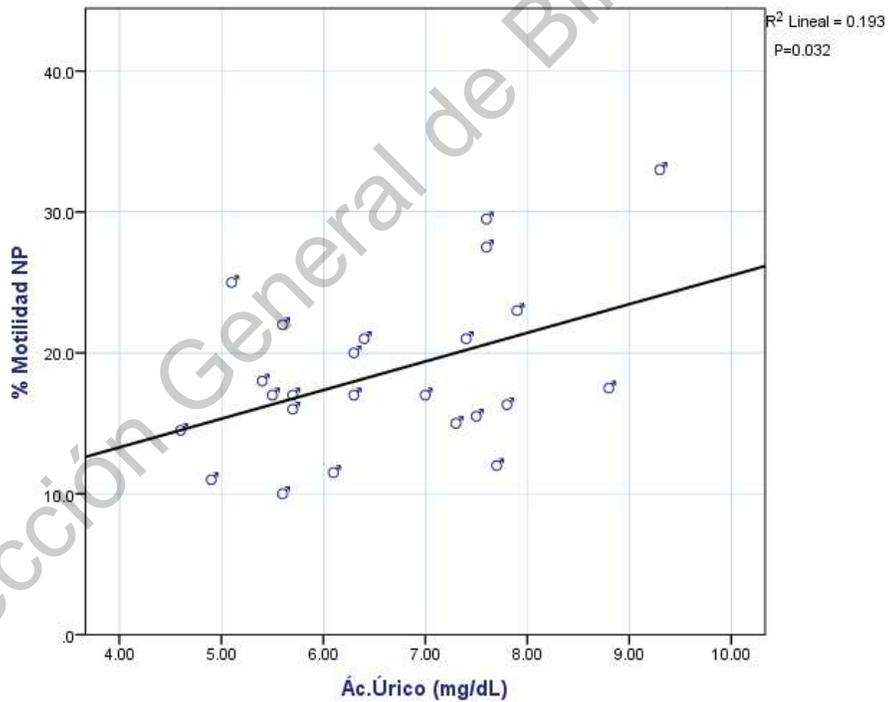


Figura 23. Relación entre el porcentaje de espermatozoides con una motilidad no progresiva y la concentración de Ácido Úrico de los participantes

## Discusiones

Hoy en día son muy pocos los estudios que evalúan el impacto generado por la interacción entre el sobrepeso, la obesidad, dislipidemias y una prueba funcional espermática, como lo es la RA. Los reportes en la literatura muestran los efectos que ocasionan las patologías antes mencionadas en los parámetros espermáticos evaluados en los espermiogramas. Por lo anterior, en el presente estudio se evaluaron los efectos de las dislipidemias, el sobrepeso y obesidad en la RA del espermatozoide humano.

Con el objetivo de evaluar el potencial de fertilización de los espermatozoides de hombres con sobrepeso y obesidad, se determinaron los porcentajes de RA espontánea e inducida con Pg. Los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados nos han arrojado importantes correlaciones estadísticas entre el aumento de la RA espontánea y el aumento en la grasa visceral, el porcentaje de grasa, el IMC y el peso. A la fecha, en la literatura no se encuentra evidencia alguna que determine estas asociaciones directamente a excepción del IMC. En el 2014, Samavat y colaboradores reportaron un aumento en la RA espontánea en hombres con un IMC mayor a 40 Kg/m<sup>2</sup> considerado ya como obesidad mórbida, a diferencia de ellos, en nuestro estudio no participó población con un IMC tan elevado. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido son consistentes con los reportados por Samavat. Es importante mencionar que ellos en su estudio no reportaron los porcentajes de grasa y el nivel de grasa visceral de los participantes, por lo tanto, no se puede realizar una comparación de estos datos, ya que el artículo de Samavat es el primero que evalúa la RA en población humana.

La grasa visceral es considerada una acumulación excesiva de tejido adiposo que rodea a órganos vitales, se manifiesta como un exceso de grasa corporal y ambos se asocian directamente con la obesidad, misma que se considera un factor que deteriora la RA a través de distintos mecanismos, como lo son la baja concentración de hormonas tales como el estrógeno y la Pg, esta última considerada un inductor de la RA (Tchernof et al., 2013; Tello Mora et al., 2018). Así mismo, distintos estudios han reportado que la inflamación en hombres obesos promovida por el tejido adiposo repercute en distintos parámetros evaluados en las células espermáticas. El exceso de tejido adiposo produce un estado de inflamación, ya que aumenta la

producción y la secreción de citocinas pro inflamatorias como la IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y la leptina (Almabhouh et al., 2019). Syrious y col en el 2018 reportaron que el incremento de dichas citocinas repercute en distintos procesos de la espermatogénesis. Así mismo, actúan en el epitelio seminífero y en el epitelio epididimario, en respuesta de ello se potencia la clásica activación de los neutrófilos en los procesos inflamatorios, propiciando un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que, a su vez, promueven un aumento en los niveles de estrés oxidativo, mismo que se encuentra ya muy bien documentado repercute en algunos parámetros espermáticos (Alhamar et al., 2019; Liu et al., 2017; Aikten et al., 2014). Aikten y col en el 2014 reportaron que el estrés oxidativo al generar reacciones de carbonilación de proteínas y lipoperoxidación afecta indirectamente la RA, ya que daña la membrana acrosomal, así como a las proteínas Quinasa B, Serina y Treonina Quinasa, proteína G y fosfolipasa C todas ellas involucradas en el proceso de RA.

Samavat y colaboradores en su estudio indican que la RA se ve gravemente afectada por la obesidad mórbida, mostrando una marcada disminución en los niveles de respuesta fisiológica a la Pg determinado por ARPC (RA inducida- RA espontánea), esto en comparación con los sujetos delgados, los resultados que obtuvimos en nuestro estudio son concordantes con los reportados por Samavat, ya que encontramos una asociación negativa entre el porcentaje de ARPC y el IMC.

Al estudiar los porcentajes de RA Inducida podemos observar una importante disminución de esta al incrementarse parámetros como el IMC, la grasa visceral y el porcentaje de grasa, que en conclusión estos parámetros llegan a ser indicadores de obesidad. En los resultados reportados por Samavat y colaboradores se indica que las células espermáticas de hombres con obesidad mórbida presentan una disminución a la respuesta de Pg como inductor de RA, esto en comparación de las células de hombres normo peso. Si bien nuestra población no presenta las mismas condiciones, nuestros resultados presentan un comportamiento similar a los reportados por Samavat, ya que nuestros porcentajes de RA inducida con Pg disminuyen conforme aumentan los parámetros antes mencionados.

El hecho que encontremos correlaciones tanto positivas como negativas estadísticamente significativas dentro de las mismas variables (IMC, peso, % grasa y grasa visceral con RA espontánea e inducida) es sumamente importante ya que fortalece la investigación, permitiendo

observar cómo estas variables que nos indican la presencia del sobrepeso y la obesidad afectan procesos esenciales para la fecundación como lo es la RA.

La nula investigación de RA en espermatozoides humanos limita la oportunidad de realizar otras comparaciones de nuestros resultados obtenidos. Sin embargo, en modelos *in vivo* específicamente en modelo murino la RA ya se encuentra muy bien estudiada. Fan y col en el 2015 indujeron obesidad mórbida y obesidad en ratones, posteriormente evaluaron la RA en los espermatozoides de ambos grupos, en sus resultados ellos reportan que tanto el grupo de espermatozoides de ratones con obesidad como el de obesidad mórbida presentaron elevados porcentajes de RA espontánea y una disminuida respuesta fisiológica la Pg, esto en comparación con los porcentajes presentados por el grupo control conformado por ratones normopeso. Con la evidencia anterior y los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo es posible enunciar que conforme aumenta el grado de obesidad en el hombre, disminuye el potencial de fertilización de sus espermatozoides.

A la fecha, distintos estudios enfatizan que la participación del metabolismo de lípidos es crucial en diversos eventos de suma importancia para las células espermáticas. Estos abarcan desde la producción de hormonas esteroideas, hasta la composición estructural de la bicapa lipídica del espermatozoide. Así mismo, los lípidos son indispensables en procesos de función, motilidad, maduración y capacitación espermática. Estos dos últimos son considerados imprescindibles para lograr la RA (Buñay, Gallardo, Torres-fuentes, Aguirre-arias, & Orellana, 2020; Liu & Ding, 2017; Saez, 2019; Shi et al., 2018). Los efectos que ejercen las altas concentraciones de lípidos sobre la RA del espermatozoide humano no se han estudiado a profundidad. Como se mostró anteriormente en nuestro estudio, encontramos correlaciones positivas entre el aumento de la concentración de lípidos, específicamente de triglicéridos y el aumento del porcentaje de RA espontánea. Sin embargo, en la literatura no se encuentran artículos que reporten lo encontrado por nuestro equipo de trabajo.

En el 2014, Shisterman y col, en su estudio Life, evaluaron la calidad del semen y las concentraciones de lípidos, ellos reportaron porcentajes bajos de espermatozoides con acrosoma intacto y perímetro de cabezas reducidos, esto en espermatozoides de hombres que presentaban elevadas concentraciones de colesterol y triglicéridos. Lo reportado por Shisterman es consistente con los hallazgos de nuestra investigación, ya que al no encontrarse el acrosoma

intacto, se considera que ya ocurrió la RA de forma espontánea, puesto que no se sometió a ningún inductor de RA.

La información que se brinda respecto al impacto de las alteraciones lipídicas en la RA en humanos es muy limitada, gran parte de la información con que se cuenta proviene de modelos de estudio en animales. Distintos estudios se han desarrollado empleando al conejo como modelo de estudio (Saez, 2019). En 2010 Saez Lancellotti y colaboradores indujeron hipercolesterolemia a un grupo de conejos al administrarles una dieta rica en colesterol (0.5%), ellos reportaron una marcada disminución en el índice de RA, al utilizar como inductor la Pg en espermatozoides de conejos con hipercolesterolemia, esto en comparación del grupo control. Así mismo, en 1993 Díaz - Fontdevila y col publicaron un estudio en el que realizaron importantes incrementos en las concentraciones del colesterol y ácidos poliinsaturados en la dieta de conejos, con la finalidad de evaluar el impacto de estos en la cinética de la RA del espermatozoide. Ellos reportaron modificaciones en las concentraciones de colesterol/ filipina en la membrana del acrosoma, así como una disminución estadísticamente significativa en la capacidad de presentar RA, esto en comparación con espermatozoides del grupo control.

Dentro de la literatura podemos encontrar distintos estudios en los que se analizan los efectos que generan el sobrepeso, la obesidad y las dislipidemias en distintos parámetros espermáticos. Entre los resultados mostrados en las diferentes investigaciones es posible encontrar diversas inconsistencias entre ellos. Por ejemplo, Sermonadade y colaboradores reportaron que al presentarse un aumento en el IMC encontraron una influencia negativa en los parámetros espermáticos, afectando negativamente la fertilidad masculina. Por otro lado, MacDonald y colaboradores indicaron no encontrar asociación alguna entre el aumento del IMC y los distintos parámetros espermáticos evaluados a través del espermiograma. En nuestros resultados no encontramos correlación alguna en parámetros espermáticos evaluados en el espermiograma (motilidad, morfología, vitalidad, concentración) de muestras de semen proveniente de hombres normopeso al compararlas con muestras de hombres con sobrepeso y obesidad. Esto concuerda con lo publicado por MacDonald.

En contraste con lo anterior, reportamos correlaciones positivas entre los parámetros espermáticos y variaciones entre distintas concentraciones lipídicas. Encontramos asociaciones positivas entre el aumento en las concentraciones de Triglicéridos y de VLDL con los

porcentajes espermático de motilidad no progresiva, lo cual concuerda con lo reportado por Ergun y colaboradores.

Dentro de nuestros hallazgos notificamos correlaciones significativas entre el aumento de las concentraciones de colesterol total y el aumento en los porcentajes de espermatozoides con una motilidad no progresiva. No obstante, nuestros resultados se contraponen a lo reportado por You Lie y colaboradores en el 2017, ya que ellos no encontraron correlación alguna entre la motilidad no progresiva y los niveles séricos de colesterol. Por otro lado, Haguida y colaboradores en el 2014 reportaron asociaciones entre la concentración de distintos lípidos y la morfología espermática. Sin embargo, en nuestro estudio solo se encontraron correlaciones referentes a la motilidad no progresiva y no se encontró ninguna otra asociación con otro parámetro espermático.

Los resultados que se exhiben entre los distintos estudios de la literatura presentan inconsistencias entre sí, a pesar de tener detrás varias décadas de estudio. En el 2015 Eisenber y colaboradores reportaron no haber encontrado asociación alguna entre los niveles séricos de hombres con hipercolesterolemia y la calidad del semen. Dado a la concomitancia entre los diferentes estudios que se han reportado, es necesario realizar investigaciones que determinen el verdadero impacto de las dislipidemias en la fertilidad masculina. Recientes investigaciones que se evocan a evaluar las concentraciones lipídicas en el plasma seminal han reportado que niveles elevados de colesterol, triglicéridos, LDL HDL en plasma seminal presentan asociaciones negativas con distintos parámetros espermático (Lu et al., 2016). Lo anterior nos da pauta a considerar que los efectos de las concentraciones lipídicas sobre los parámetros espermáticos se pueden evaluar con mayor determinación en contenido seminal como tal.

En nuestro estudio se presentaron algunas limitaciones. La más importante de ellas, el tamaño de la muestra es muy pequeña, y a consecuencia de ello se podría obtener un poder estadístico debilitado. Así mismo, la distribución de participantes entre los grupos de estudio no fue equitativa. Lo anterior se puede atribuir a que en su mayoría los participantes fueron jóvenes estudiantes de la facultad de medicina, y estos son considerados una población selectiva. Es importante mencionar que el encontrar participantes fue una labor difícil, ya que la participación en el estudio fue de forma voluntaria.

Dentro de las fortalezas que respaldan a nuestro estudio es posible mencionar que se realizó en una población homogénea como ya se mencionó anteriormente. Así mismo, la fertilidad de los participantes era desconocida, se hace mención de este importante punto ya que en la mayoría de los estudios se conoce que la población participante presenta antecedentes de infertilidad. Además, nuestro estudio cuenta con estandarizaciones en el tiempo de muestreo; todas las tomas de muestra se obtuvieron en horario matutino, fueron analizadas por el equipo de investigadores con previa capacitación, siguiendo un protocolo estrictamente revisado y estandarizado. Así mismo, las muestras de suero sanguíneo se analizaron bajo las mismas condiciones el mismo día.

## **Conclusiones.**

Nuestros resultados indican que el potencial de fertilización de los espermatozoides de hombres con hipercolesterolemia, sobrepeso y obesidad se ve comprometido, ya que tienden a presentar una respuesta disminuida a inductores fisiológicos, y una elevada capacidad de presentar RA espontánea. Las presencias de estas patologías predisponen a desarrollar problemas de infertilidad. Por lo que se puede indicar que las dislipidemias, el sobrepeso y la obesidad afectan negativamente la RA del espermatozoide humano y por consecuencia se produce un impacto negativo en la fertilidad masculina. Para obtener información más sólida es necesario ampliar el grupo de estudio.

## Bibliografía

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & Iuliis, G. N. De. (2014). *Oxidative stress and male reproductive health*. 31–38. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122203>
- Almabhouh, F. A., Hafidz, A., Ifrah, M., & Malik, A. (2019). *Leptin and reproductive dysfunction in obese men*. (January 2020). <https://doi.org/10.1111/and.13433>
- Amjad, S., Baig, M., Zahid, N., Tariq, S., & Rehman, R. (2018). *Association between leptin obesity, hormonal interplay and male infertility*. (May), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.13147>
- Bataineh HN & Nusier MK (2005). Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats. *Saudi Medical Journal* 26 398–404.
- Brum M, Alysia D. Thomas, Khalida Sabeur, and Barry A. (2006 ).Ball [Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa](#) *American Journal of Veterinary Research* 67:2, 358-362
- Broughton, D. E., & Moley, K. H. (2017). Obesity and female infertility : potential mediators of obesity ' s impact. *Fertility and Sterility*, 107(4), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>
- Buñay, J., Gallardo, L., Torres-fuentes, J. L., Aguirre-arias, M. V., & Orellana, R. (2020). *Male Reproduction A decrease of docosahexaenoic acid in testes of mice fed a high-fat diet is associated with impaired sperm acrosome reaction and fertility*. (December). <https://doi.org/10.4103/aja.aja>
- Cabler, S., Agarwal, A., Flint, M., & Plessis, S. S. Du. (2010). Obesity : modern man ' s fertility nemesis. *Nature Publishing Group*, 12(4), 480–489. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.38>
- CARDONA-MAYA, W.D.; CADAVID, A.P. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urol Esp*, 29 (7) ,676-684.

- Chen, X., Zheng, Y., Zheng, J., Lin, J., Zhang, L., & Jin, J. (2019). *The progesterone - induced sperm acrosome reaction is a good option for the prediction of fertilization in vitro compared with other sperm parameters*. (February), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13278>
- Craig, J. R., Jenkins, T. G., Ph, D., Carrell, D. T., & Ph, D. (2019). sperm epigenome. *Fertility and Sterility*, 107(4), 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.115>
- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W., & Hanson, F. W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome reacted human sperm. *Gamete Research*, 15(3), 213–226. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150303>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- Daradka, H. M. M. (1999). *Effect of mild hyperlipidaemia on testicular cell population dynamics in albino rats*. 37(April), 396–398.
- Diaz-Fontdevila, M. and Bustos-Obregon, E. (1993). Diet enriched with cholesterol and polyunsaturated acids: effect on the kinetics of the acrosome reaction in rabbit sperm. *Reproduction and Molecular Development*, 35 (2), 176–180. doi: 10.1002 / mrd.1080350211
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G. A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., ... Cisneros, J. Z. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, 387(10026), 1377–1396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)
- Eisenberg, M. L., Kim, S., Chen, Z., Sundaram, R., Schisterman, E. F., & Buck Louis, G. M. (2014). The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: Data from the LIFE study. *Human Reproduction*, 29(2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/humrep/det428>
- ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino) . (2019). *Informe final de resultados. 2019*
- Ergün, A., Köse, S. K., Aydos, K., Ata, A., & Avci, A. (2007). Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Archives of Andrology*, 53(1), 21–23. <https://doi.org/10.1080/01485010600888961>

- 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*. (12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120775>
- Franken, D. R., & Oehninger, S. (2012). *Semen analysis and sperm function testing*. (November 2011), 6–13. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.58>
- Fumuso, F. G., Giménez, M. L., Neild, D. M., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Carretero, M. I., ... Animal, R. (2014). *Comparison of washing methods and smear conservation periods for llama sperm acrosome assessment using the Coomassie Blue stain* (Vol. 4).
- Glander, H. J., Lammert, A., Paasch, U., Glasow, A., & Kratzsch, J. (2002). Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia*, 34(4), 227–233. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2002.00501.x>
- Guo, D., Wu, W., Tang, Q., Qiao, S., Chen, Y., Chen, D., ... Wang, X. (2017). *The impact of BMI on sperm parameters and the metabolite changes of seminal plasma concomitantly*. 8(30), 48619–48634.
- Gupta, S. K., & Bhandari, B. (2011). Acrosome reaction : relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 97–105. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.72>
- Hagiuda, J., Ishikawa, H., Furuuchi, T., Hanawa, Y., & Marumo, K. (2014). *Relationship between dyslipidaemia and semen quality and serum sex hormone levels : an infertility study of 167 Japanese patients*. 131–135. <https://doi.org/10.1111/and.12057>
- Hwang, K., & Lamb, D. J. (2013). The sperm penetration assay for the assessment of fertilization capacity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 927, 103–111. doi:10.1007/978-1-62703-038-0\_10
- Khodamoradi, K., Parmar, M., & Khosravizadeh, Z. (2020). *The role of leptin and obesity on male infertility*. 30(3), 334–339. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000762>
- Kirkman-brown, J. C., Emma, L., Barratt, C. L. R., & Publicover, S. J. (2002). *Zona Pellucida and Progesterone-Induced Ca<sup>2+</sup> Signaling and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa*. 23(3), 306–315.
- Klop, B., Elte, J. W. F., & Cabezas, M. C. (2013). *Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets*. 1218–1240. <https://doi.org/10.3390/nu5041218>
- Lainez, N. M., & Coss, D. (2019). *Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function*. 160(July), 2719–2736. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00487>

- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). *Simple Histochemical Stain for Acrosomes on Sperm From Several Species*. 449(June 1998), 445–449.
- Liu, Y., & Ding, Z. (2017). *Obesity , a serious etiologic factor for male subfertility in modern society*.
- Lu, J., Jing, J., Yao, Q., Fan, K., Wang, G., & Feng, R. (2016). *Relationship between Lipids Levels of Serum and Seminal Plasma and Semen Parameters in 631 Chinese Subfertile Men*. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146304>
- 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*. 16(3), 293–311. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp047>
- Mah, P. M., & Wittert, G. A. (2010). *Molecular and Cellular Endocrinology Obesity and testicular function*. 316, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.06.007>
- Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(10), 423–444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>
- Meldrum, D. R., Morris, M. A., Ed, M., Gambone, J. C., & H, M. P. (n.d.). Obesity pandemic : causes , consequences , and solutions — but do we have the will ? *Fertility and Sterility*, 107(4), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.104>
- Mintziori, G., Nigdelis, M. P., Mathew, H., Mousiolis, A., Goulis, D. G., & Mantzoros, C. S. (2020). *Journal of Metabolism*, 154193. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154193>
- Oehninger, S., Franken, D. R., Sayed, E., Barroso, G., & Kolm, P. (2000). Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: A meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 6(2), 160–168. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.160>
- Oehninger, S., Ph, D., Franken, D. R., Ph, D., Ombelet, W., & Ph, D. (2014). Sperm functional tests. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1528–1533. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.044>
- Okosun, I. S., Tedders, S. H., Choi, S., & Dever, G. E. A. (2000). *Abdominal adiposity values associated with established body mass indexes in white , black and hispanic*

*Americans . A study from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.*

Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)

Ramirez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M. [High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men]. *Ginecol Obstet Mex.* 2000;68(1):224–229.

Rastrelli, G., Lotti, F., Reisman, Y., Sforza, A., Corona, G., Rastrelli, G., ... Sforza, A. (2019). Expert Review of Endocrinology & Metabolism Metabolically healthy and unhealthy obesity in erectile dysfunction and male infertility. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 14(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1657827>

Saez, F. (2019). *Review Article Dietary Cholesterol and Lipid Overload : Impact on Male Fertility.* 2019.

Samavat, J., Sc, M., Natali, I., Ph, D., Innocenti, D., Sc, M., ... Sc, M. (2014). Acrosome reaction is impaired in spermatozoa of obese men : a preliminary study. *Fertility and Sterility*, 102(5), 1274-1281.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.1248>

Schisterman, E. F., Mumford, S. L., Chen, Z., Browne, R. W., Boyd Barr, D., Kim, S., & Buck Louis, G. M. (2014). Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. *Andrology*, 2(3), 408–415. doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00198.x

Stefan, N., Häring, H. U., Hu, F. B., & Schulze, M. B. (2013). Metabolically healthy obesity: Epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 1(2), 152–162. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70062-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70062-7)

Shi, J. I. N. F., Li, Y. U. K. U. N., Ren, K. U. N., Xie, Y. J. I. E., Yin, W. E. I. D., & Mo, Z. C. (2018). *Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis ( Review ).* 705–713. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8000>

Shrem, G., Brudner, Y., Atzmon, Y., Michaeli, M., Ellenbogen, A., & Shalom-paz, E. (2019). *The influence of obesity, smoking, and serum follicular stimulating hormone in azoospermic patients on testicular sperm extraction-intra cytoplasmic sperm injection outcomes.* 0(December 2017), 24–28.

- Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., & Goulis, D. G. (2018). *Cytokines and male infertility*. 29(September), 73–82. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0412>
- Talmor, A., & Obstetrics, C. (2014). Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Female Obesity and Infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.014>
- Talwar, P., & Hayatnagarkar, S. (2015). Sperm function test. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(2), 61. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.158588>
- Tello-mora, P., Hernández-cadena, L., Pedraza, J., & López-bayghen, E. (2018). *Acrosome reaction and chromatin integrity as additional parameters of semen analysis to predict fertilization and blastocyst rates*. 0, 1–10.
- Thulstrup, A. M., Nohr, E. A., Bonde, J. P., Sørensen, T. I. A., & Olsen, J. (2007). *Subfecundity in overweight and obese couples*. 22(6), 1634–1637.
- Ugarelli, A., Evangelista-vargas, S., & Santiani, A. (2017). *Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo*. 28(1), 130–140.
- Vincenzo, A. Di, Busetto, L., Vettor, R., & Rossato, M. (2018). *Obesity , Male Reproductive Function and Bariatric Surgery*. 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00769>
- Wallach, E. E., Hammoud, A. O., Gibson, M., Peterson, C. M., Meikle, A. W., Carrell, D. T., & Ph, D. (2008). *Impact of male obesity on infertility : a critical review of the current literature*. 90(4). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.026>
- Wang, E. Y., Huang, Y., Du, Q. Y., Yao, G. D., & Sun, Y. P. (2017). *Body mass index effects sperm quality : a retrospective study in Northern China*. (July 2015), 234–237. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.169996>
- Xu, F., Zhu, H., Zhu, W., & Fan, L. (2018). Human sperm acrosomal status, acrosomal responsiveness, and acrosin are predictive of the outcomes of in vitro fertilization: A prospective cohort study. *Reproductive Biology*, 18(4), 344–354
- Yamamoto, Y., & Sofikitis, N. (1999). *Ooplasmic injections of rabbit round spermatid nuclei or intact round spermatids from fresh , cryopreserved and cryostored samples* \*. 14(6), 1506–1515.

Yanagimachi, R. (2011). *Commentary Mammalian Sperm Acrosome Reaction : Where Does It Begin Before Fertilization ?* 5(April), 4–5.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092601>

## ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento informado.



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA.



Todos los participantes invitados a esta investigación gozaran de los siguientes derechos:

1. Saber qué área, tema o asunto se está estudiando.
2. Saber qué sucederá y cuáles son los procedimientos.
3. Saber los riesgos potenciales o incomodidades del estudio, si es que las hay.
4. Saber si se debe esperar algún beneficio al participa y si lo hay en que consiste.
5. Puede preguntar acerca del estudio antes de consentir y durante el estudio.
6. Saber que tratamiento está disponible si ocurre una complicación o lesión como resultado de la investigación.
7. Poder negarse a participar en el estudio o dejar de participar una vez iniciado.
8. Recibir copias de los derechos de los sujetos participantes de experimentos y forma de consentimiento firmado y fechada.
9. Estar libre de presiones para participar en el estudio.

Si usted tiene alguna duda o pregunta relacionada con este estudio o piensa que quizás esté sufriendo algún daño al estar participando en el estudio por favor contacte a los investigadores responsables en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, Clavel #200, Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro. Tel. 192 12 00 en horario de 9:00 am a 2:00 pm, con la D.C. Ana Alicia Sánchez Tusie

### **TÍTULO DEL ESTUDIO.**

Efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemias de la Reacción Acrosomal del espermatozoide humano.

### **OBJETIVO.**

Determinar los efectos del sobrepeso, obesidad y dislipidemias sobre la Reacción Acrosomal del Espermatozoide Humano

### **PROCEDIMIENTOS.**

1. Se canalizarán participantes en la clínica de fertilidad INSEFER ubicado en Lic. Manuel Gómez Morín 3870, Centro Sur, 76090 Santiago de Querétaro, Qro

2. Al asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión se entregará el consentimiento informado a los participantes interesados en participar, en el cual se explicarán los estudios a realizar y los beneficios que obtendrá del estudio. Así mismo se hace del conocimiento del participante que el material biológico que nos proporcionará solo será empleado en este estudio y no en algún otro, y que al término de este será desechado de una forma adecuada

Si decide participar se le asignará una fecha para llevar a cabo la toma de muestra, es de suma importancia que cuente con al menos 48 horas de abstinencia sexual y se presente con un ayuno de alimentos mínimo de 8 horas

3. El día acordado para la toma de muestra previamente a esta se realizará una entrevista con el participante para elaborar un historial clínico y realizar la toma de muestra sanguínea, en la cual se determinarán niveles séricos de glucosa, colesterol, lípidos y leptina. Así mismo se tomarán medidas antropométricas.

4. Enseguida se realizará la obtención de la muestra de semen, para ello se le entregará al participante un frasco estéril y se le hará pasar al masturbatorio de la clínica, que es un cuarto en condiciones adecuadas para que pueda proporcionar la muestra.

5. A la muestra de semen obtenida se le realizaran pruebas de licuefacción, pH, color, volumen, viscosidad y motilidad.
6. Se inducirá reacción acrosomal en los espermatozoides y posteriormente será evaluado a través de una tinción con el colorante azul de Coomassie.
7. Se proporcionará una fecha estimada para la entrega de resultados.

### **RIESGOS.**

El participar en el estudio no genera ningún tipo de riesgo hacia su persona.

### **RESULTADOS.**

Se le brindará al participante el informe de la investigación donde incluya los resultados de los parámetros evaluados en el espermiograma, en caso que a través del espermiograma se identifique que el paciente presente irregularidades en alguno de los parámetros evaluados será notificado.

### **BENEFICIOS:**

Se realizará un espermiograma a la muestra de semen de manera gratuita, a través de los resultados obtenidos el paciente podrá conocer su calidad espermática.

### **CONFIDENCIALIDAD.**

Sólo los investigadores tendrán acceso a toda la información y resultados generados en este estudio. Los datos obtenidos serán publicados en revistas científicas, pero se presentarán como valores grupales para proteger la identidad de los participantes. Usted será identificado por un número y su nombre no será usado. Los datos se mantendrán en total confidencialidad.

### **COSTOS.**

Todos los gastos de los análisis y evaluaciones previamente mencionadas, serán pagados por parte del proyecto de investigación y usted a cambio recibirá información importante en relación a su salud.

## **DERECHO A NEGARSE O RETIRARSE.**

Usted puede decidir NO participar sin consecuencias negativas. Además, puede cambiar de parecer y retirarse del proyecto aun cuando ya haya empezado. Si nosotros encontráramos información importante durante el transcurso de nuestro estudio, ésta se le dará a conocer y quizás esto le haga pensar en su participación en este estudio.

## **CONSENTIMIENTO.**

Su firma, indicará que usted ha decidido participar voluntariamente en nuestro estudio, que ha leído esta información y que se le ha mencionado en que consiste el estudio. Usted recibirá una copia de este consentimiento firmada para que la tenga consigo. También se le dará una copia de los derechos que tiene al participar en este estudio y las obligaciones para presentarse adecuadamente el día de los estudios.

---

Nombre y Firma del participante

---

Fecha

---

Nombre y Firma del investigador

---

Fecha

Nombre y teléfono del investigador principal:

- Q.F.B Aída Guadalupe Díaz Martel.
- Celular: 618 151 88 10

## Anexo 2. Historial clínico



**Historia Clínica.**  
**Laboratorio de Andrología**  
**Posgrado de la Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Querétaro**



Fecha: \_\_\_\_\_

### 1) Ficha de identificación:

Nombre: \_\_\_\_\_ Expediente \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_ Estado Civil \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ E mail: \_\_\_\_\_

### 2) Antecedentes personales:

1. Horas de abstinencia sexual hasta la obtención de la muestra \_\_\_\_\_

2. ¿Se ha sometido a un espermograma anteriormente? Si ( ) No ( )

En caso de haber contestado si a la pregunta anterior conteste la pregunta número 3, en caso contrario omitir.

3. Los valores obtenidos en el espermograma se encontraban dentro de los rangos permitidos: Si ( ) No ( ) Especifique \_\_\_\_\_

4. ¿A presentado un cuadro infeccioso durante los últimos 3 meses? Si ( ) No ( )

Especifique: \_\_\_\_\_

5. ¿Padece alguna enfermedad de transmisión sexual? Si ( ) No ( )

Especifique: \_\_\_\_\_ Fecha de Diagnóstico: \_\_\_\_\_

6. Tabaquismo: Si ( ) No ( ) Edad de inicio: \_\_\_\_\_ Frecuencia: \_\_\_\_\_  
Cantidad cigarros/día: \_\_\_\_\_

7. ¿Consumo usted algún tipo de droga? Si ( ) No ( ) Especifique \_\_\_\_\_

8. ¿Usted tiene hijos / hijas? Si ( ) No ( ) Número de hijos/ Hijas \_\_\_\_\_

Peso (Kg)	Estatura (Cm)	Circunferencia de cintura	IMC

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ