



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Efecto de un microencapsulado de granada roja  
(*Punica granatum L.*) en la fertilidad de ratones CD1+  
expuestos a acrilamida”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**FERNANDO CHIMAL CÁZARES**

Director de Tesis

**Dr. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ**

Co-director de Tesis

**Dr. GABRIEL BETANZOS CABRERA**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 8 de enero de 2018





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias de la Salud  
 School of Health Sciences  
 Área Académica de Medicina  
 Department of Medicine  
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

15/DICIEMBRE/2017  
 AAM/MCBS/124/2017

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Fernando Chimal Cazares**  
**Alumno de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto de un microencapsulado de granada roja (*Punica granatum L.*) en la fertilidad de ratones CD1+ expuestos a acrilamida" con el cual obtendrá el **Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
- PRIMER VOCAL DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
- SECRETARIO DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA
- SUPLENTE DR. EDUARDO OSIRIS MADRIGAL SANTILLÁN
- SUPLENTE M en C. ARELI CRUZ CASTAÑEDA

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración

Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

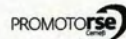
M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA  
 DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

Instituto de Ciencias de la Salud  
 Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautia.  
 San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308  
 mtria\_bio\_sal@uaeh.edu.mx



[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de registro 623104.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1 Espermatogénesis .....	3
1.1.1 Definición .....	3
1.1.2 Etapas de la Espermatogénesis .....	4
1.1.3 Espermiogénesis .....	5
1.1.4 Maduración Epididimal.....	6
1.1.5 Regulación hormonal de la Espermatogénesis.....	7
1.2 Acrilamida .....	8
1.2.1 Principales fuentes de Acrilamida .....	9
1.2.2 Toxicocinética de la Acrilamida.....	11
1.2.2.1 Absorción.....	11
1.2.2.2 Distribución .....	11
1.2.2.3 Biotrasnformación.....	12
1.2.2.4 Excreción .....	13
1.2.4 Estrés oxidativo y exposición a Acrilamida .....	15
1.2.5 Efectos reproductivos asociados a la exposición a Acrilamida .....	16
1.2.6 Efectos neurotóxicos.....	16
1.2.7 Estrés oxidativo.....	17

1.2.7.1 Especies reactivas de oxígeno .....	18
1.2.8 Estrés oxidativo en la fisiología del espermatozoide.....	18
1.2.9 Estrés oxidativo en los espermatozoides.....	19
1.3 Granada ( <i>Punica granatum L</i> ).....	20
1.3.1 Características generales .....	20
1.3.2 Composición nutricional.....	21
1.3.3 Propiedades de la granada.....	22
1.3.4 Efectos reproductivos asociados a la exposición de la granada .....	23
1.3.5 Microencapsulación .....	25
1.3.5.1 Métodos de microencapsulación .....	28
1.3.5.2 Microencapsulación mediante secado por aspersion .....	28
1.3.6 Microencapsulación de jugos mediante secado por aspersion .....	29
<b>II. Justificación .....</b>	<b>30</b>
<b>III. Hipótesis .....</b>	<b>31</b>
<b>IV. Objetivo General .....</b>	<b>31</b>
<b>V. Objetivos Particulares .....</b>	<b>31</b>
<b>VI. Material y Métodos.....</b>	<b>31</b>
6.1 Tipo de estudio.....	31
6.2 Obtención del fruto.....	32
6.3 Elaboración del microencapsulado de jugo de granada roja (MEGR).....	32
6.4 Animales de experimentación y dieta.....	32
6.5 Estrategia experimental .....	33
6.6 Grupos experimentales .....	34
6.7 Administración subcrónica de MEGR y AA .....	34

6.8 Evaluación del efecto del MEGR sobre la calidad espermática de ratones CD1+ con estrés oxidativo inducido con AA .....	35
6.8.1 Calidad Espermática .....	35
6.8.1.1 Concentración espermática .....	35
6.8.1.1.1 Procedimiento .....	35
6.8.1.2 Motilidad espermática .....	36
6.8.1.3 Viabilidad espermática.....	36
6.8.1.3.1 Procedimiento .....	36
6.8.1.4 Hos-test .....	36
6.8.1.4.1 Procedimiento .....	37
6.8.2 Determinación de la actividad de la Glutación peroxidasa .....	38
6.8.2.1 Principio .....	38
6.8.2.2 Procedimiento .....	38
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>39</b>
7.1 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre la motilidad espermática.....	39
7.2 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre el conteo espermático.....	40
.....	41
7.3 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre la viabilidad espermática.....	41
7.4 Efecto de la administración MEGR y la exposición de A.A sobre la integridad de la membrana espermática (Hos-test).....	42
7.5 Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la actividad de la glutación peroxidasa (GPx).....	43
<b>VIII Discusión .....</b>	<b>45</b>

<b>IX Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>X. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Proceso de espermatogénesis.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2. Resumen de los principales acontecimientos en la espermatogénesis humana.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3. Principales etapas de la espermiogénesis.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 4. Estructura química de la Acrilamida.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 5. Biotransformación de la acrilamida en roedores y humanos.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 6. Representación esquemática de las vías de biotransformación y toxicidad de la acrilamida tras la administración oral.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 7. Formación de los aductos entre la acrilamida y el grupo valina de la hemoglobina.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 8. Formación de los aductos entre la acrilamida y los residuos proteicos de cisteína .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 9. Efectos benéficos del fruto de granada.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 10. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 11. Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación, así como los métodos de cada proceso.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 12. Estrategia experimental. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 13. Representación esquemática de los cambios morfológicos típicos de espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la motilidad de los espermatozoides.. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 15. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre el conteo de los espermatozoides.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 16. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la viabilidad de los espermatozoides.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 17. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la integridad de la membrana espermática (Hos-test).....</b>	<b>43</b>



**Figura 18. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la actividad de glutatión peroxidasa ..... 44**

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Concentraciones de acrilamida en distintos alimentos.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 2. Valor nutricional de la granada (por 100 g de parte comestible) .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 3. Tipos de agentes encapsulantes utilizados en microencapsulación</b>	<b>27</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>4-HA</b>	4-hidroxi-alquenes
<b>AA</b>	Acrilamida
<b>ABP</b>	Proteína de unión de andrógenos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGPI</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Aw</b>	Actividad de agua
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCl4</b>	Tetracloruro de carbono
<b>CIEQUAL</b>	Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
<b>CYP-450</b>	Citocromo P450
<b>EH</b>	Epóxido hidrolasa
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FSH</b>	Hormona estimulante del folículo
<b>FSH-R</b>	Receptor de la hormona estimulante del folículo
<b>GA</b>	Glicidamida
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSH</b>	Glutación oxidado
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>IARC</b>	International Agency for Cancer Research
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>i.p</b>	Vía intraperitoneal
<b>JG</b>	Jugo de granada
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LH-R</b>	Receptor de la hormona luteinizante
<b>MDA</b>	Malondialdehído

<b>MEGR</b>	Microencapsulado de granada roja
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido de nicotidamida y adenina reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotidamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
<b>NADPH</b>	Nicotidamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>REDOX</b>	Reducción-oxidación
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante-β

## **RESUMEN**

El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de la administración de un microencapsulado de jugo de granada roja (MEGR) sobre la calidad espermática en ratones CD1+ expuestos con acrilamida (AA). Se realizó la administración vía intraperitoneal de AA (25 mg/kg/d) en ratones CD1+ (7-8 semanas de edad entre 20-25 g). Se determinó la calidad de los espermatozoides (concentración, motilidad, viabilidad), integridad de la membrana plasmática (hos-test) y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). La administración de AA por 6 días en ratones CD1+ resultó en una disminución significativa en la movilidad espermática, respecto al grupo control, de igual manera, el tratamiento durante 14 días con el MEGR, también ocasionó una disminución significativa en la movilidad espermática, comparado con el grupo control, mientras que en el grupo tratado conjuntamente con MEGR y AA se observó un aumento significativo en el número de células móviles a diferencia del grupo tratado solamente con AA. En lo que respecta a la concentración espermática, esta difirió significativamente en el grupo tratado con AA contrastado con el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad espermática entre los grupos estudiados. En la prueba de integridad de membrana plasmática se observó que el tratamiento con AA ocasionó daño a nivel de la membrana respecto el grupo control, por otro lado, el grupo tratado con el MEGR también produjo un aumento en el número de células con daño a diferencia del grupo control. En cuanto a la actividad de la enzima GPx el tratamiento con MEGR originó un aumento significativo respecto al grupo control. Los resultados sugieren que el MEGR tuvo un efecto antioxidante, pero no el suficiente para revertir los daños producidos a nivel reproductivo, por lo tanto, es necesario mayor investigación de los componentes polifenólicos y así el MEGR pueda ser una alternativa y emplearse como un producto nutracéutico en la prevención y tratamiento de la infertilidad masculina.

**Palabras clave:** infertilidad masculina, acrilamida, estrés oxidativo, granada, microencapsulado de jugo de granada roja.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study was to evaluate the effect of administration of a microencapsulated of red pomegranate juice (MEGR) on sperm quality in CD1+ mice exposed to acrylamide (AA). Microencapsulation was made from red pomegranate juice by spray drying. Oxidative stress was induced by administering AA (25 mg/kg/d) i.p. in CD1+ mice (7-8 weeks of age between 20-25 g). In vivo, sperm quality (concentration, motility, viability), plasma membrane integrity (hostest) and glutathione peroxidase enzyme activity (GPx) were determined. Oral administration of MEGR (3000 mg/kg /d) in oxidative stress induced CD1+ mice with AA for 14 days resulted in a significant decrease on the number of mobile cells in the AA and MEGR groups, compared to control group, additionally, the treated group with MEGR and AA had a significant increase in the number of mobile cells compared to treated group only with AA. In regard to sperm concentration, it differed significantly in the treated group with AA had significant difference compared to control group while, viability had no significant differences in the studied groups. Analyzing the plasma membrane integrity test, the AA group had a significant difference compared to control group. On the other hand, MEGR group differed significantly with the control group. Regarding the activity of the GPx enzyme, the MEGR group differed significantly compared to control group. Overall, the results suggest that the MEGR had an antioxidant effect, but it was not enough to reverse the damage caused on the reproductive level, therefore, it is necessary to addressed further studies on the polyphenolic components and consider if MEGR can be an alternative as nutraceutical product ant can be used in the prevention and treatment of male infertility.

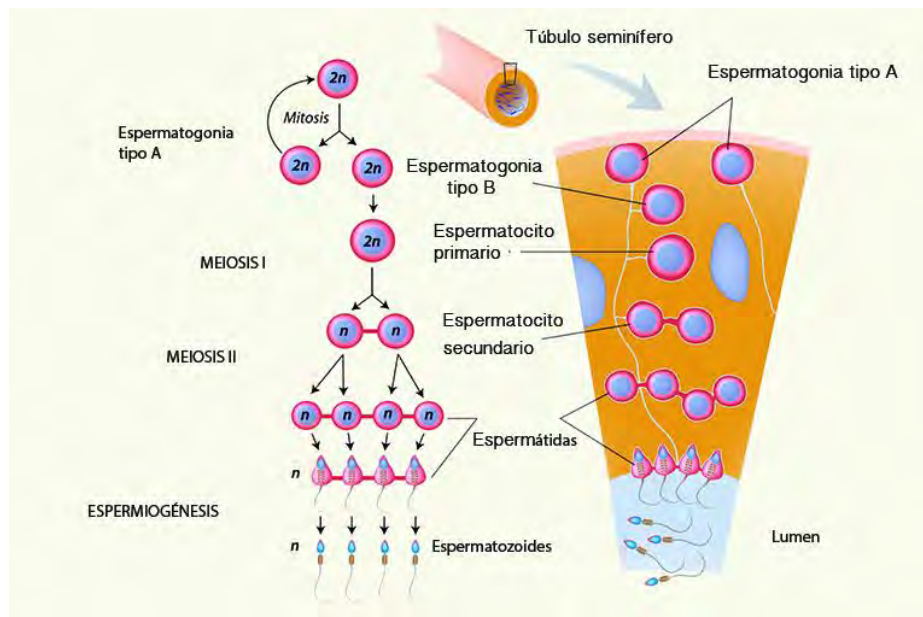
**Key words:** male infertility, sperm quality, acrylamide, oxidative stress, pomegranate, microencapsulated of red pomegranate juice.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Espermatogénesis

### 1.1.1 Definición

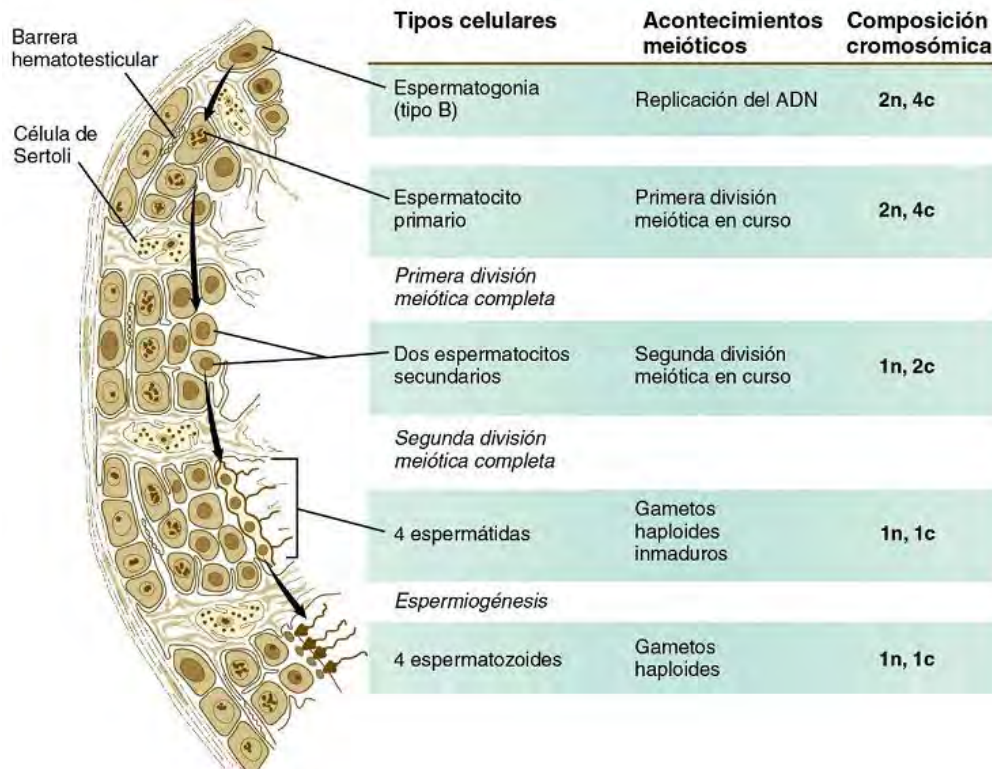
La espermatogénesis (Figura 1) es el proceso a través del cual se forman los gametos masculinos (espermatozoides) en los túbulos seminíferos de los testículos. La espermatogénesis comprende tres fases: la división mitótica de las espermatogonias (proliferación), división meiótica de los espermatocitos para producir espermatidas (meiosis), y la diferenciación de espermatidas alargadas (espermiogénesis). Las células germinales permanecen en contacto con las células de Sertoli en toda la espermatogénesis. Después de la espermatogénesis en el testículo, los espermatozoides son todavía inmóviles y debe pasar por otros procesos de maduración en el epidídimo y el tracto reproductivo femenino antes de que puedan fertilizar un óvulo (Figura 1) (1).



**Figura 1. Proceso de espermatogénesis.** Consiste en una serie de divisiones mitóticas y meióticas con la finalidad de originar espermatozoides que puede durar de 6 a 8 semanas (1).

### 1.1.2 Etapas de la Espermatogénesis

Este proceso se puede subdividir en tres pasos principales: **(i)** la multiplicación de espermatogonias por el proceso de la mitosis; **(ii)** la meiosis, lo que reduce el número de cromosomas de diploide a haploide y comienza con la entrada de espermatogonias tipo B en la profase de la primera división meiótica. Estas células, que ahora se llama espermatocitos primarios, se dividen para formar espermatocitos secundarios, y luego se dividen de nuevo para formar espermatídes redondas; **(iii)** la transformación exitosa de la espermatíde redonda en la compleja estructura del espermatozoide, esta fase se denomina espermiogénesis (2). Cada uno de estos pasos representa un elemento clave en el proceso de la espermatogénesis. Los defectos que se producen en cualquiera de ellos pueden resultar en una falla de todo el proceso y conducir a la producción de espermatozoides defectuosos y la reducción o ausencia de la producción de esperma (3).



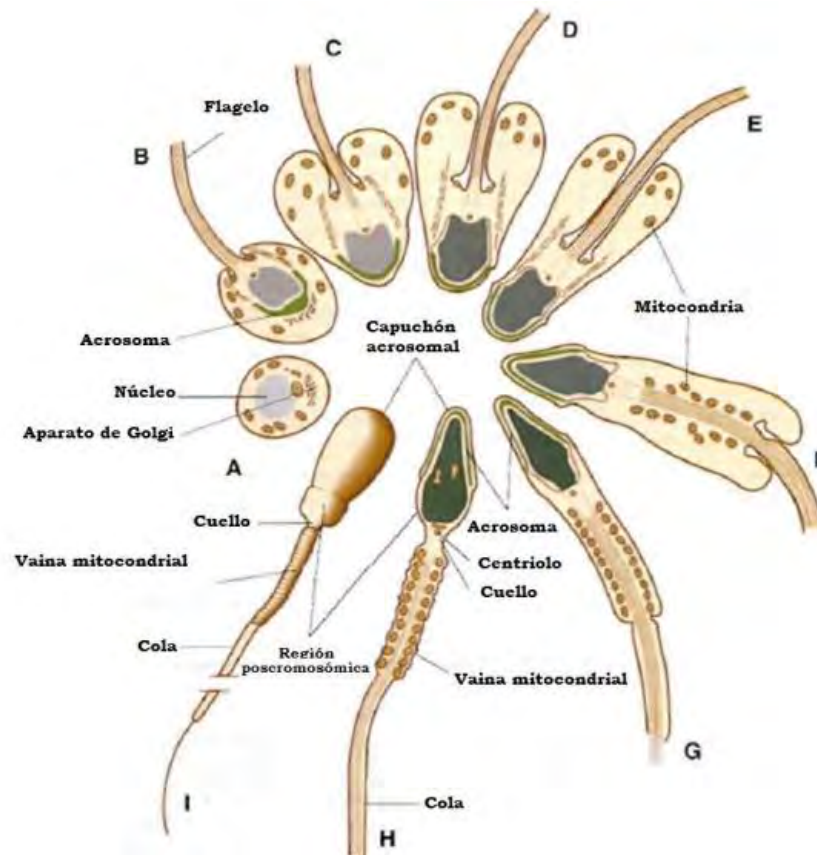
**Figura 2. Resumen de los principales acontecimientos en la espermatogénesis humana.** Las células germinales espermatogonias, se someten a frecuentes divisiones mitóticas para mantener la población de células germinales y eventualmente a divisiones meióticas para producir espermatozoides maduros. (2).



### 1.1.3 Espermiogénesis

La espermiogénesis es un proceso de metamorfosis que implica la maduración y diferenciación del gameto masculino haploide a un espermatozoide maduro. Durante la espermiogénesis, las alteraciones se producen en las proteínas nucleares de los gametos masculinos, el tamaño celular, la forma celular, la posición y tamaño de los gránulos pro-acrosomales y la localización de los centriolos (4).

Las espermatídes, que surgen de la segunda división meiótica, sufren una serie de eventos citológicos complejos que las convierten en espermatozoides. Este proceso consiste en (i) la condensación nuclear y el movimiento del núcleo a la periferia de la célula; (ii) la formación de un lisosoma modificado conocido como el acrosoma, que se une a la superficie del núcleo en aposición a la membrana celular; (iii) la formación de flagelar que incluye el desarrollo de un núcleo de microtúbulos, el axonema, que surge de uno de los centriolos de la espermatíde. Inicialmente, la formación del axonema, microtubos dobles igualmente espaciados alrededor de dos microtúbulos centrales individuales, se produce en el citoplasma adyacente al complejo de Golgi, pero más tarde en la espermiogénesis, esta estructura se aloja en el polo abacrosomal del núcleo a través de un complejo articulación que forma el cuello del espermatozoide. Después, en la formación de la cola, el axonema se modifica por el desarrollo de nueve fibras electrodensas, denominadas fibras densas externas, localizadas en la región intermedia del espermatozoide y distalmente a la vaina fibrosa de la región principal; (iv) finalmente, tras la finalización de estos eventos, el espermatíde pierde una gran parte de su citoplasma como el cuerpo residual, que es fagocitado por las células de Sertoli (5).



**Figura 3. Principales etapas de la espermiogénesis;** comenzando con la espermatide (A) y terminando con el espermatozoide maduro (I) (2).

#### 1.1.4 Maduración Epididimal

Los espermatozoides que se localizan en el primer segmento del epidídimo, conocido como la cabeza del epidídimo, carecen de movilidad progresiva y de capacidad de fertilizar al ovocito. Sin embargo, durante su paso a lo largo de este órgano reproductivo, los espermatozoides adquieren tanto la movilidad en dirección progresiva del flagelo como la capacidad fertilizante, proceso conocido como maduración epididimal (6).

La maduración epididimal de los espermatozoides se completa en 6 días en el ratón y 10 días en el hombre. Consiste en los siguientes cambios: 1) formación de puentes disulfuro entre las protaminas que empaquetan al ADN, lo que otorga una mayor estabilidad del núcleo; 2) formación de puentes disulfuro en la pieza intermedia del espermatozoide, que le confiere la movilidad progresiva; 3) cambios en la composición proteica de la membrana plasmática, que le otorgan la capacidad de

reconocer al ovocito; 4) reducción en el contenido de fosfolípidos y colesterol no esterificado, requisito necesario para ser capacitados por el tracto reproductivo femenino después del coito y 5) modificación del contenido acrosomal, que le permite reconocer al ovocito y sufrir la reacción acrosomal, requisito indispensable para el proceso de fertilización (7–9).

Por lo tanto, la alteración de los espermatozoides durante la maduración epididimal ocasionada por la presencia de agentes químicos o por un desequilibrio en las secreciones del epidídimo, pueden reflejarse en la alteración de la función espermática y, en consecuencia, en la fertilización.

#### *1.1.5 Regulación hormonal de la Espermatogénesis*

La espermatogénesis en mamíferos requiere de la acción de una compleja variedad de hormonas peptídicas y esteroides, cada una desempeña un papel importante en el funcionamiento normal del epitelio seminífero. Estos mensajeros hormonales no sólo son importantes para la regulación del desarrollo de células germinales masculinas, sino también para la proliferación y función de células somáticas requeridas para el adecuado desarrollo de los testículos. Estas incluyen las células de Leydig, cuya función principal es la producción de testosterona; las células mioideas que rodean los túbulos seminíferos y proporcionan apoyo físico y movilidad contráctil a estas estructuras; y las células de Sertoli, cuyo contacto directo con proliferación y diferenciación de las células germinales en los túbulos seminíferos hace esencial para proporcionar tanto apoyo físico y nutricional para la espermatogénesis. Cada una de estas células tienen un objetivo directo con las hormonas cuyas acciones son esenciales para la fertilidad masculina. La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son hormonas secretadas por la hipófisis anterior que actúa directamente sobre los testículos para estimular la función de células somáticas en apoyo a la espermatogénesis. Estas hormonas, parte del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) son factores de crecimiento secretados, que comparten una subunidad  $\beta$ . En los hombres, la

expresión del receptor de FSH (FSH-R) se limita a las células de Sertoli testiculares, mientras que los receptores de LH (LH-R) se encuentran principalmente en las células de Leydig (10,11).

## 1.2 Acrilamida

La acrilamida (AA),  $C_3H_5NO$ , es un polvo cristalino, de color blanco cuya estructura química se presenta en la figura 4. Este pequeño compuesto es soluble en agua, acetona y etanol, tiene alta movilidad en el suelo y en aguas subterráneas y es biodegradable (12). Hasta hace aproximadamente una década, se conocía la AA únicamente como un componente del humo del cigarro y de productos tales como los plásticos. Es un intermediario químico usado en la producción y síntesis de poliacrilamidas, las cuales se emplean para el tratamiento de las aguas municipales de consumo y las de desecho y en la limpieza de las aguas industriales de residuos sólidos antes de su vertido o reutilización (13). Asimismo, la AA también se usa de forma extensa en los laboratorios moleculares, ya que se emplea como gel de electroforesis (14).

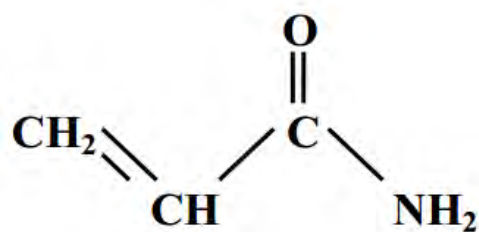


Figura 4. Estructura química de la Acrilamida (13)

En año 2002 la autoridad sanitaria sueca, junto a un grupo de investigadores de la Universidad de Estocolmo anunciaron que habían encontrado niveles considerables de AA en ciertos alimentos ricos en almidón, y que eran procesados a altas temperaturas ( $\geq 200$  °C), como papas fritas o asadas, galletas y pan (4). La AA fue clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

(International Agency for Cancer Research, IARC) como un pro-cancerígeno en humanos (clase 2A) (15), y se sabe que la exposición a bajos niveles de AA causa un daño al sistema nervioso (16). También es considerada como un agente tóxico para la reproducción, con propiedades tanto mutagénicas como carcinogénicas lo que se ha demostrado en estudios en mamíferos *in vivo* e *in vitro* (16,17).

### 1.2.1 Principales fuentes de Acrilamida

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay una ingesta diaria de acrilamida en la dieta en un intervalo de 0,3-0.8 µg/kg/peso corporal para la población general (18). En las últimas décadas, esta problemática se ha agudizado debido a que la presencia de la AA ha sido identificada en productos alimentarios de consumo frecuente (Tabla 1) (19). El contenido de AA, en diferentes grupos de alimentos, se orienta hacia aquellos que poseen una gran cantidad de carbohidratos y pocas proteínas. Entre estos alimentos se encuentran los cereales, pastas, café, papas fritas, pan tostado, galletas que son preparados a elevadas temperaturas; tal como se ha descrito durante procedimientos culinarios como el tratamiento térmico de esterilización, fritura, tostado, horneado o grill, a fin de mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos (20).

Posteriormente, diferentes grupos de investigadores descubrieron simultáneamente que la AA se forma en los alimentos durante la reacción de Maillard, una importante reacción química que provee a los alimentos de un agradable olor y sabor (21). Durante la preparación de los alimentos se produce una secuencia de complejas reacciones químicas las cuales generan cambios en su composición y textura que son reconocidos por el consumidor porque cambian el color y sabor de los alimentos (22). Esta cascada de reacciones termina en la reacción de Maillard, generando un pardeamiento no enzimático (23). Esencialmente, en la reacción actúan aminos y grupos carbonilo, especialmente azúcares reductores. Se sabe que la reacción de Maillard ocurre durante el calentamiento, elaboración y almacenamiento de los alimentos aunque también se ha descrito *in vivo*, en mamíferos (22,23).

Los compuestos que más conducen a la formación de AA son los azúcares reductores glucosa y la asparagina (24). Recientemente, se demostró que la principal vía de formación de AA en los alimentos involucraba la participación de ambas moléculas; otras vías para su formación son de menor importancia (25).

**Tabla 1. Concentraciones de acrilamida en distintos alimentos**

Alimento/Producto Grupo	Niveles de Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			Nº de muestras analizadas
	Promedio	Mediana	Mínimo-Máximo	
Papa/camote frito	1312	1343	170 – 2287	38
Chips, papas	537	330	<50 – 3500	39
Productos a base de mantequilla	36	36	<30 – 42	2
Productos de repostería	112	<50	<50 – 450	19
Galletas, tostadas, chips	423	142	<30 – 3200	58
Cereales	298	150	<30 – 1346	29
Chips, maíz	218	167	34 – 416	7
Pan	50	30	<30 – 162	41
Productos a base de pescados	35	35	30 – 39	4
Productos a base de pollo	52	52	39 – 64	2
Bebidas de malta	50	50	<50 – 70	3
Chocolate en polvo	75	75	<50 – 100	2
Café en polvo	200	200	170 – 230	3
Cerveza	<30	<30	<30	1

Fuente: (19)

### *1.2.2 Toxicocinética de la Acrilamida*

La toxicocinética de la AA involucra el conjunto de modificaciones que sufre un tóxico dentro del organismo. Hasta el presente, se han descrito diversas formas de exposición a los monómeros de AA, estando catalogadas como las de mayor relevancia la vía respiratoria, la vía dérmica y la vía oral (26,27).

#### *1.2.2.1 Absorción*

Los estudios llevados a cabo con animales han demostrado que la AA se absorbe por todas las vías de exposición siendo la vía oral la más rápida y completa en todas las especies (28). La absorción de la AA se puede inferir a partir de datos en ratones y ratas administradas con AA por medio de cánula intragástrica, dieta o administración intraperitoneal (i.p) a distintas concentraciones (29,30).

#### *1.2.2.2 Distribución*

La AA y su principal metabolito la glicidamida (GA) son moléculas que reaccionan con distintas moléculas biológicas, principalmente va a reaccionar con glóbulos rojos y su distribución va a ser muy amplia (31). Los resultados de varios estudios en animales indican que, después de la absorción, la AA se distribuye ampliamente en glóbulos rojos (32). Distribución de AA varia de cómo se introduce en el cuerpo, específicamente, si se introduce dérmica, por vía intravenosa o por vía oral. La variación en la distribución se ve afectada principalmente por si el individuo está expuesto a una forma monomérica de la AA o a una forma polimérica (poliacrilamida) (33). Estudios en ratas han demostrado que, independientemente de la distribución, los tejidos absorbentes finales fueron músculo esquelético, músculo liso, axones y testículos (32). Estudios en fetos de roedores han demostrado que la AA cruza la barrera placentaria dando como resultado un deterioro en el desarrollo neurológico de los fetos (31). Debido a su elevada

solubilidad en agua, tanto la AA como su metabolito se distribuyen ampliamente por todos los tejidos corporales incluyendo la leche y la placenta (18,28).

### 1.2.2.3 Biotransformación

El metabolismo de la AA se basa en dos mecanismos principales: oxidación mediante la acción del citocromo P450 (CYP-450) queda lugar al metabolito glicidamida (GA) por la conjugación con glutatión y catalizada por glutatión-S-transferasa (GST) con posterior excreción como ácido mercaptúrico en orina (Figura 5 y 6) (28,34,35). El metabolito de la AA, la GA, es un epóxido que puede ser más dañino por las propiedades carcinogénicas y genotóxicas que la misma AA ya que forma aductos con la hemoglobina y el ADN (13,33,36).

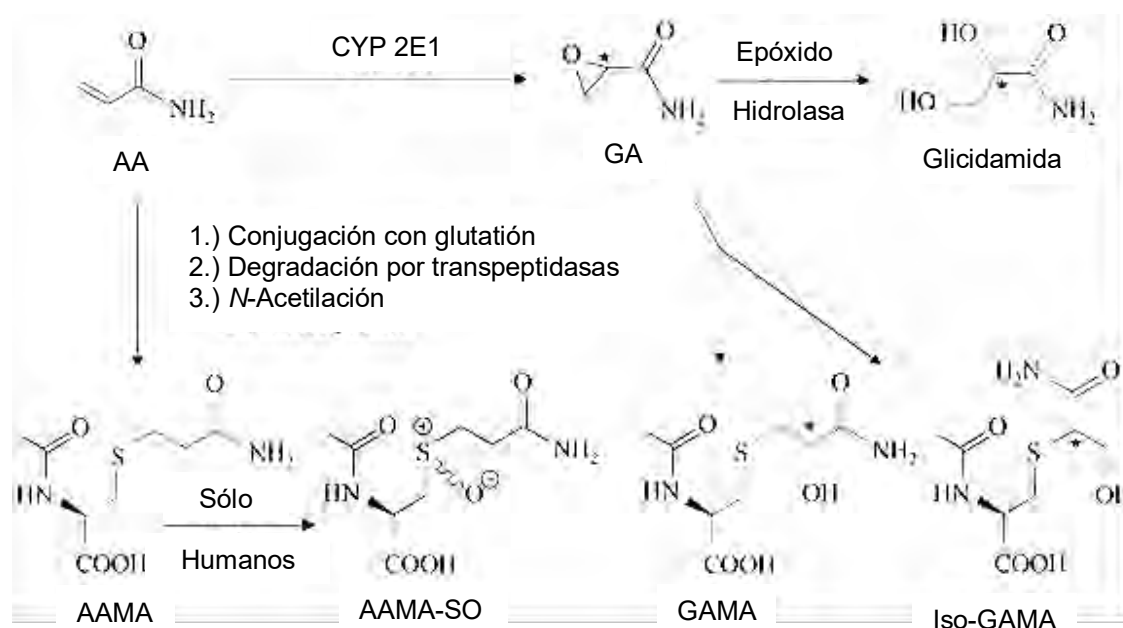
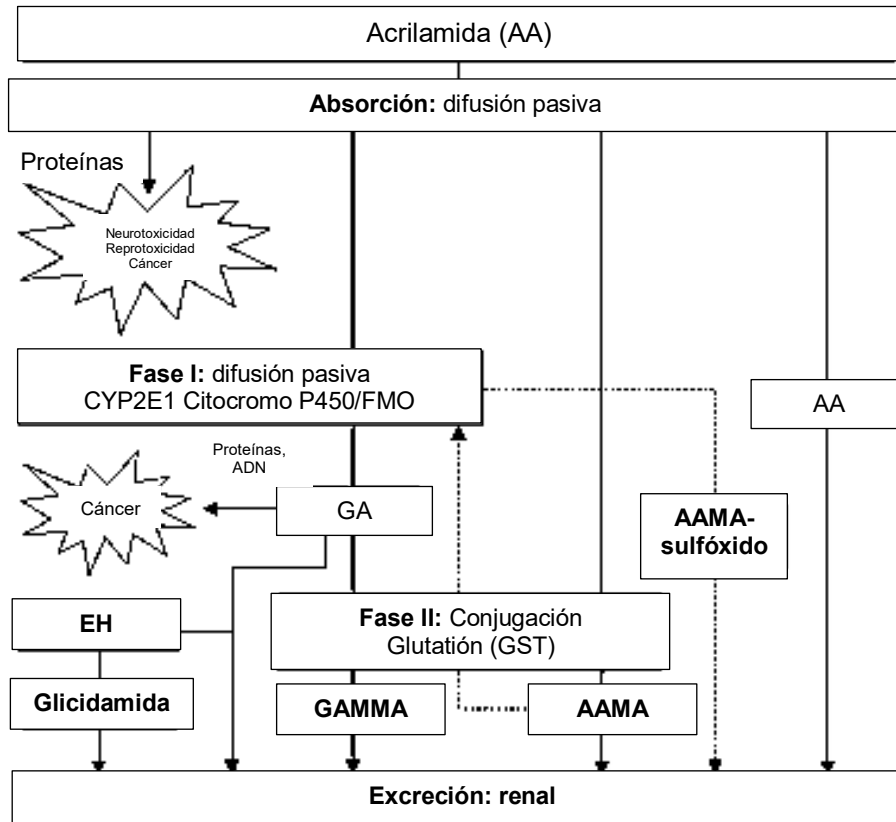


Figura 5. Biotransformación de la acrilamida en roedores y humanos Tomando y modificado de (28).





**Figura 6. Representación esquemática de las vías de biotransformación y toxicidad de la acrilamida tras la administración oral. Tomando y modificado de (34)**

#### 1.2.2.4 Excreción

La excreción de AA como el compuesto original es baja (<2%). La AA se elimina en la orina, se une a la hemoglobina (Hb), sangre, tejidos y otras macromoléculas, y se conjuga con el glutatión (GSH) por el glutatión-S-transferasas (GSTs) (37–39) para producir el metabolito urinario N-acetil-S- (2- carbamoiletilo) -l-cisteína (AAMA). El AAMA puede ser metabolizado en el ser humano a AAMA-sulfóxido (AAMA-SO) (40). La GA también se elimina en la orina, se une a Hb y sangre y tejidos otras macromoléculas, y está conjugado con GSH por GST, produciendo el metabolito urinario N- (R / S) acetil-S- (2-carbamoil-2-hidroxietyl) -l-cisteína (GAMA) (38,39) (33). La vida media de eliminación de acrilamida y glicidamida es de alrededor de dos horas en roedores, (41) Hay pocos datos farmacocinéticos en humanos.

### 1.2.3 Toxicodinamia de la Acrilamida

Por sus características físico-químicas, ha sido considerado un agente carcinogénico categoría 2, genotóxico, neurotóxico y tóxico para el sistema reproductor, según la Unión Europea (UE) y la Agencia Internacional para las Investigaciones contra el Cáncer (IARC) (13).

La naturaleza hidrofílica de la AA ha permitido sugerir la posibilidad de formación de diversos aductos, entre ellos los aductos con la hemoglobina (Hb). Esta importante molécula transportadora de oxígeno, por las características de su estructura terciaria, es susceptible de reaccionar con la AA y con su principal metabolito como es la GA, originando los denominados aductos hematotóxicos tales como los formados con residuos N-terminal de valina de la Hb (Figura 7)(42). Este derivado ha sido utilizado como un biomarcador de una de las primeras vías de acción tóxica de la AA, con lo cual se podría inferir un posible compromiso morfo-funcional del sistema hematopoyético (27).

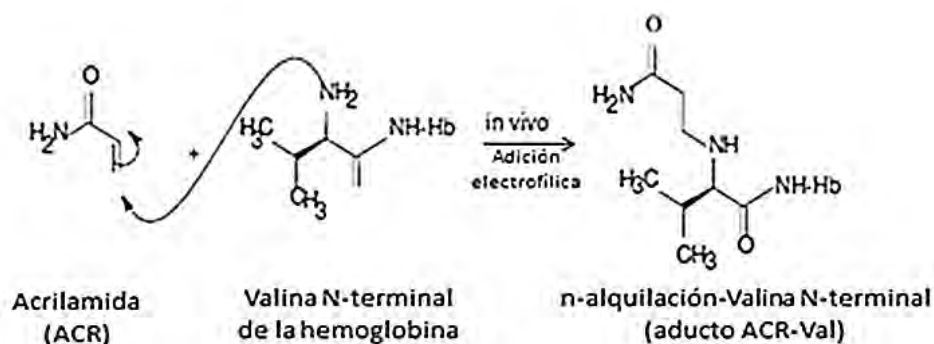


Figura 7. Formación de los aductos entre la acrilamida y el grupo valina de la hemoglobina Tomando y modificado de (12).

Otros de estos aductos son los neurotóxicos, formados a través de la reacción de la AA con los residuos de cisteína de las proteínas (Figura 5) (43), y los aductos carcinogénicos generados por la reacción de la GA, con grupos tioles (14). En principio, todas estas reacciones han sido catalogadas como eventos claves en la toxicidad inducida por este importante agente contaminante.



**Figura 8. Formación de los aductos entre la acrilamida y los residuos proteicos de cisteína hemoglobina Tomando y modificado de (43).**

De lo anteriormente expuesto, cabe resaltar, que todas las reacciones de la AA y su principal metabolito, la glicidamida (GA), con distintos grupos funcionales tales como residuos de valina, cisteína y grupos tioles, podrían ser considerados claves en:

- a) Hematotoxicidad, expresada en la posible generación de patologías anémicas;
- b) Neurotoxicidad expresada en la inhibición del transporte axonal rápido, fusiones membranales e inhibición de la neurotransmisión (36).

#### *1.2.4 Estrés oxidativo y exposición a Acrilamida*

La AA y la GA son moléculas muy reactivas y pueden actuar como radicales libres interactuando con biomoléculas de la membrana plasmática de las células, interactúan principalmente con los ácidos grasos desestabilizando estas moléculas generando una reacción en cascada produciendo otras sustancias que actuarán como radicales libres y así generando un desbalance en el sistema REDOX (33). La exposición a la AA, ha sido considerado un problema de contaminación en ambientes industrializados, debido a la presencia en altas cantidades de este agente químico (44). Su presencia en productos de uso comercial, tales como cosméticos, pinturas, pegamentos, telas, lentes de contacto, azúcar refinada, geles

para cromatografía o electroforesis, así como su presencia en el humo de los cigarrillos y en los gases liberados por el tubo de escape de los automóviles (13). También la presencia alimentaria es una fuente de exposición ya que a diario consumimos productos con contenido de AA.

#### *1.2.5 Efectos reproductivos asociados a la exposición a Acrilamida*

A dosis elevadas se detecta daño en los testículos (atrofia), afectando en forma adversa a la fertilidad (32). Se ha comprobado que la acrilamida es carcinogénica en ratas de laboratorio (45). Se observaron tumores en tiroides, testículos, glándulas adrenales y mamas tras exposición a dosis relativamente bajas (2 mg/kg administrada en agua potable) (46). Yang et al (29). observó que la AA podría regular negativamente la expresión génica testículo relacionada con el transporte de esteroides, la espermatogénesis y reducción de reservas de espermatozoides en la cauda del epidídimo incluso con la dosis más baja (5 mg/kg/d) de AA. En otros estudios hay reportes en los que se han encontrado lesiones histopatológicas en los túbulos seminíferos en ratas tratadas con AA (47). Hiperplasia de células de Leydig asociados con la pérdida de células germinales también se reportó en ratón.

Esto es importante porque el control de la espermatogénesis está mediada por las células de Sertoli y de Leydig. Las células de Sertoli sufren cambios cíclicos en la unión de la FSH, la proteína de unión de andrógenos (ABP) y activador de plasminógeno, y puede aromatizar algunas células de Leydig de a testosterona a los estrógenos. Células de Leydig regulan la función tubular y producen las altas concentraciones de testosterona. Por lo tanto, la hiperplasia de las células de Leydig puede afectar a la función reproductiva masculina (48).

#### *1.2.6 Efectos neurotóxicos*

La naturaleza hidrofílica de la acrilamida sugiere la posibilidad de formación de aductos neurotóxicos con grupos nucleofílicos, como los que posee la guanina o los grupos sulfidrilos. Además esta formación de aductos con grupos tioles puede ser

la responsable de los efectos carcinogénicos y reproductivos de la acrilamida (14,49). En animales expuestos a dosis repetidas de acrilamida, se ha observado daño en los nervios periféricos (neuropatía periférica), siendo éste el principal efecto (50). Los mecanismos por los que ejercería sus efectos neurotóxicos, son la inhibición del transporte quinésico axonal rápido, por fusión de las membranas afectadas y por tanto la inhibición de la neurotransmisión por acción directa sobre el nervio terminal.

La acrilamida se ha reportado también como neurotoxina que induce parestesia (sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general) en dedos, y debilidad en manos, alucinaciones, convulsiones y daño en el sistema nervioso central y daño neuronal (51). La posible explicación para la neurotoxicidad de la acrilamida es que es una molécula bipolar, donde en el doble enlace  $\text{CH}_2=\text{CH}$  puede experimentar interacciones hidrofóbicas con los componentes celulares. Esa propiedad le daría la habilidad de alterar las estructuras de la membrana celular y acelerar la difusión y penetración a los sitios de las terminales nerviosas, asociado con sus funciones normales y las del sistema nervioso (41).

### *1.2.7 Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la generación de especies prooxidantes y la eliminación de las mismas, mediante sistemas antioxidantes. En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre prooxidantes y antioxidantes, manteniendo la homeostasis celular. Cuando se rompe el equilibrio oxido-reducción (REDOX) intracelular, se produce una excesiva cantidad de especies prooxidantes, provocando alteraciones en la relación estructura-función en cualquier célula, organismo u órgano especializado (52). Este desequilibrio afecta drásticamente el estado REDOX, por lo tanto, se reconoce al estrés oxidativo como mecanismo general de daño.

### *1.2.7.1 Especies reactivas de oxígeno*

Especies reactivas (EROs) se les llama de esta manera a las moléculas químicas como radicales y especies no radicales, que poseen al menos un electrón en un orbital de mayor contenido energético que el correspondiente a su estado basal, lo que las hace más reactivas y capaces de generar radicales libres. Las más importantes son las EROs (53).

### *1.2.8 Estrés oxidativo en la fisiología del espermatozoide*

Las EROs desempeñan un papel central en la maduración fisiológica de los espermatozoides de mamíferos además de ser responsable de alteraciones funcionales asociados con la infertilidad masculina (54). El gameto masculino fue el primer tipo celular donde se constató la capacidad para generar EROs (55). La habilidad para generar EROs es un aspecto fundamental de la fisiología del espermatozoide (56). Los metabolitos del oxígeno producidos en el espermatozoide incluyen al  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  y ambas moléculas están involucradas en el control de la fisiología espermática a nivel de la hiperactivación, la reacción acrosomal y la fusión espermatozoide con el ovocito (57,58). La capacitación espermática, por ejemplo, implica un gran aumento en el nivel de tirosina fosforilada en la cola y sobre todo en la pieza intermedia (59). Las señales implicadas para que tenga lugar la fosforilación son el AMPc y el estado REDOX de la célula (60). El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son dos factores importantes en este proceso. Sin embargo, se ha asociado al  $O_2^-$  y al  $H_2O_2$  con la etiología de la deficiencia de la función espermática, las EROs atacan a los ácidos grasos en la membrana provocando lipoperoxidación (61), esto puede provocar pérdida de la fluidez e integridad de la membrana y la inhibición de la generación de ATP (62). Por tal motivo el aumento en los niveles de EROs también está relacionado con una disminución en la movilidad espermática (63). De ahí, la importancia de los mecanismos que regulan su producción como las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (64). Dependiendo de la naturaleza de las EROs y su

concentración, así como el momento y el lugar de la exposición, las especies reactivas tienen efectos favorables o perjudiciales sobre las funciones de los espermatozoides (65).

#### *1.2.9 Estrés oxidativo en los espermatozoides*

El estrés oxidativo es la situación en la que se encuentra una célula que presenta un desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes; bien sea por un exceso en la producción de EROs, bien por una deficiencia en los sistemas de detoxificación de éstas (66).

La vulnerabilidad de los espermatozoides de mamífero al estrés oxidativo es en gran medida una consecuencia de su estructura anatómica altamente especializado y la composición bioquímica (67,68). A diferencia de la mayoría de las células somáticas, que poseen un espacio citoplasmático abundante en el que alojar sus enzimas antioxidantes, los espermatozoides son únicos en que su espacio citoplasmático es limitado (69). Los espermatozoides están desprovistos en gran parte de catalasa, contienen superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa e isoformas de peroxirredoxina, que se concentran en gran medida en la pieza intermedia de la célula en una posición ideal para interceptar a los radicales libres que se generan por las mitocondrias espermáticas (70–73).

Los sustratos más abundantes son los ácidos grasos insaturados que abundan en la membrana plasmática del espermatozoide (66). Los espermatozoides de todas las especies de mamíferos poseen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácidos araquidónico y docosahexaenoico, en sus membranas plasmáticas (68). La presencia de estos ácidos grasos se piensa que confiere fluidez a la membrana plasmática del espermatozoide con el fin de promover tanto la actividad de enzimas clave, tales como las ATPasas de membrana de plasma, y para facilitar los eventos de fusión de membrana que son una parte integral de la fertilización (74). El problema con una alta abundancia de ácidos grasos poliinsaturados es que son muy vulnerables al ataque oxidativo, debido a que las energías de disociación de hidrógeno de carbono son los más

bajos en la posición metilen-bis-alílicos (66). Como resultado, el evento abstracción de hidrógeno la peroxidación de lípidos se promovida, desencadenando una cascada de peroxidación de lípidos que conduce en última instancia a la generación de pequeñas masas moleculares, aldehídos electrófilos tales como acroleína, 4-hidroxinonenal, y malondialdehído (66). Estos electrófilos son muy tóxicos para los espermatozoides y abruma las capacidades defensivas de estas células, lo que provoca una muerte lipoperoxidativa. Los espermatozoides son extremadamente vulnerables a la peroxidación de lípidos y este proceso puede ser promovido por la presencia concomitante de metales de transición tales como hierro y cobre (75).

### **1.3 Granada (*Punica granatum L*)**

#### *1.3.1 Características generales*

La granada es un fruto proveniente de un árbol llamado granado, el cual alcanza entre 3 y 5 metros de altura que pertenece a la familia de las Punicáceas; una pequeña familia de árboles y arbustos, cuyos frutos son semillas prismáticas y rugosas (76). Es nativa del norte de India, comprende desde Irán hasta los Himalaya, ha sido cultivada y naturalizada en la región del Mediterráneo. Actualmente, la granada es cultivada a lo largo de Irán, India, ciudades del Mediterráneo, zonas secas del sureste de Asia, Malasia, zonas tropicales de África, además de países como Estados Unidos (zonas áridas como Arizona y California), China, Japón y Rusia (77–79).

Las partes comestibles de la granada son consumidas en fresco o usadas para la preparación de jugo fresco, bebidas enlatadas, jaleas, mermeladas, elaboración de pastas, también se usa como colorante o saborizante en diferentes productos (79,80). Además de esto, es usada ampliamente en fórmulas terapéuticas, cosméticos y condimento de alimentos (77,78). Dentro de la medicina tradicional, en diversos países se ha usado como antiparasitario, vermífugo, tratamiento y cura de aftas, úlceras, diarrea, acidosis, disentería, hemorragias, infecciones microbianas y enfermedades respiratorias (79,81).



Hasta la fecha, ha tomado considerable importancia los alimentos funcionales, los cuales, en un principio, aparte de sus funciones básicas nutricionales, proveen beneficios fisiológicos y juegan un papel importante en la prevención de enfermedades o es disminuir la progresión de enfermedades crónicas. En años recientes, se ha incrementado el interés de consumidores, investigadores y de la industria alimentaria, por el fruto y su aplicación en la salud (77,79,81,82).

### *1.3.2 Composición nutricional*

El fruto de la granada está constituido por diferentes partes. Estos pueden dividirse dentro de diversos orígenes anatómicos del fruto: corteza, semillas y arilos. Otro producto muy importante obtenido del fruto es el jugo que puede ser obtenido de los arilos o del fruto total (83).

El fruto está compuesto por agua, carbohidratos y un menor contenido de grasas y proteínas (Tabla 2). En cuanto a las vitaminas destacan la C, E y K principalmente. Presenta también una pequeña proporción de fibra dietética, es rica en potasio y aporta cantidades importantes de calcio, fósforo, hierro, entre otros (84). La composición química del fruto dependerá de la región de crecimiento; tipo de cultivo, clima, maduración y de las condiciones de su almacenamiento. Por lo que se ha reportado diferentes variaciones significativas en los ácidos orgánicos, componentes polifenólicos, azúcares, vitaminas hidrosolubles y minerales que contiene el fruto de la granada. Diversos estudios han resaltado su capacidad antioxidante, debido a su contenido rico en polifenoles, tales como: taninos hidrosolubles, flavonoides, elagitaninos, galotaninos y ácido elágico (85–87).

Las antocianinas son el grupo más grande e importante de flavonoides presentes en los arilos (88). Algunos estudios reportan que todo el jugo de granada tiene mayor actividad antioxidante que cualquiera de sus componentes individuales (89). Alrededor del 50% del peso del fruto es corteza y la parte comestible del fruto de granada (alrededor del 50%) consiste en 40% arilos y 10% de semillas (85,90).

**Tabla 2. Valor nutricional de la granada (por 100 g de parte comestible)**

Composición	Unidad	Cantidad
Agua	g	80-82.3
Energía	kcal	63-78
Proteínas	g	0.5-0.95
Grasas	g	0.3-0.9
Carbohidratos	g	16.4
Fibra	g	0.2-0.6
Ceniza	g	0.5
Fósforo	mg	8.0
Hierro	mg	0.3
Potasio	mg	259
Calcio	mg	3.0
Sodio	mg	3.0
Manganeso	mg	3.0
Zinc	mg	0.12
Magnesio	mg	0.15
Cobre	mg	0.07
Selenio	mg	0.6
Ácido pantoténico	mg	0.596
Vitamina B1	mg	0.03
Vitamina B2	mg	0.03
Vitamina B3	mg	0.03
Vitamina C	mg	4-6

Fuente: (84,91)

### 1.3.3 Propiedades de la granada

Desde la antigüedad, la granada ha sido considerada como un “alimento de curación”, con numerosos efectos benéficos en distintas enfermedades (92). De hecho diversos extractos de la granada se han utilizado como medicina tradicional en muchos países para el tratamiento de disentería, diarrea, helmintiasis, acidosis, hemorragias y enfermedades respiratorias (93,94). Estudios científicos indican que la capacidad antioxidante que presenta el jugo de granada es tres veces más que el vino rojo y té verde (76), asimismo contiene un mayor concentración de polifenoles totales (5 mmol/L) en comparación con otros jugos de frutas como: naranja, toronja, uva, arándano, pera, piña, manzana, ya que estos jugos que contienen sólo 1.3 a 4 mmol/L de polifenoles totales (95). Los elagitaninos se les atribuyen el 92% de actividad antioxidante del jugo y estos también se concentran

en la cáscara, membrana y corteza blanca del fruto (76,96). Estudios revelan que algunos componentes del jugo reducen significativamente la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (97), disminuyen los valores de presión arterial (98) y tienen un efecto anti-ateroesclerótico (99).

#### *1.3.4 Efectos reproductivos asociados a la exposición de la granada*

El jugo de granada es una importante fuente de antocianinas, taninos hidrolizables punicalagina y punicalina (100), ácido gálico y elágico (101,102), y también contiene vitamina c (103).

El jugo de granada (JG) es una importante fuente de antocianinas, taninos hidrolizables punicalagina y punicalina, ácido elágico y gálico y también contiene vitamina C (104).

Además, Mansour *et al*/demostraron que el consumo diario de JG en distintas dosis durante un período de seis semanas resultó en un aumento significativo de la GPx y CAT en ratas (105). El estudio también observó que el consumo JG aumentó significativamente los espermatozoides del epidídimo parámetros de concentración y motilidad de espermatozoides y la disminución de la producción anormal de espermatozoides (106).

Entre todos los fitoquímicos, ácido elágico ha recibido una mayor atención debido a sus distintas propiedades biológicas, como la captación de radicales libres, quimiopreventivo, antiaterogénico, antiapoptótico y propiedades moduladoras de los receptores de estrógeno (107).

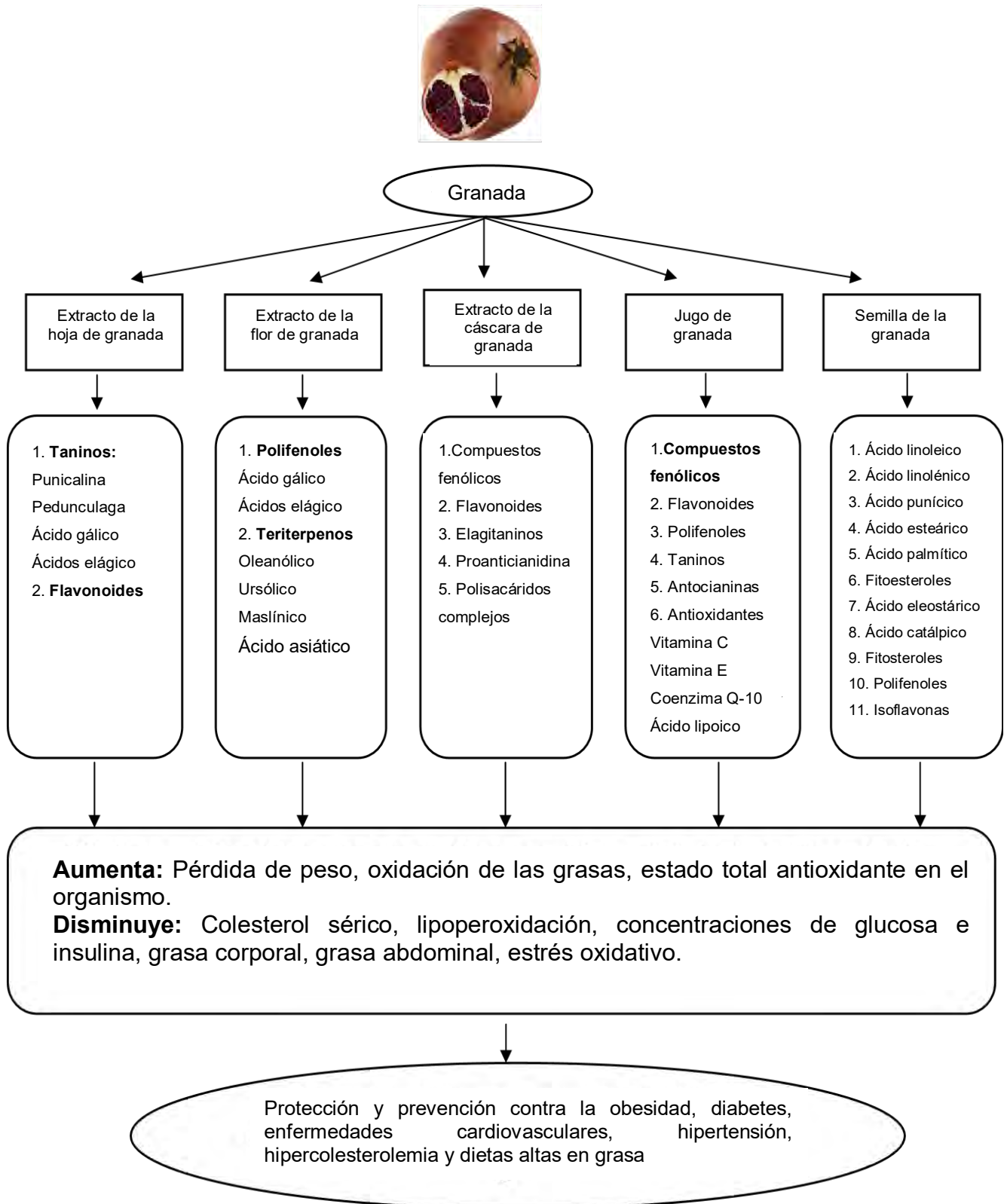


Figura 9. Efectos benéficos del fruto de granada Tomado y modificado de (104).

Las Frambuesas, fresas, nueces, semillas longan, y granada son frutos ricos en ácido elálgico (108). El ácido elálgico contiene cuatro grupos hidroxilo y dos grupos lactona en el que grupo hidroxilo es sabido que aumenta la actividad antioxidante en la peroxidación lipídica y protege a las células del daño oxidativo (91). Recientes reportes han demostrado que la administración exógena ácido elálgico en ratas protege el tejido testicular y los espermatozoides de cisplatino (109).

Por otra parte, se han demostrado que el consumo de jugo de granada aumenta la concentración de espermatozoides del epidídimo, la motilidad, la densidad de las células de la espermatogénicas, disminución de peroxidación lipídica en espermatozoides el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor de la capa de células germinales en ratas (110,111). El JG puede estimular parcialmente la espermatogénesis (112).

#### *1.3.5 Microencapsulación*

La encapsulación se puede definir como una técnica en la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo sustancias bioactivas (113), como: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, polifenoles, fibras, enzimas, olores y sabores (114,115).

Esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con polímeros para crear un entrecruzamiento con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación ocasionados por la luz o el oxígeno (114,116).

En términos generales, la encapsulación constituye un medio para envasar, separar y almacenar materiales para su posterior liberación gradual bajo condiciones controladas. Se utiliza de igual manera el término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y

microencapsulación, se emplean indistintamente y lo que los diferencia es el tamaño de la cápsula (113,114,117).

Vehring (2008) (119) reporta que, dependiendo la estructura de las microcápsulas (Figura 10), éstas se pueden clasificar en:

- 1) En el sistema reservorio o capsular: el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se haya envuelto por una fina película del material de recubrimiento. En la Figura 10a se puede observar el caso de una partícula con el interior lleno, o bien con el interior parcialmente vacío creando una microcápsula hueca (Figura 10b).
- 2) Para el caso del sistema matricial: el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. Se puede tener una estructura en forma de espuma en donde el material activo se encuentre repartido en toda la microcápsula y la cubierta permanece intacta (Figura 10c) o bien en una estructura abierta en forma de red (Figura 10e). La forma de la microcápsula puede ser esférica o bien presentar una forma irregular (Figura 10g).

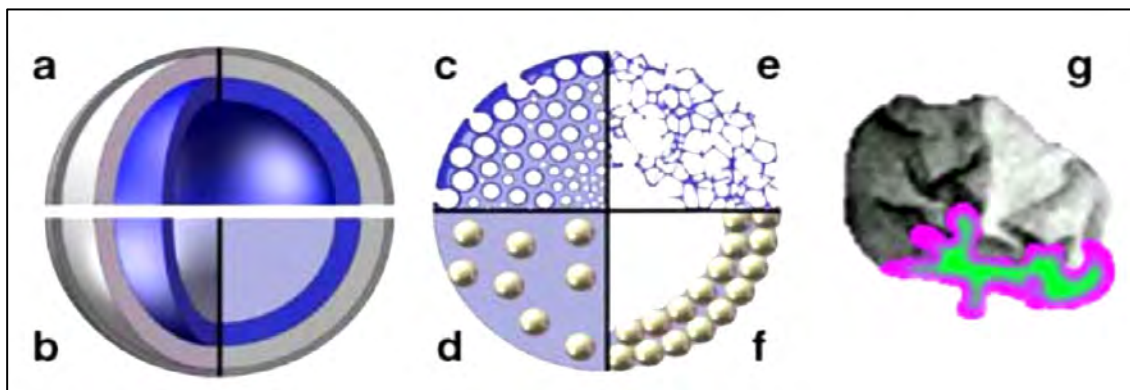


Figura 10. Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. a) microcápsula con interior lleno, b) microcápsula con interior parcialmente vacío, c) y d) microcápsulas intactas, e) y f) microcápsulas con estructuras en formas de red y g) microcápsula con estructura en forma irregular (119).

La microencapsulación es empleada por varias razones (119):

- a) La encapsulación puede proteger al material de la degradación al reducir su reactividad con el ambiente externo (calor, humedad, aire y luz).
- b) Reducción o retardo de su velocidad de evaporación o transferencia del material al ambiente externo.
- c) Las características físicas del material original pueden modificarse haciéndolo manejable.
- d) El producto se puede diseñar para la liberación lenta a lo largo del tiempo o liberarse en un determinado instante (hasta el estímulo correcto).

En el proceso de encapsulación y microencapsulación se utilizan diversos agentes encapsulantes (Tabla 3) que son de gran importancia para la producción del encapsulado, sus principales características son:

- a) Formar una película.
- b) Poseer enlaces moleculares que no permitan rotación.
- c) Conservar una estructura y conformación tales que permitan la formación de redes que tengan baja porosidad.
- d) Tener un grado de integridad alto al ser eliminada el agua.

**Tabla 3. Tipos de agentes encapsulantes utilizados en microencapsulación**

<b>Tipo de cobertura</b>	<b>Cobertura específica</b>
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas
Proteínas	Gluten, caseína, gnetina, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

Fuente: (114)

### 1.3.5.1 Métodos de microencapsulación

Existen diversos métodos para la producción de microencapsulado. En general, estos métodos se pueden dividir en: químicos y mecánicos (113). En la Figura 11 se observan los principales métodos de encapsulamiento de sustancias.

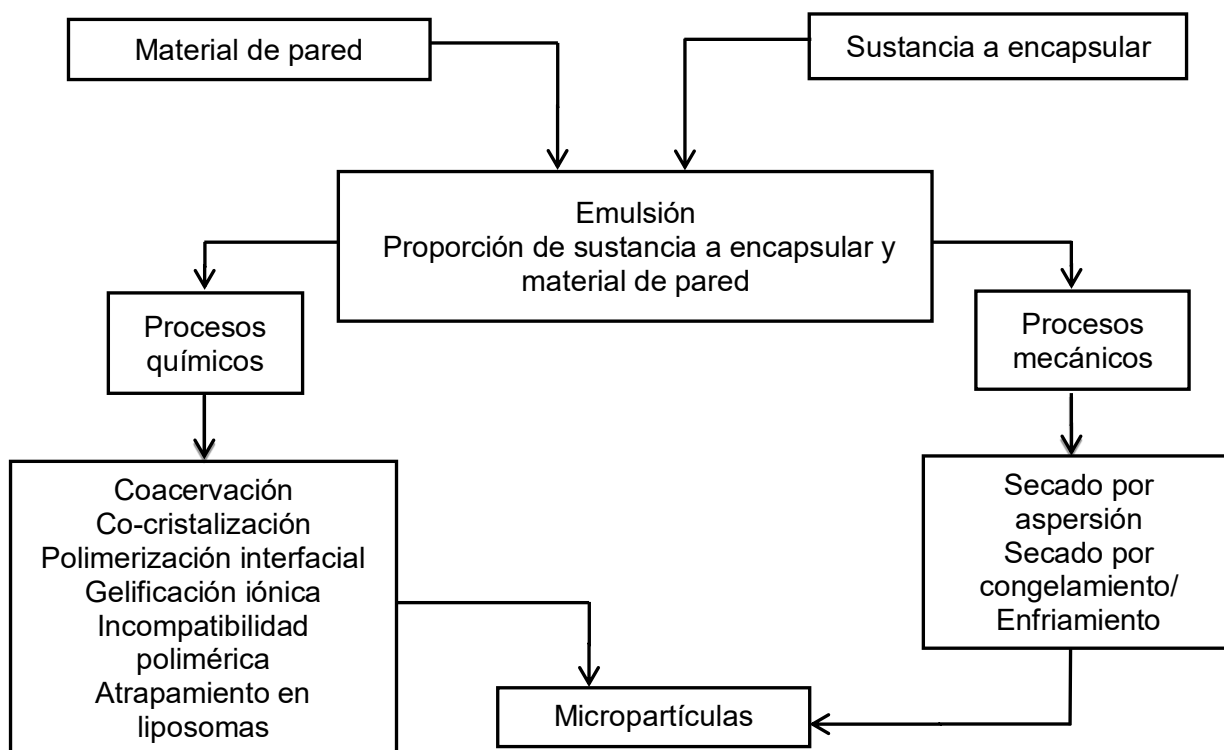


Figura 11. Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación, así como los métodos de cada proceso (113).

La selección del método dependerá del tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (114).

### 1.3.5.2 Microencapsulación mediante secado por aspersión

El secado por aspersión es el método más común de encapsulación de ingredientes alimentarios, tales como: vitaminas (C y E), ácido fólico, aromas, orégano, aceite de cardamomo, bacterias probióticas, lípidos, ácido linoléico, aceites vegetales,



minerales como hierro, pigmentos de antocianina, leche entre otros alimentos (78). El secado por aspersión es usado en la industria alimentaria por una amplia gama de productos en seco formando partículas en polvo además de ser un método económico y efectivo en la protección de materiales, conservación de nutrimentos, bajo costo de procesamiento y buena estabilidad del producto final (113,114,121,122).

### *1.3.6 Microencapsulación de jugos mediante secado por aspersión*

El secado por aspersión en los jugos es una operación de un solo paso que transforma el líquido en un producto en polvo; lo que facilita el transporte al reducir el peso y también preserva el producto de la degradación bacteriana al disminuir drásticamente la actividad de agua ( $A_w$ ) y el contenido de humedad (menor al 10%) logrando así aumentar su vida útil (119,124).

Con respecto a alimentos como frutas y hortalizas frescas que presentan un contenido de humedad superior al 80% es necesario hacer uso de un método de conservación como el secado para mejorar su estabilidad, reducir el peso de transporte y sobre todo mantener su valor nutricional (125).

## II. JUSTIFICACIÓN

La infertilidad es un problema que afecta 13-20% de parejas alrededor del mundo, independientemente de la raza o el origen étnico (126). Este problema llega a afectar a 1 de cada 6 parejas (126,127). La mayor parte de los estudios efectuados en países desarrollados indica que 15% de todas las parejas experimentará infertilidad en algún momento de su vida reproductiva (127). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente la mitad de estos casos, el hombre es la causa de la infertilidad (128). Actualmente, se cree que el estrés oxidativo es una de varias causas de infertilidad masculina.

Frente a la problemática del aumento de infertilidad en hombres y su relación con el estrés oxidativo, ha surgido la necesidad de aumentar las alternativas en su tratamiento. Diversas investigaciones han demostrado que los compuestos fenólicos tienen capacidad antioxidante con potenciales beneficios para la salud. El fruto de la granada tienen un alto contenido en compuestos fenólicos con demostrada actividad antioxidante (129). En México su consumo es pobre, ya que su consumo es esporádico y al ser de temporada su consumo se ve disminuido. No obstante, el estado de Hidalgo se encuentra entre los primeros lugares de producción nacional siendo el municipio Tasquillo el mayor productor (130). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó un microencapsulado de jugo de granada ya que es un producto en el cual aparentemente los compuestos bioactivos de la granada roja están íntegros como en el fruto que, en comparación del producto fresco, asumiendo que conserva las mismas propiedades y ofrece los mismos beneficios, pero con una vida de anaquel más larga. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto del microencapsulado del jugo de granada roja sobre la calidad espermática en ratones CD1+ expuestos a acrilamida. Hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio que contemple las variaciones de los distintos aspectos reproductivos, originadas por la combinación de un xenobiótico alimentario como la acrilamida y el microencapsulado de granada roja; en consecuencia, los datos obtenidos en este trabajo, son una gran aportación para la comprensión del tema.

### **III. HIPÓTESIS**

Si la microencapsulación es un método para concentrar y conservar los compuestos polifenólicos del jugo de granada roja entonces los compuestos continuarán siendo activos y por lo tanto protegen contra el estrés oxidativo causado por la administración de acrilamida en ratones CD1+, aumentando la calidad de los espermatozoides.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del MEGR sobre la calidad de los espermatozoides en ratones CD1+ expuestos a acrilamida.

### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el efecto protector del MEGR sobre la calidad espermática en ratones CD1+ expuestos a acrilamida.
2. Evaluar el efecto del MEGR sobre la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa en los espermatozoides de ratones CD1+ expuestos a acrilamida.
3. Evaluar la protección del MEGR sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides en ratones CD1+ tratados con acrilamida.

### **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **6.1 Tipo de estudio**

La presente investigación es de tipo experimental, la cual se basó cumpliendo con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana: Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062-ZOO-1999 (131), además del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación

para la Salud dentro de los artículos 121-126 del título séptimo de la Investigación que incluye a la utilización de animales de experimentación (132).

## **6.2 Obtención del fruto**

Se utilizó granada roja de temporada de 2014, la cual fue donada por los agricultores de la comunidad Maguey blanco en Tasquillo, Hidalgo. El fruto se lavó y peló para obtener los arilos. Una vez obtenidos los arilos, se continuó con el proceso de microencapsulación.

## **6.3 Elaboración del microencapsulado de jugo de granada roja (MEGR)**

El microencapsulado de jugo de granada roja (MEGR) se elaboró por secado por aspersión por la empresa Granding Internacional SA CV México, ubicada en Juitepec, Morelos, México.

## **6.4 Animales de experimentación y dieta**

El protocolo de Investigación del presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CIEQUAL) del ICSa de la UAEH. Se utilizaron ratones machos CD1+ de 6-8 semanas de edad con un peso de 20-25 g, provenientes del Bioterio del ICSa de la UAEH. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar como un ciclo de luz-oscuridad 12h/12h a temperatura constante ( $22\pm 2$  °C) y humedad (50%) con agua y alimento *ad libitum* con una dieta estándar comercial Harlan Teklad® 18% proteína (Madison, WI, USA). La Figura 12 muestra la estrategia experimental llevada a cabo en este trabajo.

## 6.5 Estrategia experimental

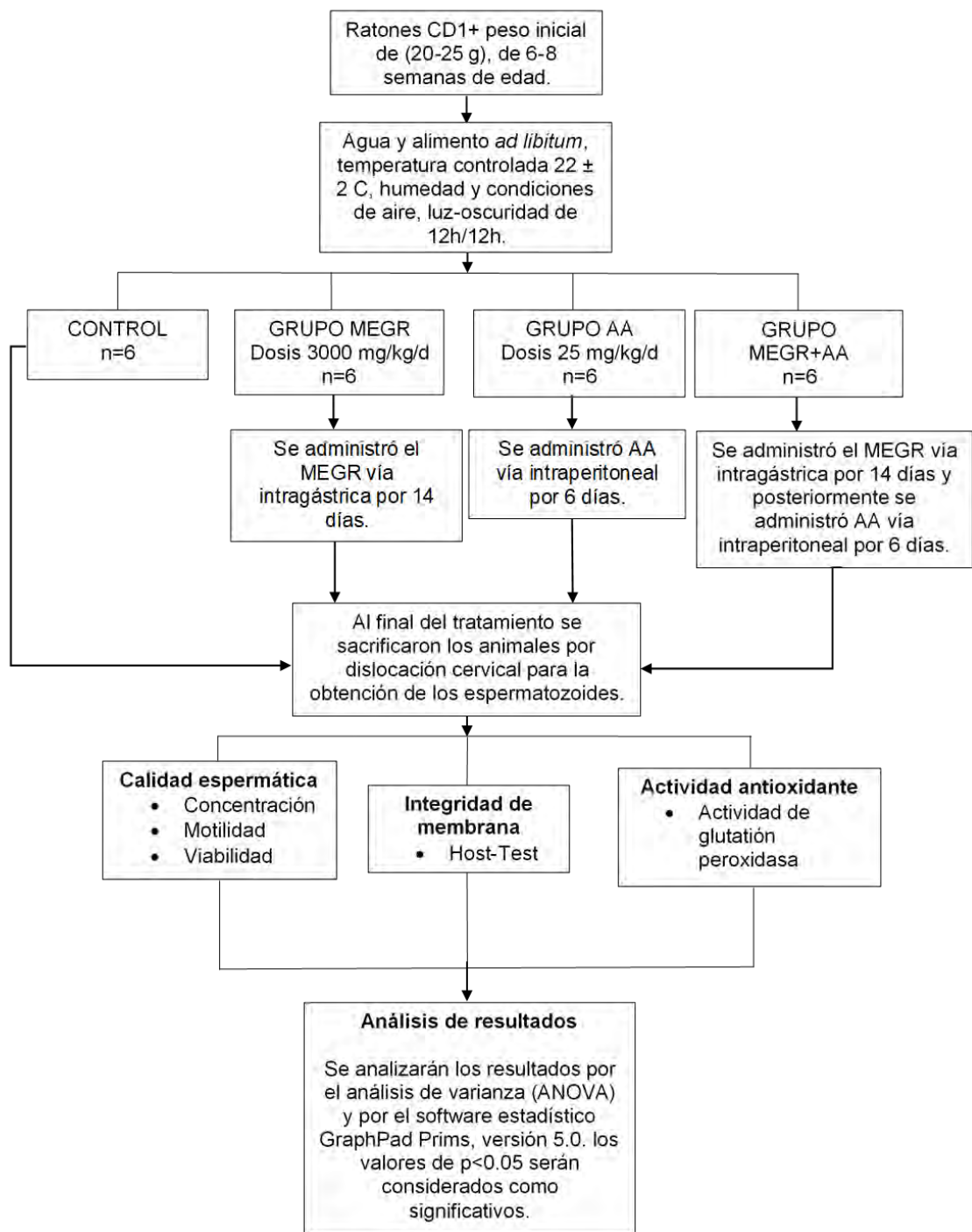


Figura 12. Estrategia experimental.

## 6.6 Grupos experimentales

En la parte experimental, se formaron aleatoriamente 4 grupos de 6 ratones cada uno. Los grupos experimentales fueron conformados de la siguiente manera:

- **Grupo control.** Ratones sin tratamiento.
- **Grupo MEGR.** Los ratones fueron administrados con el MEGR diluido en agua (3000 mg/kg/d) vía intragástrica por 14 días.
- **Grupo AA.** A este grupo solamente se le expuso a AA en una dosis de 25 mg/kg/d vía intraperitoneal durante 6 días.
- **Grupo MEGR+AA.** Como continuación al tratamiento los ratones administrados con MEGR fueron expuestos a AA en una dosis de 25 mg/kg/d vía intraperitoneal durante 6 días.

## 6.7 Administración subcrónica de MEGR y AA

En la fase experimental se preparó y se administró el MEGR (3000 mg/kg/d), (se pesaron 1216 mg de MEGR disueltos en 3 mL de agua destilada), por vía intragástrica, el tratamiento duró 14 días, se aplicó al grupo MEGR y al grupo AA+MEGR. Después de la administración de MEGR se expusieron a AA el grupo AA y el grupo AA+MEGR con una dosis de 25 mg/kg/d vía intraperitoneal, (se pesaron 200 mg de acrilamida disueltos en 40 mL de agua destilada) y el tratamiento tuvo una duración de 6 días. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se disectaron los testículos con sus conductos deferentes, para posteriormente extraer los espermatozoides y realizar los distintos ensayos.

## **6.8 Evaluación del efecto del MEGR sobre la calidad espermática de ratones CD1+ con estrés oxidativo inducido con AA**

### *6.8.1 Calidad Espermática*

La calidad espermática se determinó según los lineamientos de la OMS evaluando los parámetros de concentración, motilidad, viabilidad y espermática (133).

#### *6.8.1.1 Concentración espermática*

La concentración espermática, es un parámetro que se relaciona directamente con el índice de fertilización y consiste en determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen. Este aspecto además puede funcionar como indicativo de la capacidad que los testículos poseen para producir espermatozoides (134).

##### *6.8.1.1.1 Procedimiento*

De esta manera se siguieron los estos pasos para determinar la concentración espermática mediante la modificación a la técnica especificada por la OMS (134).

1. Se extrajeron los espermatozoides de los conductos deferentes y se diluyeron en 1 mL de solución salina 0.9%.
2. Posteriormente se realizó una dilución 1:20 de la muestra espermática en tritón al 0.01%.
3. Se usó un vórtex para mezclar adecuadamente la dilución anterior y de esta se usaron 20  $\mu$ L para el conteo por duplicado en la cámara de Neubauer; de esta forma se promediaron los valores del conteo individual siempre y cuando estos valores fueran cercanos, de lo contrario se procedió a colocar una nueva muestra (basándonos en los intervalos de confianza de 95% del Manual de la OMS para concentración espermática). El conteo fue realizado con la ayuda de un microscopio óptico.

### *6.8.1.2 Motilidad espermática*

Las células se obtuvieron como se describió en la sección anterior y se observaron al microscopio óptico. Se describió la motilidad espermática de acuerdo a los parámetros utilizados por la OMS, agrupando a las células en dos grupos: células móviles y células inmóviles.

### *6.8.1.3 Viabilidad espermática*

La viabilidad espermática se evaluó mediante el método de exclusión de azul de tripano.

#### *6.8.1.3.1 Procedimiento*

La valoración de la viabilidad espermática es un procedimiento que se realiza mediante el uso de colorantes que son impermeables a las células. De esta forma, la discriminación de células y la asignación de porcentajes se hacen por medio de la identificación de membranas celulares intactas y dañadas; estas últimas (células muertas) permiten la entrada de colorantes a las células y su contabilización permite determinar la viabilidad (93). De esta forma, las células obtenidas para la evaluación de la viabilidad, fueron sometidas a una tinción (1:1) tomando una alícuota (10  $\mu$ L), de la suspensión espermática de cada uno de los grupos, y la inmediata adición del colorante azul de tripano (0.4%). Las laminillas teñidas fueron observadas en un microscopio óptico utilizando el objetivo 40X. Las células en las que el colorante alcanzó el citoplasma y se tiñeron de azul fueron consideradas como inviables. Se evaluaron un total de 100 células por grupo por triplicado.

#### *6.8.1.4 Hos-test*

La prueba hipoosmótica o “hypoosmotic swelling test” (Jeyendran y col., 1984), permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas (incremento de



tamaño y flagelos flectados o curvos). La integridad y buen funcionamiento de la membrana plasmática es fundamental para el metabolismo espermático y para todas las etapas involucradas en el proceso de fertilización (135). En esta prueba se usa una solución hipoosmótica.

#### 6.8.1.4.1 Procedimiento

##### Solución hipoosmótica

Disolver 0.735 g de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) con 1.351 g de fructosa en 100 ml de agua destilada. Guardar en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$ . Descongelar y mezclar bien antes de usar.

##### Método

Entibiar 1 ml de la solución hipoosmótica en un tubo a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Agregar 0.1 ml de suspensión espermática y mezclar con una pipeta. Incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos y examinar las células con un microscopio de contraste de fase. Contar un mínimo de 100 espermatozoides y determinar el porcentaje de células que tuvieron un cambio morfológico en el flagelo. La Figura 13 muestra los distintos grados de encorvamiento del flagelo al someterse en una solución hipoosmótica (135).

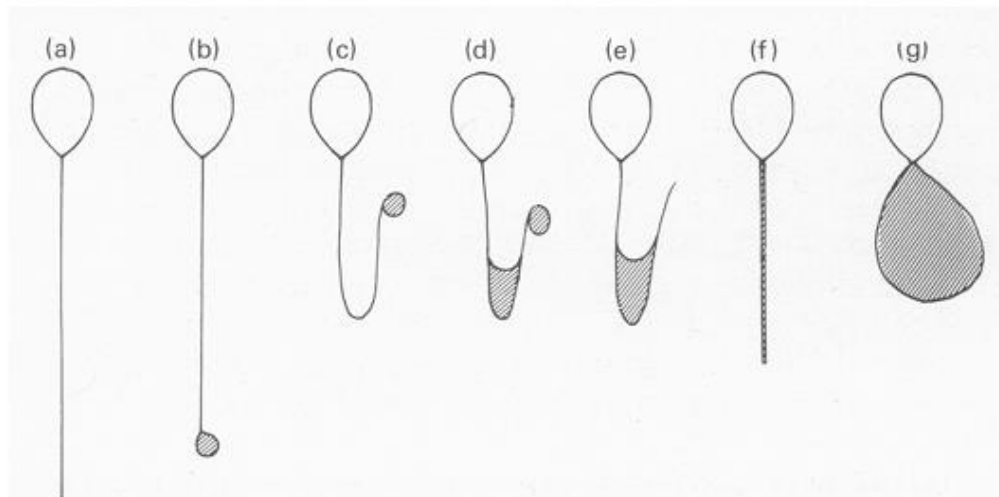


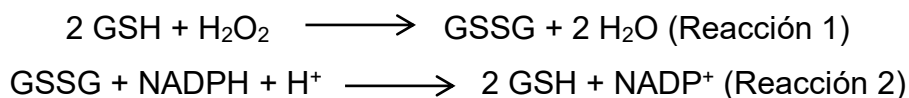
Figura 13. Representación esquemática de los cambios morfológicos típicos de espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico: a= sin cambios; b-g= varios tipos de cambios cola.

### 6.8.2 Determinación de la actividad de la Glutación peroxidasa

Para la cuantificación de la actividad enzimática de GPx se basa en el método descrito por Plagia y Valentine (1967).

#### 6.8.2.1 Principio

El método está establecido en la determinación de la oxidación GSH por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en una reacción catalizada por la GPx que contiene el hemolizado (Reacción 1). El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de glutatión reductasa (GR) y fosfato de nicotinamida adenindinucleótido (NADPH); así, el glutatión oxidado (GSSG) se reduce formando GSH y el NADPH es oxidado y consumido durante la reacción (Reacción 2).



La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm producida por el consumo del NADPH a 37°C. La diferencia en el consumo de NADPH entre el blanco y la muestra determina la actividad enzimática de GPx, siendo ésta directamente proporcional a la disminución en la absorbancia.

#### 6.8.2.2 Procedimiento

La actividad enzimática de GPx se utilizó el kit de ensayo de RANSEL (RANDOX). El ensayo se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

	Por duplicado	
	Muestra (µl)	Blanco de Reactivo (µl)
<b>Muestra</b>	<b>5</b>	-
<b>Agua destilada</b>	-	5
<b>Reactivo R1</b>	<b>250</b>	250
<b>Cumeno R2</b>	<b>10</b>	10
Se mezclaron las muestras, R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub>		
Después se leyó absorbancia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos frente al blanco de reactivo		

La actividad GPx se mide como la disminución de la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro (Power Wave Xs, Biotek Instruments Inc., Highland Park, Winooski, VT, EE.UU.). 10 × 10<sup>6</sup> células fueron tratadas con 1: 1 0.1% de Triton X-100 PBS durante 20 min. Las células se centrifugaron a 5000 rpm a 4 ° C durante 10 min. Finalmente, se obtuvo el sobrenadante para determinar la actividad de GPx (136).

#### **Determinación de unidades enzimáticas**

La determinación de la actividad enzimática de GPx se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{U/mg de proteína} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm/minuto}$$

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (137).

## **VII. RESULTADOS**

### **7.1 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre la motilidad espermática.**

El tratamiento con AA (25 mg/kg/d) durante 6 días, causó un efecto en la motilidad espermática, ocasionando una disminución significativa de la motilidad en el grupo administrado con AA respecto al grupo control, adicionalmente, el grupo con MEGR mostró una disminución significativa en la motilidad al compararlo con el control. Por otro lado, el grupo MEGR/AA tuvo un aumento en la motilidad estadísticamente

significativo comparado con el grupo AA y comparado con el grupo de MEGR (Figura 14).

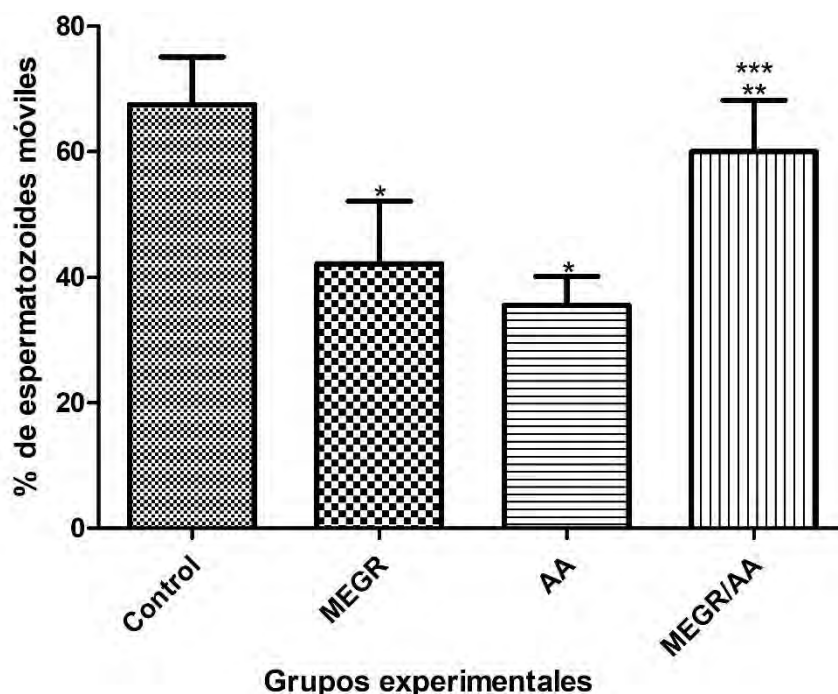


Figura 14. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la motilidad de los espermatozoides. \*Diferencias estadísticas significativas respecto al control. \*\*Diferencias significativas respecto al grupo AA. \*\*\*Diferencias significativas respecto al grupo MEGR, ANOVA y Tukey  $\geq 0.05$ .

## 7.2 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre el conteo espermático.

Respecto al parámetro de conteo espermático hubo una disminución estadísticamente significativa en el grupo AA comparado con el grupo control, mientras que el tratamiento con MEGR y AA ocasionó una tendencia a aumentar la cantidad de células en comparación con el grupo tratado solamente con AA (Figura 15).

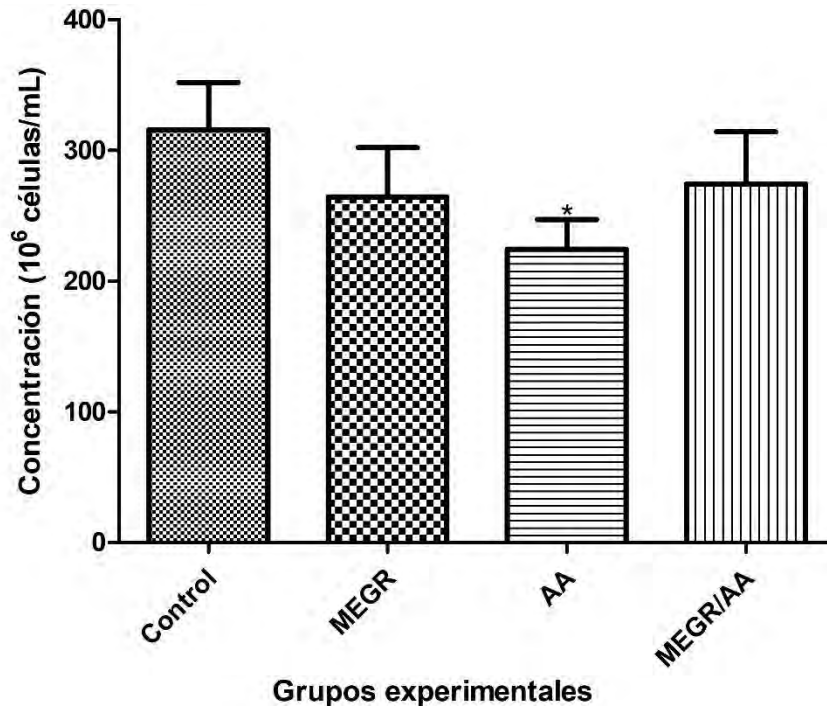


Figura 15. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre el conteo de los espermatozoides. \* Diferencias estadísticas significativas respecto al control. ANOVA y Tukey  $\geq 0.05$ .

### 7.3 Efecto de la exposición de AA y la administración MEGR sobre la viabilidad espermática.

Al analizar la viabilidad espermática los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos con respecto al control (Figura 16).

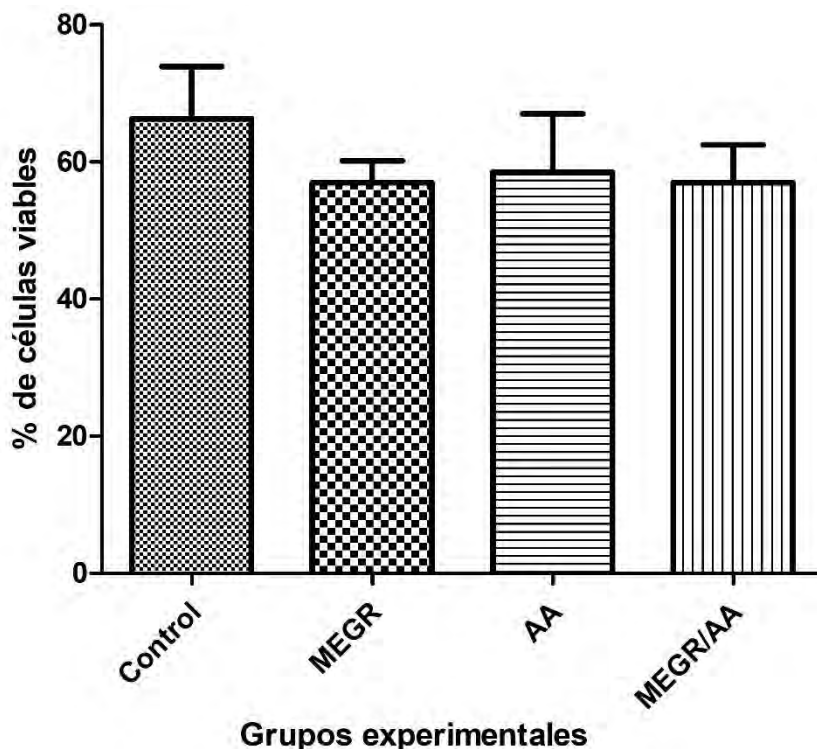


Figura 16. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la viabilidad de los espermatozoides. No hubo diferencias estadísticamente significativas. ANOVA y Tukey  $\geq 0.05$ .

#### 7.4 Efecto de la administración MEGR y la exposición de A.A sobre la integridad de la membrana espermática (Hos-test).

En esta prueba se cuantificó el porcentaje de células con daño en la membrana del espermatozoide. En este parámetro se observó que en el grupo AA ocasionó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células con membrana intacta (sin daño), respecto al grupo control. Por otro lado, el tratamiento con MEGR ocasionó una disminución significativa en la cantidad de células sin daño respecto al grupo control. El tratamiento con MEGR y AA causó una tendencia en el aumento de porcentaje de células espermáticas sin daño en la membrana espermática comparado con el grupo AA (Figura 17).

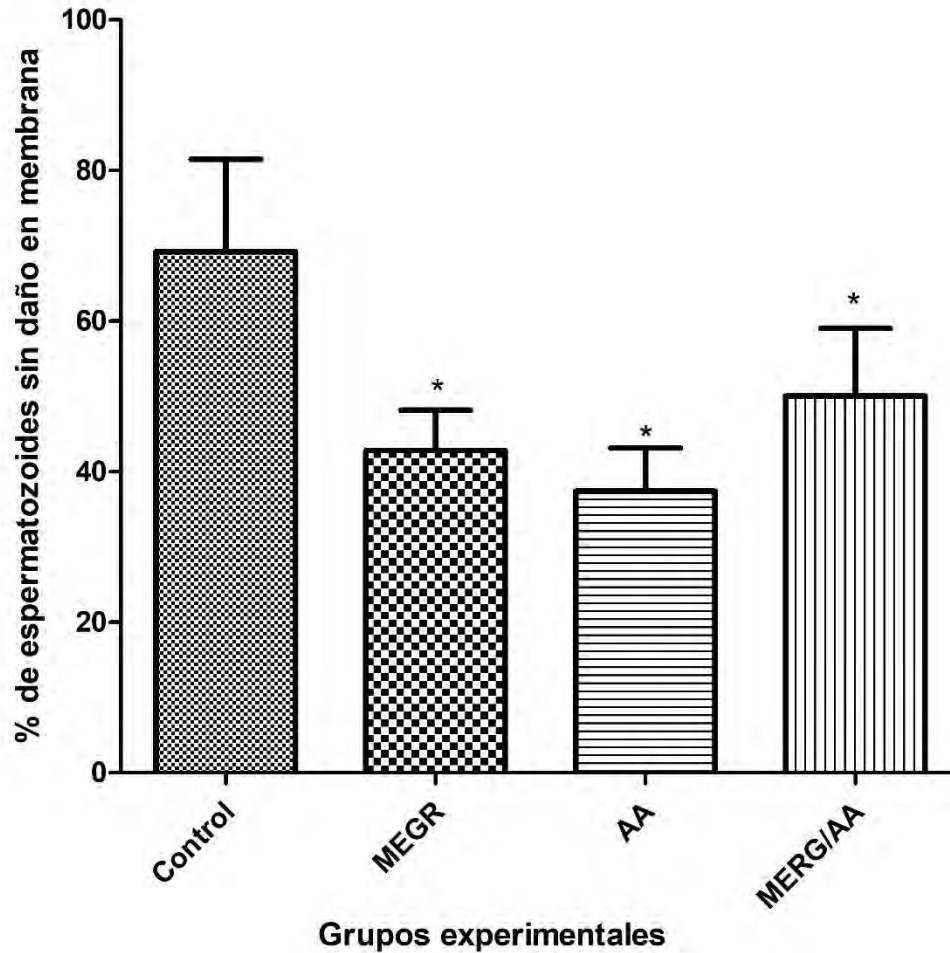


Figura 17. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la integridad de la membrana espermática (Hos-test). \* Diferencias estadísticas significativas respecto al control. ANOVA y Tukey  $\geq 0.05$ .

### 7.5 Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).

Un indicador del daño oxidante que se produjo por la exposición a la AA fue la estimulación de la actividad de la enzima GPx, la cual fue medida por el porcentaje de actividad comparada con el testigo después de la exposición. Se observó que el grupo tratado con AA hubo una tendencia en el aumento de la actividad de GPx respecto al grupo control, adicionalmente, el grupo tratado con MEGR ocasionó un aumento significativo de la actividad de la GPx en comparación del grupo control (Figura 18).

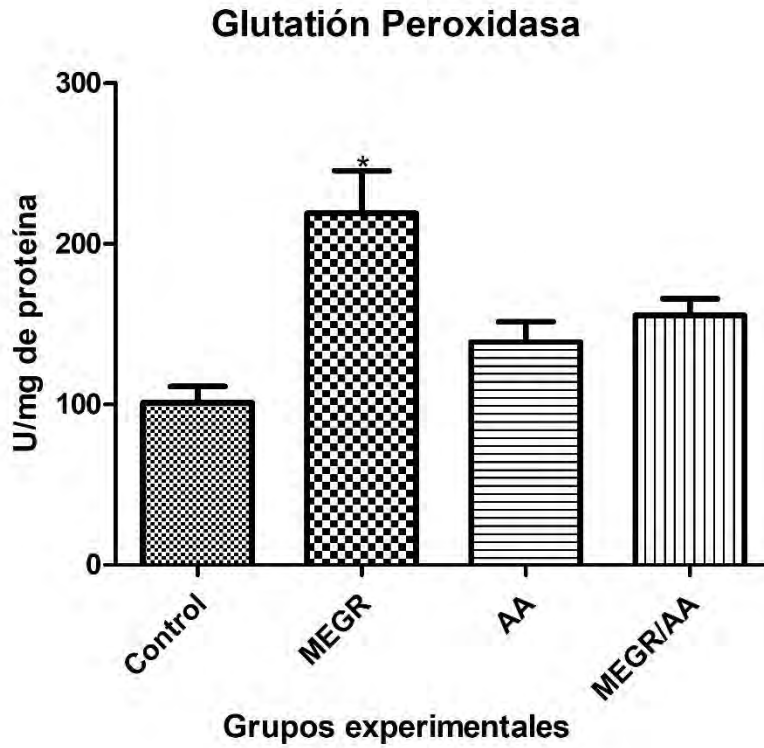


Figura 18. Efecto de la administración MEGR y la exposición de AA sobre la actividad de glutatión peroxidasa \*Diferencias estadísticas significativas respecto al control, ANOVA y Tukey  $\geq 0.05$ .



## VIII DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante del microencapsulado de granada roja (MEGR) sobre la calidad de los espermatozoides de ratones CD1+ expuestos a acrilamida (AA). Para cumplir con el objetivo, se determinó el daño ocasionado por la exposición a AA (25mg/kg/d) sobre la calidad espermática y a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide y su efecto sobre la actividad de la enzima GPx.

En la actualidad, la población se expone a una gran cantidad de sustancias tóxicas, los cuales representan un factor de riesgo en la salud, estas sustancias se acumulan en el organismo causando efectos dañinos por ejemplo a nivel de material genético, celular, neuronal y a nivel reproductivo. Por estos motivos actualmente se realizan estudios para determinar efectos y elucidar posibles vías de acción de estos xenobióticos (138). La acrilamida es una de estas sustancias que causan toxicidad; diferentes estudios han demostrado la exposición a la AA ocasiona daños a nivel reproductivo afectando distintos parámetros de calidad de los espermatozoides como son el movimiento, la concertación y la viabilidad, incluso afecta la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx). La exposición a la AA ocurre principalmente por vía oral, a través de la ingestión de alimentos, agua potable y por contacto ocupacional. El efecto de la AA en diferentes sistemas está definido, ya que se conoce su metabolismo y se han propuesto diferentes mecanismos de acción.

### **Efecto de la AA y del MEGR sobre la calidad espermática**

Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la motilidad espermática mostraron que los grupos tratado con AA y tratado con MEGR tuvieron una disminución estadísticamente significativa en cuanto al número de células móviles, respecto al grupo control (35% y 42% vs 68% respectivamente), adicionalmente, en el grupo tratado conjuntamente con MEGR y AA se observó un aumento significativo en el número de células móviles comparado con el grupo tratado solamente con AA

(58.75% vs 35%). En lo que respecta a la concentración espermática, esta difirió significativamente al comparar el grupo tratado con AA en relación al grupo control ( $221 \times 10^6$  cel/mL vs  $311 \times 10^6$  cel /mL). En cuanto a la viabilidad no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

En trabajos realizados en ratones en donde se estudió el efecto de la AA sobre los parámetros espermáticos, se mostró que la administración de la AA (50 mg/kg/d) vía intraperitoneal (ip) disminuye la concentración de los espermatozoides del epidídimo y puede ocasionar lesiones histopatológicas en los testículos (139). Mohammad y colaboradores (2010) (140), estudiaron ratones expuestos a AA en el agua potable a dosis de 5 mg/kg/d y 10 mg/kg/d durante 2 meses y no observaron diferencias significativas en la motilidad de los espermatozoides entre los grupos tratados pero si diferencias significativas con respecto al grupo control.

En un estudio realizado en ratones a los cuales se les dio AA disuelta en una solución de agua destilada (10 mg/kg/d) durante 35 días se observó una reducción significativa en la calidad espermática incluyendo a la concentración espermática (32,141). Por otra parte en ratones expuestos a AA vía i.p (50 mg/kg/d) el conteo de espermatozoides se vio disminuido (139). En un trabajo hecho en ratones en donde se estudió el efecto de la A.A sobre los parámetros espermáticos, mostró que la administración de la AA (0, 5, 15, 30, 45 y 60 mg/kg/d), vía intragástrica disminuyó la concentración de los espermatozoides del epidídimo de manera dosis-dependiente ocasionando lesiones histopatológicas en los testículos (46). En un trabajo realizado en ratones a los cuales se les administró AA (5 y 10 mg/kg/d), vía intragástrica se observó una disminución significativa en la motilidad de los espermatozoides (142). En diversos trabajos, se observado una disminución significativa en la concentración y la viabilidad espermática en roedores expuestos a diversas dosis de AA (4, 8–10). Adicionalmente, se ha reportado que la AA daña directamente las células de Leydig y afecta a la función endócrina de los testículos (143), además, se ha demostrado que la AA tiene efectos tóxicos sobre túbulos seminíferos y disminuye la producción de espermatozoides en ratas macho (47). Yang y colaboradores (2005) (144), indican que la AA induce lesiones

histopatológicas tales como la formación de células gigantes multinucleadas, vacuolización y la producción de un alto número de células apoptóticas en los túbulos seminíferos de la rata. También se ha observado el efecto dependiente de la dosis de AA en la reducción de los niveles de testosterona en suero y la viabilidad de las células de Leydig, lo cual da como resultado una disminución de la espermatogénesis (29). Estos estudios sugieren que la exposición a la AA contribuye a una reducción en la fertilidad y tiene un impacto negativo en la capacidad reproductiva masculina (105)(145). La administración de la AA en ratones CD1+ ocasionó un notable estrés oxidativo durante los 6 días de tratamiento, causando un daño a nivel de membrana plasmática y de ADN del espermatozoide. Se administró un MEGR (3000 mg/kg/d) durante 14 días vía intragástrica con la finalidad de proteger a los espermatozoides del daño ocasionado por la exposición a AA, la administración del MEGR a lo largo del tratamiento no protegió contra el daño ocasionado por la AA. Esto sugiere que el MEGR no fue capaz de establecer una homeostasis en el estado de oxido-reducción del espermatozoide. Cabe mencionar que el periodo de exposición de los ratones CD1+ al MEGR fue de 14 días, probablemente es un periodo muy corto para empezar a ver efectos protectores del MEGR. Por otra parte, el MEGR se elabora mediante secado por aspersión, en este tratamiento térmico, al cual se somete el jugo de la granada roja, el jugo entra en contacto con una corriente de aire entre 150 C° a 300 C°, puede ser que esta corriente de aire caliente degrade los componentes bioactivos del jugo de granada roja como son los polifenoles (flavonoides) ya que estos compuestos son termolábiles, esto podría explicar porque el MEGR no tuvo un efecto positivo en nuestro trabajo. En un estudio se realizaron pruebas térmicas en jugo fresco de granada en donde muestras de 10 mL de jugo de granada fueron sometidas a calentamiento (70, 80 y 90°C), el objetivo de este estudio fue determinar la pérdida de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico (vitamina C) del jugo de granada, se realizaron mediciones de contenido de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico en intervalos de 15 min. Este estudio reveló que hay una disminución del 90% del contenido fenólico total y una disminución del 69% de ácido ascórbico después del tratamiento térmico (70°C por 90 min), se sugiere que

la pérdida de estos componentes está en relación al tiempo-temperatura del proceso (146). Igualmente, en otro trabajo en donde se evaluó un microencapsulado de granada roja con la finalidad de evaluar el contenido de antocianinas, se utilizó jugo de granada fresco y se emplearon distintos agentes encapsulantes (maltodextrina, goma arábica y almidón). Para la producción del polvo la temperatura de aire de entrada fue de 140°C y una temperatura de aire de salida de 102°C. Se reportó que contenido de antocianinas se vio afectado por la temperatura empleada a la hora de producir el polvo, esa disminución también puede tener relación con el agente encapsulante usado. Concluyendo que el contenido de antocianinas es dependiente de la temperatura y del agente encapsulante utilizado en el proceso de secado por aspersión (122). De igual forma microencapsularon jugo de granada y manzana (75/25), utilizando goma arábica-maltodextrina y encontraron que el contenido de polifenoles se conservó en aproximadamente un 50%, sin embargo, la capacidad antioxidante fue muy baja (147).

Por otro lado, algunos reportes previos en los cuales se administraron ratas con jugo de granada (3 mL/kg/d) y AA (100 mg/kg/d) vía oral durante 30 días, se observó que en el grupo administrado con AA y jugo de granada, los parámetros espermáticos mejoraron significativamente en comparación del grupo tratado con AA, incluso, hubo un incremento en los niveles de testosterona, los autores concluyeron que el jugo de granada roja tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo ocasionado por la AA (8). Asimismo, cuando se administró vía intragástrica el extracto metanólico de pericarpio de granada (500 mg/kg/d) y acetato de plomo (8 mg/kg/d) en roedores por 35 días, se observó que el extracto metanólico de pericarpio de granada revierte el efecto deletéreo producido por el acetato de plomo, aumentando el número de espermatozoides en el epidídimo, por lo tanto, sugiere que la granada podría ser útil en el tratamiento de infertilidad (9). Igualmente se ha observado que el extracto metanólico de granada (100mg/kg/d) tuvo un efecto protector cuando se administró junto con ciclofosfamida (15mg/kg/d) durante un periodo de 4 semanas, aumentando el conteo, la motilidad y la morfología espermática comparado con el grupo tratado con ciclofosfamida, este estudio sugiere que el jugo de granada o sus

ingredientes bioactivos son un candidato prometedor en la protección de la toxicidad testicular producida por la ciclofosfamida (10).

### **Efecto de la A.A y del MEGR sobre la integridad de la membrana espermática (Hos-test)**

En esta parte del estudio se observó que el grupo tratado con A.A tuvo una diferencia significativa en el porcentaje de células con la membrana dañada, respecto al grupo control (63% vs 30.8% respectivamente), por otro lado, el grupo MEGR difirió significativamente con el grupo testigo (56% vs 30.8%). En un estudio realizado en ratones tratados con A.A (5 mg/kg/d y 10 mg/kg/d) mostró que la viabilidad de los espermatozoides disminuyó en los grupos experimentales, en la membrana intacta funcional de la cola de espermatozoide en los grupos (5 mg/kg/d) y (10 mg/kg/d) tuvo una disminución significativa, pero la integridad de la membrana de la cabeza del espermatozoide disminuyó significativamente sólo en el grupo de dosis (10 mg/kg/d) (140).

La prueba hos-test es una prueba que indica la integridad funcional de la membrana del espermatozoide. Implica la exposición del espermatozoide a soluciones hipo-osmóticas en las que el espermatozoide bioquímicamente aumenta su tamaño con la finalidad de establecer con equilibrio hídrico entre el compartimento intracelular y el extracelular, esto termina en un hinchamiento de la membrana plasmática abarcando cabeza y cola del espermatozoide (148). El flujo del fluido hace que la cola del espermatozoide se enrolle, un porcentaje alto de espermatozoides enrollados indica una membrana funcional e intacta (149).

Debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) especialmente ácido docosahexanoico, los espermatozoides son especialmente sensibles al daño producido por especies reactivas de oxígeno (ERO), en comparación de cualquier otra célula somática (150). Los ERO pueden generar daño en los lípidos de la membrana plasmática, dando origen a la producción de lipoperóxidos y sus productos de degradación como el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos (4-HA) son altamente tóxicos para las células sexuales masculinas y provocan daños irreversibles a la motilidad. La A.A es una molécula que actúa como radical

libre, tiene la capacidad reaccionar con otras moléculas como son los lípidos, proteínas y ADN. En este caso la A.A reacciona con los AGPI de la membrana plasmática de los espermatozoides tomando un átomo  $H^+$  esto hace que los lípidos se desestabilicen generando estrés oxidativo mediante la inducción de lipoperoxidación de lípidos. Este proceso afecta la microarquitectura de la membrana plasmática y altera la permeabilidad, lo cual se traduce en alteraciones en la motilidad y morfología del espermatozoide.

En este estudio la administración de la AA produjo radicales libres, los cuales provocaron un daño a nivel de membrana plasmática de los espermatozoides. El tratamiento con MEGR en ratones CD1+ expuestos a AA, no mostró un efecto protector a nivel de membrana plasmática durante los 14 días de tratamiento. Este sugiere que la dosis probada de MEGR en ratones CD1+ no contrarrestó el efecto oxidante de la AA, que se producen por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que contiene la membrana celular del espermatozoide. Sin embargo, otras investigaciones han demostrado un efecto antioxidante a partir del uso del jugo de la granada o extractos de cada una de sus partes. En un estudio *in vitro* se probó un extracto etanólico de jugo de granada (0, 2.5, 5 y 7.5mg/l<sup>-1</sup>), encapsulado en un liposoma, en espermatozoides de carnero que fueron congelados y posteriormente descongelados, este procedimiento conlleva una producción de ERO's los cuales dañan la membrana plasmática del espermatozoide, se realizaron pruebas de calidad espermática y entre estas se realizó la prueba Hos-test. En este estudio se concluyó que el jugo de granada puede mejorar la calidad de los espermatozoides y el daño en membrana plasmática ocasionado por la descongelación, gracias a los compuestos fenólicos propios de la granada (151). Por otro lado, hay estudios en los cuales congelaron el semen de animales con la finalidad de disminuir el metabolismo y extender la vitalidad de los espermatozoides, este proceso de conservación deteriora la calidad del semen, uno de los causantes del deterioro es la generación de ERO's como ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos formados por la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides. En este caso, se empleó el jugo de la granada ya que hay evidencia en la que demuestra que el jugo de granada es rico en antioxidantes y es

capaz de reducir el estrés oxidativo ocasionado por ERO's, estos estudios concluyen que el jugo de granada mejora la motilidad y la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación (152,153).

### **Efecto de la administración MEGR y la exposición de A.A sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)**

En cuanto a la actividad de la enzima GPx el grupo de MEGR difirió significativamente respecto al grupo control (218.8 U/mg de proteína vs 100.8 U/mg de proteína). En un estudio realizado en ratones se evaluó la actividad enzimática de GPx y SOD los animales fueron administrados con AA (50 mg/kg/d) vía intragástrica por 5 días, se encontró una disminución en la actividad de la GPx (139). Por otra parte, en una investigación se reportó que la administración de AA (vía oral 0.05% p/v) en agua potable causa una disminución en la actividad enzimática de la GPx en testículos y epidídimo (154).

En otro trabajo realizado en ratas se estudió el daño oxidativo ocasionado por la AA (40 mg/kg/día) en cerebelo, se midieron enzimas antioxidantes como GPx y SOD resultando una disminución significativa en la actividad tanto de GPx como de SOD (155).

La AA es una molécula electrófila la cual reacciona con moléculas nucleófilas como son los compuestos azufrados de la GPx, en este caso la AA reacciona con la glicina de la GPx inactivando los grupos tioles, esto ocasiona una disminución en la actividad de la enzima, se ha sugerido que la AA causa un cambio conformacional en el sitio activo (156). Esto coincide con los resultados que obtuvimos, se observó una disminución en la actividad de la GPx en los animales tratados con AA. Se ha encontrado que la AA causa alteraciones en el estado oxidativo y en las actividades de diversas enzimas (156). En el presente estudio, se midió la actividad de GPx para evaluar el estrés y el daño oxidativo ocasionado por la AA durante el tratamiento con el MEGR en ratones CD1+. La administración de la AA durante 6 días produjo estrés y daño oxidativo evidenciado a través de un aumento en la

actividad de la GPx. En este apartado el tratamiento con MEGR (3000mg/kg/d) en ratones CD1+ tuvo una actividad antioxidante, incrementó o mantuvo los niveles de la GPx a lo largo de los 14 días de administración con una diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo control y el grupo administrado con AA, esto se debe a la AA la cual actúa como radical libre, por lo tanto, el sistema antioxidante se ve obligado en aumentar su actividad para lograr un balance en el sistema REDOX. En un estudio en ratas se evaluó el efecto protector del jugo de granada (vía oral diluido en agua en un volumen de 1:3, el agua era cambiada cada 2-3 días) contra el estrés oxidativo producido por el tetracloruro de carbono (vía i.p 2 mL/kg/d) en testículos. Los resultados de este trabajo demostraron claramente que el jugo de granada aumenta la actividad antioxidante incluyendo la actividad de la GPx contra la toxicidad reproductiva inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y proporciona evidencia de que puede tener un papel terapéutico en las enfermedades mediadas por radicales libres (112). Por otro lado, un estudio en roedores sanos en donde se evaluó el efecto del consumo del jugo de granada en distintas dosis (0.25 mL, 0.50 mL, 0.75 mL y 1 mL vía intragástrica), dentro de los estudios se determinó la actividad de la GPx. En donde se observó un aumento en la actividad de la GPx en plasma y en células espermáticas en las distintas dosis de jugo de granada administradas, demostrando que el jugo de granada posee un potente efecto antioxidante (111).



## **IX CONCLUSIONES**

Los resultados demostraron que la exposición de los ratones a la AA, tiene efectos negativos sobre todos los parámetros analizados. La AA actúa como radical libre dañando al espermatozoide afectando negativamente la motilidad, concentración, viabilidad, la integridad de la membrana y la actividad enzimática de la GPx en los espermatozoides de ratones CD1+. Por lo tanto, se pueden llegar a las siguientes conclusiones.

1. La acrilamida afectó negativamente la motilidad, concentración, viabilidad, la integridad de la membrana y la actividad enzimática de la GPx en los espermatozoides de ratones CD1+.
2. La administración aguda del MEGR (3000 mg/kg/d) no presentó cambios estadísticamente significativos en la motilidad espermática en ratones CD1+ inducidos a estrés oxidativo por AA durante los 20 días de tratamiento.
3. La administración aguda del MEGR (3000 mg/kg/d) no produjo cambios estadísticamente significativos en la concentración espermática en ratones CD1+ inducidos a estrés oxidativo por AA durante los 20 días de tratamiento.
4. La administración aguda del MEGR (3000 mg/kg/d) no generó cambios estadísticamente significativos en la viabilidad de los espermatozoides de ratones CD1+ inducidos a estrés oxidativo por AA durante los 20 días de tratamiento.
5. La administración aguda del MEGR (3000 mg/kg/d) no mostró un efecto protector a nivel de membrana plasmática en ratones CD1+ inducidos a estrés oxidativo por AA durante los 20 días de tratamiento.
6. La administración aguda del MEGR (3000 mg/kg/d) presentó incremento significativo sobre la actividad enzimática de GPx durante el periodo de tratamiento.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Repropedia a Reproductive Lexicon [Internet]. spermatogenesis. 2011 [citado el 30 de diciembre de 2014]. Disponible en: <http://www.repropedia.org/spermatogenesis>
2. Carlson. Embriología humana y biología del desarrollo. España; 2014. 505 p.
3. Plant TM (Tony M., Zeleznik A, Knobil E. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 24 p.
4. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3–5):323–30.
5. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 1:1–8.
6. Albarrán RT, Rule MB, Hernández EC. Los gametos: células reproductoras de los mamíferos, Capítulo 1: Espermatozoide, el gameto masculino. Manual Moderno; 2005. 119 p.
7. Motamed Khorasani A, Cheung AP, Lee CY. Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. *J Androl.* 2000;21(4):586–94.
8. Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* 2002;110(6):731–6.
9. Jimenez. *Biología Celular Y Molecular.* 4°. Pearson Educación; 2002. 679-737 p.
10. Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl.* 2004;27(6):335–42.
11. O'Shaughnessy PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:55–65.
12. Zhang Y, Zhang Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Crit Rev Food Sci Nutr.*

2007;47(5):521–42.

13. Navarro IM, Armendáriz CR, Fernández AG, Fenández AC, Torre AH de la. La acrilamida, contaminante químico de procesado:Revisión. *Rev Toxicol*. 2007;24(1):1–9.
14. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2004;25(4):617–30.
15. Raju J, Roberts J, Taylor M, Patry D, Chomyshyn E, Caldwell D, et al. Toxicological effects of short-term dietary acrylamide exposure in male F344 rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;39(1):85–92.
16. Mojska H, Gielecińska I, Szponar L, Ołtarzewski M. Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(8–9):2090–6.
17. Ölmez H, Tuncay F, Özcan N, Demirel S. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *J Food Compos Anal*. 2008;21(7):564–8.
18. (JECFA) SR of the S-FM of the JFEC on FA. World Health Organization. Rome, Italy; 2005.
19. Valenzuela B R, Ronco M AM. ACRILAMIDA EN LOS ALIMENTOS. *Rev Chil Nutr*. 2007;34(1):8–16.
20. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, et al. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit Rev Toxicol*. 2008;36(6–7):481–608.
21. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*. 2002;419(6906):448–9.
22. Gökmen V, Şenyuva HZ. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem*. 2007;103(1):196–203.
23. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, et al. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 2002;419(6906):449–50.
24. Fredriksson H, Tallving J, Rosén J, Åman P. Fermentation Reduces Free

- Asparagine in Dough and Acrylamide Content in Bread. *Cereal Chem.* 2004;81(5):650–3.
25. Yaylayan VA, Wnorowski A, Perez Locas C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J Agric Food Chem.* 2003;51(6):1753–7.
  26. Catalogación por la Biblioteca de la OMS.
  27. Doroshenko O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, et al. In vivo Role of Cytochrome P450 2E1 and Glutathione-S-Transferase Activity for Acrylamide Toxicokinetics in Humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* el 2009;18(2):433–43.
  28. Tritscher AM. Human health risk assessment of processing-related compounds in food. *Toxicol Lett.* 2004;149(1–3):177–86.
  29. Yang H-J, Lee S-H, Jin Y, Choi J-H, Han D-U, Chae C, et al. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol.* 2005;19(4):527–34.
  30. Nixon BJ, Stanger SJ, Nixon B, Roman SD. Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice. *Toxicol Sci.* 2012;129(1):135–45.
  31. Edwards PM. The distribution and metabolism of acrylamide and its neurotoxic analogues in rats. *Biochem Pharmacol.* 1975;24(13–14):1277–82.
  32. Sakamoto J, Hashimoto K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice ? effects on fertility and sperm morphology. *Arch Toxicol.* 1986;59(4):201–5.
  33. Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, et al. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(2):266–71.
  34. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4504–26.

35. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SPD, Müller DJG, et al. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(3):365–410.
36. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4504–26.
37. Dixit R, Mukhtar H, Seth PK, Murti CR. Conjugation of acrylamide with glutathione catalysed by glutathione-S-transferases of rat liver and brain. *Biochem Pharmacol.* 1981;30(13):1739–44.
38. Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR. Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-<sup>13</sup>C]acrylamide in rats and mice using <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(1):81–9.
39. Duale N, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen JE, et al. Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicol Sci.* 2009;108(1):90–9.
40. Fennell TR, Sumner SCJ, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, et al. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci.* 2005;85(1):447–59.
41. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4504–26.
42. Vikström AC, Abramsson-Zetterberg L, Naruszewicz M, Athanassiadis I, Granath FN, Törnqvist MÅ. In Vivo Doses of Acrylamide and Glycidamide in Humans after Intake of Acrylamide-Rich Food. *Toxicol Sci.* 2011;119(1):41–9.
43. LoPachin RM, DeCaprio AP. Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. *Toxicol Sci.* 2005;86(2):214–25.
44. Song H-X, Wang R, Cao S-X, Liu T-Z. [Toxicity of acrylamide on male reproduction]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2008;14(2):159–62.
45. Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, et al. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a

- test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(2):266–71.
46. Yang H-J, Lee S-H, Jin Y, Choi J-H, Han C-H, Lee M-H. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci.* 2005;6(2):103–9.
  47. Wang H, Ge J, Zhou Z, Wang Z, Shi F. [Oral acrylamide affects the development and reproductive performance of male rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007;13(6):492–7.
  48. Paniagua R, Rodríguez MC, Nistal M, Fraile B, Regadera J, Amat P. Changes in surface area and number of Leydig cells in relation to the 6 stages of the cycle of the human seminiferous epithelium. *Anat Embryol (Berl).* 1988;178(5):423–7.
  49. Zeynep Atay N, Çalgan D, Özakat E, Varnali T. Acrylamide and glycidamide adducts of Guanine. *J Mol Struct THEOCHEM.* 2005;728(1–3):249–51.
  50. S. O. Acrylamide in food - formation of acrylamide and its damages to health. Otles S, Otles S 2004 Acrylamide food - Form acrylamide its damages to Heal Electron J Polish Agric Univ Ser Food Sci Technol 07 (2). 2004;2(7).
  51. Sharma R. Biochemical changes in the liver of Swiss albino mice orally exposed to acrylamide. *Maejo Int J Sci Technol.* 2008;2(3):542–50.
  52. Elejalde Guerra JI. *Anales de medicina interna.* Vol. 18, *Anales de Medicina Interna.* Ar n Ediciones, S.A; 2001. 50-59 p.
  53. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1005-28.
  54. Aitken RJ, De Iulii GN, Gibb Z, Baker MA. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reprod Domest Anim.* 2012;47 Suppl 4:7–14.
  55. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl.* 2004;6(1):59–65.

56. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):616–27.
57. Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta H. Melatonin hormone profile in infertile males. *Int J Androl*. 2006;29(3):409–13.
58. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*. 1998;21(2):81–94.
59. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*. 1998;21(2):81–94.
60. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 1998;13 Suppl 4:11–9.
61. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*. 2009;129(4):357–67.
62. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(3):169–73.
63. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *J Androl*. enero de ;27(5):619–26.
64. Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod*. 1995;10(8):2061–71.
65. Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res*. 2003;529(1–2):21–34.

66. Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod*. 2015;21(6):502–15.
67. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(1):32–58.
68. Aitken R, Smith T, Jobling M, Baker M, De Luliis G. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31.
69. Shaliutina-Kolešo A, Gazo I, Cosson J, Linhart O. Protection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma. *Fish Physiol Biochem*. 2014;40(6):1771–81.
70. Koppers AJ, De Luliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3199–207.
71. Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):112–9.
72. Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili E. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*. 1997;57(6):1502–8.
73. Holland MK, Storey BT. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. *Biochem J*. 1981;198(2):273–80.
74. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*. 1987;8(5):338–48.
75. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid



- peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183–97.
76. Basu A, Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.* 2009;67(1):49–56.
  77. Fadavi A. Note. Physicochemical Composition of Ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Iran. *Food Sci Technol Int.* 2005;11(2):113–9.
  78. Meerts IATM, Verspeek-Rip CM, Buskens CAF, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, et al. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(6):1085–92.
  79. Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* 2009;115(4):1274–8.
  80. Sasahara T, Yamashita T, Sviridov D, Fidge N, Nestel P. Altered properties of high density lipoprotein subfractions in obese subjects. *J Lipid Res.* 1997;38(3):600–11.
  81. Vidal A, Fallarero A, Peña BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol.* 2003;89(2–3):295–300.
  82. Viuda-Martos M, López-Marcos MC, Fernández-López J, Sendra E, López-Vargas JH, Pérez-Álvarez JA. Role of Fiber in Cardiovascular Diseases: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(2):240–58.
  83. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579(1–2):200–13.
  84. Commission CA. Joint FAO/WHO food standards programme Suiza: Codex Alimentarius Commission [Internet]. 2010. Disponible en: [www.codexalimentarius.org/download/report/731/al33\\_35s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/report/731/al33_35s.pdf)
  85. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic

modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5):1062–76.

86. Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 2008;56(3):1148–57.
87. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000;48(10):4581–9.
88. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem.* 2002;50(1):166–71.
89. July VI, Venkata C, Prakash S, Prakash I. Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate ( *Punica granatum* ) Juice , Seed and Peel-A Review. *Int J Res Chem Environ.* 2011;1:1–18.
90. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579(1–2):200–13.
91. García-Viguera C, Pérez-Vicente A. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. Arán Ediciones;
92. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(6):635–54.
93. Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1–2):335–9.
94. Choi J-G, Kang O-H, Lee Y-S, Chae H-S, Oh Y-C, Brice O-O, et al. In Vitro

and In Vivo Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract against Salmonella. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:690518.

95. Rosenblat, M. y AM. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. CRC Press; 2006. 264 p.
96. Miguel G, Dandlen S, Antunes D, Neves A, Martins D. The Effect of Two Methods of Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice Extraction on Quality During Storage at 4°C. J Biomed Biotechnol. 2004;2004(5):332–7.
97. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. J Agric Food Chem. 2008;56(4):1415–22.
98. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clin Nutr. 2004;23(3):423–33.
99. Betanzos-Cabrera G, Guerrero-Solano JA, Martínez-Pérez MM, Calderón-Ramos ZG, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. Food Res Int. 2011;44(5):1381–5.
100. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer. 2005;113(3):423–33.
101. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem. 2005;16(6):360–7.

102. Lansky EP. Beware of pomegranates bearing 40% ellagic Acid. *J Med Food*. 2006;9(1):119–22.
103. El-Nemr SE, Ismail IA, Ragab M. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Food / Nahrung*. 1990;34(7):601–6.
104. Al-Muammar MN, Khan F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*. 2012;28(6):595–604.
105. Mansour SW, Sangi S, Harsha S, Khaleel MA, Ibrahim ARN. Sensibility of male rats fertility against olive oil, *Nigella sativa* oil and pomegranate extract. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(7):563–8.
106. Mansour SW, Sangi S, Harsha S, Khaleel MA, Ibrahim ARN. Sensibility of male rats fertility against olive oil, *Nigella sativa* oil and pomegranate extract. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(7):563–8.
107. Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr*. 2008;27(2):289–96.
108. Jadon G, Nainwani R, Singh D, Soni PK, Diwaker AK. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VARIOUS PARTS OF *Punica Granatum*: A REVIEW. Vol. 2, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*.
109. Türk G, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A, Ateşşahin A. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(2):177–82.
110. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*. 2014;3:100.
111. Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr*. 2008;27(2):289–96.
112. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM, Abdel Moneim AE. Protective

- effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:164.
113. Huertas RAP. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Rev Fac Nac Agron - Medellín*. 2010;63(2):5669–84.
114. J. Yáñez Fernández, J.A. Salazar Montoya, L. Chaires Martínez, J. Jiménez Hernández MMR y EGRR. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Ind Alim*. 2002;1(28):10–2.
115. Bryshila Lupo Pasin, Carmen González Azón AMG. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev Venez Cienc Tecnol Aliment*. 2012;1(3):130–51.
116. Fuchs M, Turchiuli C, Bohin M, Cuvelier ME, Ordonnaud C, Peyrat-Maillard MN, et al. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *J Food Eng*. 2006;75(1):27–35.
117. Filardo Kerstrupp S, García Espinosa G. Mermelada horneable de xoconostle, aplicación y su uso en tartas. *Ind Ailim*. 2010;6(32):48–58.
118. Islas RP, Bravo SM, Carter EJV. Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Rev Mex Ing Química*. 2002;1(1–2):37–44.
119. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*. mayo de 2008;25(5):999–1022.
120. Finotelli PV R-LM. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and Capsul using Spray-Drying. 2005.
121. Sagar VR, Suresh Kumar P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *J Food Sci Technol*. 2010;47(1):15–26.
122. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum L.*). *J Food Sci Technol*. 2011;48(6):677–84.
123. Parize A, Souza T de, Brighente I, Fávere V de, Laranjeira M, Spinelli A, et al.

- African journal of biotechnology. Vol. 7, African Journal of Biotechnology. Academic Journals; 2002.
124. Gutiérrez CG, Maldonado MBG, Martínez LAO, Roldán HM. Microencapsulación de jugo de cebada verde mediante secado por aspersion. Cienc y Tecnol Aliment. 2004;4(4):262–6.
  125. Sagar VR, Suresh Kumar P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. J Food Sci Technol. 2010;47(1):15–26.
  126. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod. 2007;22(6):1506–12.
  127. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. Cent Eur J Urol. 2013;66(1):60–7.
  128. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. World J Mens Health. 2014;32(1):1–17.
  129. Jadon G, Nainwani R, Singh D, Soni PK, Diwaker AK. Antioxidant activity of various parts of punica granatum: a review. J Drug Deliv Ther. 2012;2(6):138–41.
  130. OEIDRUS SP. Sustentable, Sistema Estatal de Información Para el Desarrollo Rural. 2014.
  131. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación (6 de diciembre 1999).
  132. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial de la Federación (6 de enero de 1987).
  133. (WHO). World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen Interaction, and Semen Cervical Mucus. UK; 2010.
  134. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization; 2010. 271 p.

135. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):219–28.
136. Mojica-Villegas MA, Izquierdo-Vega JA, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M. Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. *Nutrients.* 2014;6(2):489–503.
137. Noble JE, Bailey MJA. Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods Enzymol.* 2009;463:73–95.
138. Dickerson RL, Hooper MJ, Gard NW, Cobb GP, Kendall RJ. Toxicological foundations of ecological risk assessment: biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species. *Environ Health Perspect.* 1994;65–9.
139. Zhao M, Liu X, Luo Y, Guo H, Hu X, Chen F. Evaluation of Protective Effect of Freeze-Dried Strawberry, Grape, and Blueberry Powder on Acrylamide Toxicity in Mice. *J Food Sci.* 2015;80(4):H869–74.
140. Kermani-Alghoraishi M, Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;153(1):52–5.
141. Pouretezari M, Talebi A. Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(5):335–42.
142. Zhang J, Yue W, Ren Y, Zhang C. Enhanced role of elaidic acid on acrylamide-induced oxidative stress in epididymis and epididymal sperm that contributed to the impairment of spermatogenesis in mice. *Toxicol Ind Health.* 2010;26(8):469–77.
143. Song H-X, Wang R, Geng Z-M, Cao S-X, Liu T-Z. [Subchronic exposure to

- acrylamide affects reproduction and testis endocrine function of rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2008;14(5):406–10.
144. Yang H-J, Lee S-H, Jin Y, Choi J-H, Han C-H, Lee M-H. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci*. 2005;6(2):103–9.
  145. Nixon BJ, Katen AL, Stanger SJ, Schjenken JE, Nixon B, Roman SD. Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *PLoS One*. 2014;9(5):e94904.
  146. Paul R, Ghosh U. Effect of thermal treatment on ascorbic acid content of pomegranate juice. *Indian J Biotechnol*. 2012;11:309–13.
  147. Martínez O, González Herrera SM, Morales J, Nuria C, Rocha E, Reyes GNT, et al. Luz Araceli.
  148. Hufana-Duran D, Mallari R. Hypo-Osmotic Swelling Test for Membrane Integrity Evaluation of Frozen-Thawed Water Buffalo (*Bubalus bubalis* Linn.) Spermatozoa. *J Sci*. 2015;
  149. Ramu S, Jeyendran RS. The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. 2013. p. 21–5.
  150. Fulbert JC, Cals MJ. [Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms]. *Pathol Biol*. 1992;40(1):66–77.
  151. Mehdipour M, Daghigh Kia H, Nazari M, Najafi A. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology*. 2017;
  152. Perumal P, Vupru K, Rajkhowa C. Effect of addition of trehalose on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Indian J Anim Res*. el 21 2015;49(6).
  153. El-Sheshtawy RI, El-Sisy GA, El-Nattat WS. Effects of pomegranate juice in Tris-based extender on cattle semen quality after chilling and cryopreservation. *Asian Pacific J Reprod*. 2016;5(4):335–9.



154. Lebda M, Gad S, Gaafar H. Effects of lipoic Acid on acrylamide induced testicular damage. *Mater Sociomed*. 2014;26(3):208–12.
155. Pan X, Zhu L, Lu H, Wang D, Lu Q, Yan H. Melatonin Attenuates Oxidative Damage Induced by Acrylamide In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1–12.
156. Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*. 2006;219(1):133–41.