



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“Efecto de la dieta hiperlipídica en la toxicidad reproductiva  
inducida por fluoruro en ratas Wistar macho”**

Tesis que para obtener el grado de:

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

Presenta:

**L. N. ITZIAR HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

Director(a) de Tesis

**DRA. JEANNETT A. IZQUIERDO VEGA**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Noviembre 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

9/noviembre/2018  
 AAM/MCBS/081/2018

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Itziar Hernández Martínez**  
 Alumna 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 la dieta hiperlipídica en la toxicidad reproductiva inducida por fluoruro en ratas Wistar macho" con el cual obtendrá el Grado de **Maestra 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. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
- PRIMER VOCAL DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA
- SECRETARIO DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
- SUPLENTE DR. EDUARDO OSIRIS MADRIGAL SANTILLÁN
- SUPLENTE DRA. ARACELI HERNÁNDEZ ZAVALA



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




DR. MANUEL SANCHEZ GUTIERREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA



Instituto de Ciencias de la Salud  
 Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautla,  
 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 estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 606846.

Se agradece al laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por prestar el material e infraestructura para la realización de esta investigación y al bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por su colaboración para el manejo de los animales de estudio.

### **Agradecimientos y dedicatorias.**

Ciertamente esta es la parte más difícil de una tesis por lo que seré breve, antes que nada agradezco a mis papas por ser mis inspiradores y darme la fuerza y apoyo en los momentos difíciles. A mi hermana y a Iker por estar siempre presentes y ser mi motivación para superarme, no sé qué haría sin ustedes.

A mi familia, por sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas. Y sobre todo a mis angelitos de la guarda, que aunque se nos adelantaron en el camino siempre me cuidan y guían mi camino.

Además quiero agradecer profundamente a la Dra. Jeannett por la paciencia y los consejos que me dio durante este proceso, por su guía y por haberme brindado su apoyo para desarrollarme como persona y profesionalmente; al doctor Manuel, por enseñarme que con música las horas en el laboratorio son más divertidas, y al resto de mis asesores, por ser un pilar fundamental para mi aprendizaje.

Y por último, pero no menos importante, agradezco a mis amigos, Yalid, Pedro, Kevin, Valeria y Chimal, que estuvieron en todo momento apoyándome para poder sacar adelante esta investigación, por extender su mano en momentos difíciles y por la amistad que me brindaron desde el primer día, de verdad mil gracias, siempre los llevaré en mi corazón.

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1 Aspectos generales de los fluoruros .....	1
1.1.1.1 Principales fuentes de fluoruro.....	1
1.1.1.2 Fluorosis en México .....	2
1.1.1.2.1 Signos de intoxicación por consumo de fluoruro.....	3
1.1.1.3 Toxicocinética del fluoruro .....	3
1.1.1.3.1 Absorción.....	3
1.1.1.3.2 Distribución.....	3
1.1.1.3.3 Biotransformación.....	4
1.1.1.3.4 Excreción .....	4
1.1.1.4 Toxicodinamia del fluoruro.....	4
1.1.1.4.1 Acción en huesos y dientes .....	4
1.1.1.4.2 Inhibidor enzimático .....	5
1.1.1.4.3 Efecto pro-oxidante del fluoruro.....	6
1.1.2 Obesidad .....	6
1.1.2.1 Definición.....	6
1.1.2.2 Etiología .....	6
1.1.2.3 Clasificación.....	7
1.1.2.4 Diagnóstico.....	7
1.1.2.4.1 Indicadores antropométricos .....	7
1.1.2.4.1.1 Índice de masa corporal.....	7
1.1.2.4.1.2 Indicadores de distribución de grasa .....	7
1.1.2.4.2 Indicadores bioquímicos .....	8
1.1.2.5 Perfil lipídico.....	8
1.1.2.5.1 Tipos de dislipidemias .....	8
1.1.2.6 Efecto pro-oxidante de la obesidad .....	9
1.1.2.7 Indicadores de obesidad y dislipidemias en ratas.....	10
1.1.2.8 La obesidad y dislipidemias en México .....	10
1.1.3 Reproducción masculina.....	11
1.1.3.1 Anatomía y fisiología testicular .....	11
1.1.3.2 Espermatogénesis y espermiogénesis.....	11
1.1.3.3 Fertilización (Capacitación y reacción acrosomal) .....	12
1.2 Antecedentes del problema .....	12

1.2.1	Estrés oxidativo y exposición a fluoruro .....	12
1.2.1.1	Estrés oxidativo y exposición a fluoruro a nivel reproductivo.....	13
1.2.2	Efectos reproductivos asociados a la exposición de fluoruro.....	13
1.2.2.1	Calidad espermática .....	14
1.2.2.2	Daño al DNA.....	14
1.2.2.3	Fertilidad .....	14
1.2.3	Estrés oxidativo y obesidad .....	15
1.2.3.1	A nivel reproductivo.....	15
1.2.4	Efectos reproductivos asociados a la obesidad y a las dislipidemias .....	15
1.2.4.1	Calidad espermática .....	15
1.2.4.2	Daño al DNA espermático .....	16
1.3	Planteamiento del problema.....	17
2	JUSTIFICACIÓN.....	18
3	HIPÓTESIS.....	19
4	OBJETIVOS.....	19
4.1	General.....	19
4.2	Específicos .....	19
5	MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
5.1	Tamaño de muestra y muestreo .....	20
5.2	Inducción de obesidad.....	20
5.3	Perfil lipídico .....	21
5.3.1	Colesterol total.....	21
5.3.2	Triglicéridos.....	22
5.4	Calidad espermática.....	23
5.4.1	Motilidad .....	23
5.4.2	Viabilidad .....	24
5.4.3	Concentración espermática.....	24
5.5	HOS-TEST.....	25
5.6	Estrés oxidativo.....	25
5.6.1	Glutación peroxidasa.....	26
5.6.2	Glutación reducido .....	27
5.6.3	Actividad antioxidante total.....	27
5.6.3.1	DPPH <sup>•</sup> .....	28
5.6.3.2	ABTS <sup>•+</sup> .....	29
5.7	Daño oxidativo.....	30
5.7.1	Malondialdehído (MDA).....	30
5.7.2	Carbonilos.....	31
5.7.2.1	Cuantificación de proteína .....	31
5.8	Concentración de fluoruro en orina .....	32
5.9	Histología testicular .....	34
5.10	Análisis estadístico.....	36
6	DIAGRAMA EXPERIMENTAL .....	37
7.	Resultados .....	38

7.1	Efecto de la DHL .....	38
7.1.1	Peso corporal .....	38
7.1.2	Ganancia de peso .....	39
7.2	Consumo de alimento .....	40
7.3	Eficiencia alimentaria .....	41
7.4	Consumo de agua .....	42
7.5	Consumo calórico .....	43
7.5.1	Contenido de grasa epididimal .....	44
7.5.2	Contenido de grasa visceral .....	45
7.5.3	Contenido de grasa retroperitoneal .....	46
7.5.4	Índice de adiposidad .....	47
7.5.5	Cuantificación de colesterol total .....	48
7.5.6	Cuantificación de triglicéridos .....	49
7.6	Calidad espermática .....	50
7.6.1	Motilidad .....	50
7.6.2	Viabilidad .....	51
7.6.3	Concentración espermática .....	52
7.6.4	HOS-Test .....	53
7.7	Estrés oxidativo .....	54
7.7.1	Glutación peroxidasa (GPx) .....	54
7.7.2	Glutación (GSH) .....	55
7.7.3	Actividad antioxidante total .....	56
7.7.3.1	DPPH <sup>·</sup> .....	56
7.7.3.2	ABTS <sup>·+</sup> .....	57
7.8	Daño oxidativo .....	58
7.8.1	Malondialdehído (MDA) .....	58
7.8.2	Carbonilos .....	59
7.9	Cuantificación de fluoruro en orina .....	60
7.10	Histología .....	61
8	DISCUSIÓN .....	62
8.1	Inducción de obesidad .....	62
8.2	Disminución del peso corporal en la co-exposición a NaF y DHL. ....	63
8.3	Efecto de la co-exposición de fluoruro y DHL sobre la calidad espermática .....	64
8.4	Estrés y daño oxidativo generado por la co-exposición a dietas hiperlipídicas y NaF. ....	66
8.5	Histología .....	67
9	CONCLUSIONES .....	70
10	REFERENCIAS .....	71
11	ANEXOS .....	90
11.1	Reactivos .....	90
11.2	Preparación de alimento .....	91
11.3	Preparación de soluciones .....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estados con elevadas concentraciones de NaF en el agua potable (5,8,9,12).....	2
Figura 2. Tren de tinción de hematoxilina y eosina .....	35
Figura 3. Diseño Experimental.....	37
Figura 4. Efecto de la DHL sobre el peso corporal de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	38
Figura 5. Efecto de la DHL sobre la ganancia de peso en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	39
Figura 6. Efecto de la DHL sobre el consumo de alimento en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	40
Figura 7: Efecto de la DHL sobre la eficiencia alimentaria en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	41
Figura 8. Efecto de la DHL sobre el consumo de agua en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	42
Figura 9. Efecto de la DHL sobre el consumo calórico en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	43
Figura 10: Efecto de la dieta DHL sobre el contenido de grasa epididimal de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF .....	44
Figura 11. Efecto de la DHL sobre el contenido de grasa visceral de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.....	45
Figura 12 . Efecto de la DHL sobre el contenido de grasa retroperitoneal de ratas expuestas subcrónicamente a NaF .....	46
Figura 13. Efecto de la DHL sobre el índice de adiposidad de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	47
Figura 14: Efecto de la DHL sobre los niveles de colesterol total de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	48
Figura 15: Efecto de la DHL sobre los niveles de triglicéridos en ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	49
Figura 16: Efecto de la DHL sobre la motilidad espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	50
Figura 17: Efecto de la DHL sobre la viabilidad espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	51
Figura 18: Efecto de la DHL sobre la concentración espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	52
Figura 19: Efecto de la DHL sobre la hipoosmolaridad de la membrana espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	53
Figura 20: Efecto de la DHL sobre la actividad de GPx de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	54
Figura 21: Efecto de la DHL sobre los niveles de GSH de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	55
Figura 22: Efecto de la DHL sobre la actividad antioxidante total (DPPH <sup>·</sup> ) de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.....	56

Figura 23: Efecto de la DHL sobre la actividad antioxidante total (ABTS <sup>·+</sup> ) de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.....	57
Figura 24: Efecto de la DHL sobre la concentración de MDA de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	58
Figura 25: Efecto de la DHL sobre la concentración de carbonilos de proteínas de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.....	59
Figura 26. Efecto de la DHL sobre la cuantificación de NaF en la orina de 24 horas de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	60
Figura 27: Efecto de la DHL sobre la histología testicular de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Diagnóstico de dislipidemias (39).....	8
Tabla 2. Técnica de cuantificación de colesterol total, utilizando el método de Naito (138) con el kit Sprinreact® 41021 .....	22
Tabla 3. Técnica de cuantificación de triglicéridos utilizando el método de Buccolo (140) con el kit Sprinreact® 1001311 .....	23
Tabla 4. Técnica para cuantificar la actividad de GPx espermático de acuerdo al método de Paglia y Valentine (147).....	26
Tabla 5. Técnica para determinación de la concentración de GSH testicular utilizando el método de Beutler (148).....	27
Tabla 6. Técnica de preparación de curva patrón de DPPH <sup>·</sup> utilizando Trolox como referencia. ....	28
Tabla 7. Preparación de la curva patrón de ABTS <sup>·+</sup> .....	29
Tabla 8. Técnica de cuantificación de NaF en orina utilizando el método potenciométrico con electrodo de ion específico (155).....	33
Tabla 9. Procedimiento para la fijación del tejido.....	34
Tabla 10. Procedimiento para la clarificación del tejido.....	34
Tabla 11. Procedimiento de inclusión en parafina de las muestras.....	34
Tabla 12. Escala de Johnsen.....	36

## ABREVIATURAS

ABTS <sup>·+</sup>	Ácido 2,2'-azino-bis- 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
CAT	Catalasa
CD	Citosina desaminasa
CT	Colesterol total
DHL	Dieta hiperlipídica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil- 1 - picrilhidrazilo
DTNB	Reactivo de Ellman
ENSANUT	Encuesta nacional de salud
ERO	Especies reactivas de oxígeno
F	Flúor
FSH	Hormona folículo estimulante
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GST	Glutación S-transferasa
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	Ácido fluorhídrico
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malondialdehido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaF	Fluoruro de sodio
NAP	Nicotinamida adenina dinucleótido
NO	Óxido nítrico
OB	Obesidad
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PC	Piruvato carboxilasa
PCO	Carbonilos proteicos
Pi	Fosfato inorgánico
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	Antioxidantes totales
Tg	Triglicéridos

## RESUMEN

El fluoruro es conocido como un contaminante ambiental. Estudios previos han demostrado que la exposición crónica a fluoruro genera infertilidad masculina asociada al estrés oxidativo. Por otra parte, la obesidad es un problema de salud pública en México, asociado negativamente con la fertilidad masculina. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la dieta hiperlipídica (DHL) sobre los daños oxidativos causados por la exposición subcrónica a fluoruro en la reproducción masculina en ratas Wistar. Después de 90 días de co-exposición a fluoruro de sodio (NaF) y la DHL se observó que disminuyó la ganancia de peso corporal 1 vez ( $P<0.01$ ), 1.5 veces el contenido de grasa epididimal ( $P<0.05$ ) y 1.8 veces la retroperitoneal ( $P<0.01$ ); sin embargo, se mantuvo el incremento del índice de adiposidad en comparación con el grupo obeso ( $7.10\pm 2.06$  vs  $9.40\pm 2.25$ ). Asimismo, en cuanto a calidad espermática, hubo un aumento de la motilidad 3.8 veces ( $P<0.001$ ) vs grupo expuesto a fluoruro, aumentó la viabilidad 1.54 veces ( $P<0.05$ ) en comparación con el grupo obeso y disminuyó la concentración espermática 1.50 veces ( $P<0.05$ ) en comparación con el grupo control. Además, incrementó 2.38 veces ( $P<0.01$ ) el número de espermatozoides con alteración en la integridad de la membrana vs grupo control. En cuanto al estrés oxidativo el grupo co-expuesto disminuyó la actividad de GPx 7.32 veces ( $P<0.001$ ) y la concentración de GSH 2.87 veces ( $P<0.001$ ) en comparación con el grupo control, igualmente generó daño oxidativo al incrementar 5.15 veces la concentración de MDA ( $P<0.001$ ) y 3.39 veces ( $P<0.001$ ) la oxidación de proteínas vs el grupo control. Las DHL tienen un efecto sinérgico con la toxicidad inducida por la exposición a fluoruro al alterar la calidad espermática y aumentar el estrés y daño oxidativo en testículo y espermatozoides.

Palabras Clave: **fluoruro, obesidad, estrés oxidativo, toxicidad reproductiva.**

## ABSTRACT

Fluoride is known as an environmental pollutant. Previous studies have shown that chronic exposure to fluoride generates male infertility associated with oxidative stress. On the other hand, obesity is a public health problem in Mexico, negatively associated with male fertility. The objective of the present study was to evaluate the effect of hyperlipidic diet (DHL) on oxidative damage caused by subchronic exposure to fluoride in male reproduction in Wistar rats. After 90 days of co-exposure to sodium fluoride (NaF) and DHL it was observed that the body weight gain decreased 1 time ( $P < 0.01$ ), 1.5 times the epididymal fat content ( $P < 0.05$ ) and 1.8 times the retroperitoneal ( $P < 0.01$ ); however, the increase in the adiposity index was maintained in comparison with the obese group ( $7.10 \pm 2.06$  vs  $9.40 \pm 2.25$ ). In addition, in terms of sperm quality, there was an increase in motility 3.8 times ( $P < 0.001$ ) vs group exposed to fluoride, increased viability 1.54 times ( $P < 0.05$ ) compared to the obese group and decreased sperm concentration 1.50 times ( $P < 0.05$ ) compared to the control group. In addition, it increased 2.38 times ( $P < 0.01$ ) the number of sperm with alteration in the integrity of the membrane vs control group. Regarding oxidative stress, the co-exposed group decreased GPx activity 7.32 times ( $P < 0.001$ ) and the GSH concentration 2.87 times ( $P < 0.001$ ) compared to the control group, also generated oxidative damage by increasing 5.15 times the MDA concentration ( $P < 0.001$ ) and 3.39 times ( $P < 0.001$ ) protein oxidation vs the control group. DHL have a synergistic effect with the toxicity induced by exposure to fluoride by altering sperm quality and increasing stress and oxidative damage in testis and sperm.

**Keywords: fluoride, obesity, oxidative stress, reproductive toxicity.**

# 1 ANTECEDENTES

## 1.1 Generalidades

### 1.1.1 Aspectos generales de los fluoruros

Los fluoruros son compuestos binarios o combinaciones de sales de flúor (F) con otros elementos, siendo el NaF el compuesto más utilizado, es agregado al suministro de agua potable y en los productos de higiene dental para prevención de caries (1). El F es un elemento químico no metálico, muy reactivo y electromagnético; forma parte de la familia de los halógenos, con el peso y número atómicos más bajos de todos los elementos conocidos de dicha familia (2,3). Se encuentra en forma de gas, muy irritante de color verde-amarillo pálido, con fuerte olor, que es tan químicamente reactivo que rara vez se produce de forma natural en el estado elemental (1).

#### *1.1.1.1 Principales fuentes de fluoruro*

Los fluoruros se producen naturalmente en la corteza terrestre, se encuentran en las rocas, el carbón, la arcilla y el suelo. Además se pueden liberar en el aire en las erupciones volcánicas, también al ser arrastrados del suelo por el viento, o cuando se calientan sustancias que contienen fluoruros a altas temperaturas, para finalmente caer en la tierra o el agua. En el agua, los fluoruros se asocian con diversos elementos principalmente con aluminio (en el agua dulce), calcio y magnesio (en el agua de mar), y sus niveles dependen de la actividad geológica y la cercanía con las fuentes de emisión volcánica (1), en los mantos acuíferos su concentración depende de la profundidad a la que se obtenga, de tal modo que la más superficial tiene menos concentración de fluoruros, en comparación con la más profunda (3). La principal fuente de consumo de fluoruros es el agua potable, aunque también está presente en alimentos, medicamentos, productos de limpieza dental, y plaguicidas (4).

Se ha determinado el nivel de riesgo mínimo para el consumo de fluoruro oral diario de 0.05 mg/kg/día, basándose en el nivel de efecto adverso no observable (NOAEL) de 0.15 mg de NaF/kg/día, por lo que las estimaciones para niños van de entre 3-6 mg/kg y para adultos de entre 16 a 64 mg/kg (1).

### 1.1.1.2 Fluorosis en México

México con su gran diversidad geológica, junto con su ambiente tectónico activo, predisponen a la contaminación de las aguas subterráneas con elementos tóxicos, por lo que la explotación de los mantos acuíferos naturales enriquecidos con dichos elementos aumentan la vulnerabilidad de la población que las consume (5).

Los estados con las concentraciones arriba del límite máximo permisible de entre 0.7-2 mg/L de fluoruro, emitido por la norma oficial mexicana, PROY NOM-250-SSA1-2014, agua para uso y consumo humano (6) y de 1.5 mg/L emitido por la NOM-201-SSA1-2015 productos y servicios (7), son Guanajuato con 6.5 mg/L (5,8), San Luis Potosí con 4.3 mg/L (5,8), Durango y Coahuila con concentraciones que fluctúan entre 0.5 y 3.7 mg/L (9), Chihuahua con 11.8 mg/L (10) e Hidalgo con 3.2 mg/L (11).

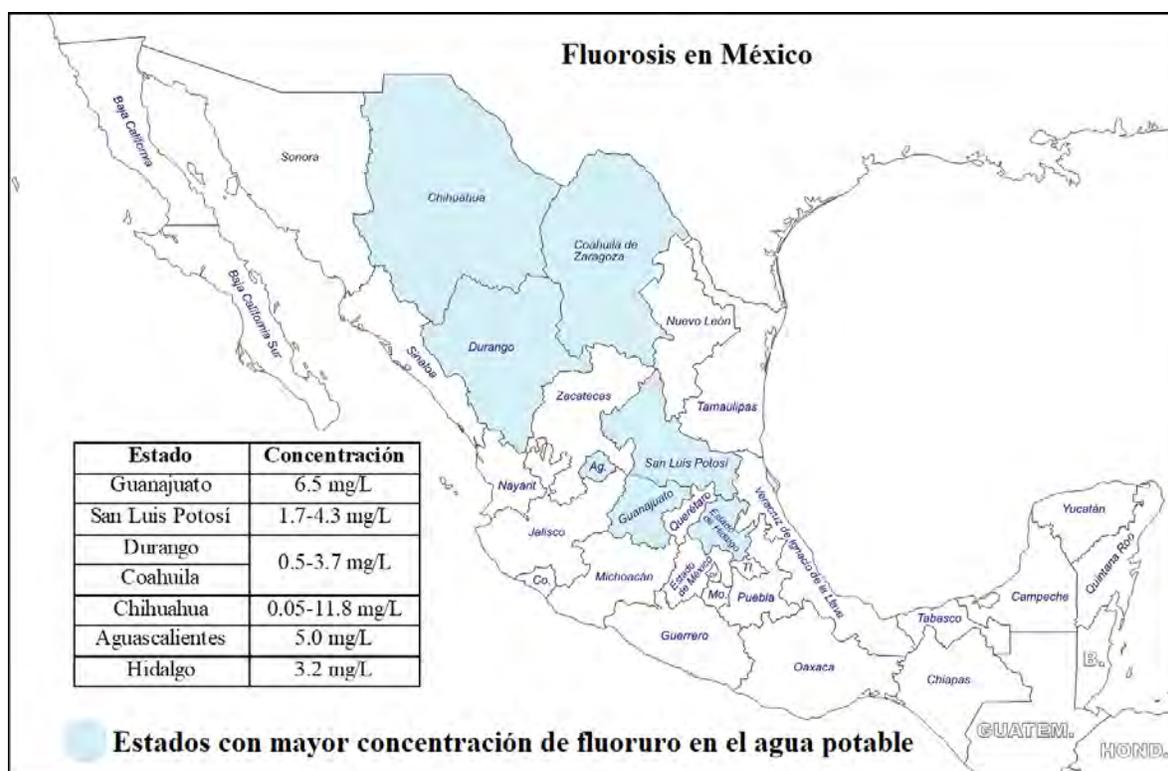


Figura 1. Estados con elevadas concentraciones de NaF en el agua potable (5,8,9,12).

Específicamente en Hidalgo, en un estudio ambiental realizado por Cabrera y cols. en 2003, la concentración máxima reportada de flúor en el agua potable fue de 3.2 mg/L; siendo

los municipios de Tepeji del Río, Tizayuca, Tepeapulco y por último Pachuca de Soto los que obtuvieron los niveles más elevados de contaminación por fluoruro (11).

#### **1.1.1.2.1 Signos de intoxicación por consumo de fluoruro**

La intoxicación aguda por consumo excesivo de fluoruro, incluye manifestaciones clínicas como, vómito, dolor abdominal, diarrea, debilidad hipersalivación, inquietud, rigidez corporal, convulsiones e insuficiencia respiratoria y cardíaca. Por otra parte, la intoxicación crónica se denomina fluorosis, en donde los tejidos calcificados actúan como un pozo natural para el fluoruro y, por lo tanto, se desarrollan lesiones características en los dientes, en forma de manchas opacas blanquecinas distribuidas irregularmente sobre la superficie de los dientes, o manchas de color marrón, acompañadas de anomalías del esmalte en forma de estrías transversales de color blanco o marrón; y en los huesos, caracterizada por una hipermineralización de los huesos, formación de exóstosis y calcificación de ligamentos (13).

#### **1.1.1.3 Toxicocinética del fluoruro**

##### **1.1.1.3.1 Absorción**

La principal ruta de absorción del fluoruro es por el tracto gastrointestinal siendo en un 20-25% en estómago y 75-80% en intestino delgado (14), aunque también puede ingresar al organismo a través de los pulmones y por la piel. El fluoruro presente en el agua se absorbe en mayor proporción que el de los alimentos, siendo de manera rápida por difusión simple, a través de las paredes del tracto intestinal; sin embargo, puede reducirse ligeramente por la presencia de otros elementos en la dieta, como el calcio, magnesio o el aluminio (15,16).

El tiempo medio de absorción es de 30 minutos, de modo que la concentración máxima en el plasma generalmente se produce en el curso de la primera hora (3,16).

##### **1.1.1.3.2 Distribución**

Este proceso se realiza vía torrente sanguíneo hacia corazón, riñones e hígado (15,16), dado su alta afinidad por los tejidos calcificados se va a almacenar principalmente en huesos, dientes y tejidos blandos (16,17); en niños se almacena aproximadamente del 80-90% y en adultos el 60% (1).

### **1.1.1.3.3 Biotransformación**

El fluoruro inorgánico toma dos formas primarias en los fluidos corporales, ion fluoruro y HF, las cuales se incorporan fácilmente en los tejidos calcificados, en sustitución de los hidroxilos en los cristales de hidroxiapatita, tanto en la capa superficial del hueso (un proceso a corto plazo), como en las zonas sometidas a la remodelación ósea (un proceso a largo plazo) (4,16).

### **1.1.1.3.4 Excreción**

La excreción de fluoruro, se realiza por cuatro vías principales, orina (50% de lo absorbido), heces, y en menor cantidad en saliva y sudor (16,17). El resto se acumula en dientes y huesos (3). A las dos horas de la ingestión, se produce la concentración urinaria más alta, excretándose en su totalidad a las 12 horas (3).

Existen varios factores que influyen en la excreción renal del fluoruro, entre mayor sea la magnitud de la ingesta, el flujo y la edad del sujeto, mayor será la excreción de fluoruro; por otro lado tenemos que el pH de la orina, cuanto más ácido sea, mayor será la retención de fluoruro en el plasma, debido a una mayor reabsorción a nivel tubular renal en forma de HF (3).

### ***1.1.1.4 Toxicodinamia del fluoruro***

#### **1.1.1.4.1 Acción en huesos y dientes**

El fluoruro es absorbido por los dientes y el hueso por un mecanismo similar (18). El hueso juega un papel importante en la regulación de la concentración de fluoruro del fluido extracelular, secuestrando rápidamente entre el 80-90% en niños y el 60% en adultos de la dosis de fluoruro absorbido (1,19).

A pesar de su importancia en la prevención de la caries dental, el contenido de fluoruro de esmalte es inferior a la de otros tejidos mineralizados. En el esmalte, la mayor concentración de fluoruro se produce en la superficie, y disminuye rápidamente al aumentar la profundidad del diente (19).

#### 1.1.1.4.2 Inhibidor enzimático

El fluoruro interactúa con una amplia variedad de procesos celulares; afecta el funcionamiento de muchos caminos enzimáticos que son importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular (20).

El efecto tóxico del fluoruro, se asocia principalmente con la inhibición de enzimas esenciales implicadas en diversas rutas metabólicas en el organismo, ésta puede ser causada por la unión de dichos iones o en su forma protonada (HF) a los grupos funcionales de residuos de aminoácidos que rodean el centro activo de la enzima, formando enlaces de hidrógeno adicionales con una mayor resistencia, o también por la unión directa de los iones de fluoruro a los dominios con carga positiva lejos del centro activo que conduce a cambios conformacionales significativos en la proteína, como es el caso de las enzimas de la glucólisis por ejemplo la hexoquinasa, enolasa y piruvato quinasa (las cuales requieren de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  para total actividad), así como del ciclo de Krebs, como la aconitasa, isocitrato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa, también se ha observado la inhibición en enzimas implicadas en la glucogenólisis como la fosfoglucomutasa y la glucosa-6-fosfatasa que son sensibles a la inhibición por NaF. Otras enzimas que también se inhiben son las  $Na^+ / K^+ -ATPasas$ , que lleva a la depleción de ATP, el fluoruro interfiere con la producción de energía celular inhibiendo enzimas de la cadena de transporte de electrones por efecto del peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) alterando el potencial de la membrana celular, por lo tanto se disminuye la producción de ATP (20). Además, el fluoruro induce un aumento en la liberación de citocromo c (cyt C) de la mitocondria al citosol. La exposición causa una disminución de la producción de ATP y, por lo tanto, un aumento de los niveles celulares de ADP, AMP y GDP y fosfato inorgánico (Pi). Sin embargo, la fuerte inhibición a largo plazo de cyt C es tóxica para las células que no pueden activar la producción de ATP glucolítico lo suficiente como para suministrar energía a las reacciones esenciales que requieren ATP. La inhibición persistente da como resultado la inducción endógena y la activación del óxido nítrico (NO), el cual inhibe la respiración mitocondrial al disminuir la afinidad aparente de cyt C por el oxígeno (21). Por otra parte se ha reportado que el fluoruro inhibe la secreción y/o síntesis de proteínas y que influye en distintas vías de señalización implicadas en la

proliferación y apoptosis, incluida la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), p53, proteína-1 activadora (AP-1) y las vías del factor nuclear kappa B (NF-B)(22–24).

#### **1.1.1.4.3 Efecto pro-oxidante del fluoruro**

Diversos estudios han reportado que la fluorosis aumenta la generación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) al inhibir los cofactores de SOD (25,26), además, aumenta la generación de NO (27–29) y puede reaccionar con superóxido para formar  $ONOO^-$ , y con tioles y centros metálicos en proteínas para formar aductos de nitrosilo. También se ha demostrado interferencia con la formación de enlaces disulfuro y tiene como consecuencia la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico rugoso, que causa estrés del mismo, esto hace que la célula active mecanismos de autoprotección, llamados respuesta de desplegamiento proteico (RDP), mediada por 3 proteínas Ire1, Atf6 y PERK, el cual es capaz de aliviar el estrés del RE y mantener su función, por otro lado, si el estrés del RE es prolongado o severo iniciará la muerte celular apoptótica a través de varias cascadas de señalización (30), y la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (21). Se sabe que la producción excesiva de ERO conduce a la oxidación de macromoléculas, lo que resulta en un ataque de radicales libres de fosfolípidos de membrana con daño resultante de la membrana por inducción de peroxidación lipídica, despolarización de la membrana mitocondrial y apoptosis (21).

### **1.1.2 Obesidad**

#### ***1.1.2.1 Definición***

La obesidad (OB) se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (31), está acompañada de alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo de desarrollar comorbilidades tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, así como algunas neoplasias en mama, endometrio, colon y próstata, entre otras (32).

#### ***1.1.2.2 Etiología***

La mayoría de los casos con OB son de origen multifactorial. Se reconocen factores genéticos, metabólicos, endocrinológicos y ambientales, aunque la principal causa es la

obesidad exógena o por sobrealimentación. Otros factores que influyen son los trastornos psicológicos, provocados por la globalización, la presión social y comercial y el sedentarismo (33).

### ***1.1.2.3 Clasificación***

Existen diferentes clasificaciones de la OB, una de ellas es desde el punto de vista etiológico como exógena, primaria o simple, cuando dichos aspectos representan un desequilibrio entre la ingestión de alimentos y el gasto energético, o también endógena, secundaria o sindrómica, cuando se deriva como consecuencia de determinadas enfermedades que provocan un aumento de la grasa corporal, aunque ésta sólo represente menos del 2% de los casos de OB (33,34) .

Por otro lado con base a la NOM-008-SSA3-2010, para el manejo integral del sobrepeso y la obesidad, la OB es clasificada de acuerdo al índice de masa corporal (IMC) en OB grado I (30-34.9 kg/m<sup>2</sup>), OB grado II (35-39.9 kg/m<sup>2</sup>) y OB III o mórbida ( $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) (32).

### ***1.1.2.4 Diagnóstico***

#### **1.1.2.4.1 Indicadores antropométricos**

##### **1.1.2.4.1.1 Índice de masa corporal**

El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la OB en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m<sup>2</sup>) (31).

##### **1.1.2.4.1.2 Indicadores de distribución de grasa**

Se utilizan diversos perímetros para determinar la distribución de grasa corporal, como los de cintura, cadera y muslo. Concretamente, la relación de los perímetros de cintura y cadera es de una gran utilidad como herramienta diagnóstica del tipo de distribución de grasa, para valorar la cantidad de grasa intraabdominal, que se relaciona con la hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperlipidemia e hipertensión (35).

Otra forma de determinar la distribución de grasa corporal es la medición de pliegues cutáneos en diferentes partes del organismo, específicamente del bíceps, tríceps, escápula y abdomen. Lo anterior con la finalidad de valorar la grasa subcutánea que representa aproximadamente el 50% de la grasa corporal total (36).

#### 1.1.2.4.2 Indicadores bioquímicos

Los indicadores bioquímicos, permiten detectar deficiencias o excesos de ciertos nutrimentos, así como alteraciones, estos incluyen pruebas físicas, bioquímicas, moleculares, microscópicas y de laboratorio que complementan la información obtenida con los demás indicadores y proporcionan información objetiva y cuantitativa del estado de nutrición. Las muestras para realizar las pruebas pueden obtenerse de tejidos, células, fluidos y desechos corporales (37).

#### 1.1.2.5 Perfil lipídico

La medición de lípidos en sangre, proporciona información acerca de la salud cardiovascular (37). Es conocido que la obesidad produce alteraciones del perfil lipídico, relacionado con enfermedades cardiovasculares y dislipidemias (38), que son las alteraciones de las concentraciones normales de los lípidos en la sangre (39).

##### 1.1.2.5.1 Tipos de dislipidemias

La clasificación de las dislipidemias con base a la norma oficial mexicana NOM-037-SSA2-2012, depende de los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos (Tg), HDL y LDL respecto a su concentración en suero, se presenta en la tabla 1:

Tabla 1. Diagnóstico de dislipidemias (39).	
Enfermedad	Diagnóstico
Hipercolesterolemia	<b>CT &gt;200 mg/dL</b>
	Tg < 200 mg/dL
	LDL: $\geq$ 130 mg/dL
Hipertrigliceridemia	CT <200 mg/dL
	<b>Tg &gt;150 mg/dL</b>

	LDL <130 mg/dL.
Dislipidemia mixta:	<b>CT &gt;200 mg/dL</b>
	<b>Tg &gt;150 mg/dL</b>
	<b>LDL ≥130 mg/dL y/o C-no-HDL &gt; 160 mg/dL.</b>

Por otra parte, la Sociedad Canadiense Cardiovascular (SCC), así como al Colegio Americano de Cardiología (CAC) y la Sociedad Europea de Arteriosclerosis (SEA), clasifican las dislipidemias mediante la evaluación de riesgos cardiovasculares en pacientes mayores de 40 años, observando los niveles en ayuno del perfil lipídico en especial de LDL, así como el cálculo de C-no-HDL y la proporción TC/HDL (40).

#### ***1.1.2.6 Efecto pro-oxidante de la obesidad***

El consumo excesivo de energía da como resultado la acumulación de tejido adiposo que estimula estados pro-oxidantes y pro-inflamatorios (41,42). Los altos niveles de glucosa y lípidos circulantes ocasionan un suministro excesivo de sustratos energéticos a las vías metabólicas en las células adiposas y no adiposas, lo que a su vez puede aumentar la producción de ERO (43,44), se ha evidenciado que las ERO están involucradas en el control del peso corporal al ejercer diferentes efectos sobre las neuronas hipotalámicas, que controlan la saciedad y el comportamiento del hambre, por lo que la obesidad puede inducir estrés oxidativo sistémico a través de múltiples mecanismos bioquímicos, como la generación de superóxido a través de las NADPH oxidasas (NOX), la fosforilación oxidativa, la autooxidación de gliceraldehído, la activación de proteína quinasa C (PKC) y las rutas de poliol y hexosamina (45,46). Otros factores que también contribuyen con el estrés oxidativo en la obesidad incluyen la hiperglucemia (47), hiperleptinemia (48), los niveles elevados de lípidos en los tejidos (49), la deficiencia de vitaminas y minerales (50,51), la disfunción tisular (46), la baja defensa antioxidante (52), la inflamación crónica (53) y la generación de ERO postprandial (54) alteración de la función mitocondrial (55), y el tipo de dieta (56), se ha visto que el consumo de una dieta alta en grasas e hidratos de carbono puede alterar el metabolismo del oxígeno (54).

El estrés oxidativo inducido por la obesidad causa el desarrollo de diversas enfermedades, que incluyen resistencia a la insulina y diabetes, complicaciones cardiovasculares, trastornos del sueño, asma, problemas oncológicos, infertilidad, problemas reumatológicos e insuficiencia hepática (57,58).

#### ***1.1.2.7 Indicadores de obesidad y dislipidemias en ratas***

Debido a la gran similitud y homología entre el genoma de roedores y humanos, los modelos animales son una herramienta fundamental para el estudio de condiciones patológicas que afectan a los humanos (59).

Para la evaluación de la OB en ratas, uno de los métodos más empleados es el índice de adiposidad, que se origina de la suma de la disección de la grasa retroperitoneal, epididimal y visceral multiplicado por 100 y dividido entre el peso corporal (60,61). Lo anterior está directamente relacionado con la eficiencia alimentaria definida como la habilidad de convertir las calorías consumidas en peso corporal y que se obtiene de la media del peso corporal ganado (g) entre el consumo total de calorías (62).

Dado que para la inducción de obesidad es necesario el aumento del porcentaje de grasa en la dieta, se realizan pruebas lipídicas de cuantificación del CT, Tg, HDL y LDL, con la finalidad de cuantificar las posibles comorbilidades de la OB, específicamente las dislipidemias (62).

#### ***1.1.2.8 La obesidad y dislipidemias en México***

En México, la OB es considerada como un problema de salud pública, debido a su magnitud y trascendencia (31); estudios recientes demuestran que la incidencia y prevalencia de la OB en el año 2016 ha aumentado de manera progresiva (39), en donde 76.6% de la población la presentan (63).

Las dislipidemias causan más de 4 millones de muertes prematuras por año (64). Los datos de la prevalencia de dislipidemias encontrados en la ENSANUT 2012 muestran una prevalencia general de 49.9% (65).

### **1.1.3 Reproducción masculina**

Desde el punto de vista fisiológico, el sistema genital de los varones sirve para el coito, la reproducción y la producción de hormonas (66).

#### ***1.1.3.1 Anatomía y fisiología testicular***

Los testículos están ubicados en la región lumbar a derecha e izquierda de la columna vertebral (66); producen dos secreciones testosterona (interna) y semen o esperma (externa) (67). Los testículos están en la parte inferior de las bolsas escrotales que les cubren, las cuales sirven para mantener la temperatura testicular adecuada (1 o 2 °C menos a la temperatura corporal) para la formación de espermatozoides (66), y constan de un apéndice llamado epidídimo (67).

El tejido propio del testículo es una pulpa formada por conductos muy finos, llamados túbulos seminíferos, que forman la testosterona, responsable de los caracteres sexuales secundarios. Fuera del testículo se encuentran los conductos, encargados de llevar a los espermatozoides desde los túbulos seminíferos hasta el epidídimo (66), donde los espermatozoides se almacenan y maduran (66).

Durante la eyaculación, se elimina el semen, formado por millones de espermatozoides y por secreciones de los conductos deferentes, las vesículas seminales, la próstata, las glándulas bulbouretrales e innumerables glándulas secretoras de mucus, que se encuentran a lo largo de la uretra (66).

#### ***1.1.3.2 Espermatogénesis y espermiogénesis***

La espermatogénesis, es el proceso por el cual los espermatogonios dan origen a los espermatozoides, comprende una serie de fenómenos singulares, comienza desde antes de la pubertad bajo la influencia de concentraciones elevadas de gonadotropinas hipofisarias, y está dividida en tres fases (espermatogónica, espermatocítica y de espermátide). Al final de la espermatogénesis las espermátides sufren su maduración final y se liberan en la luz del túbulo

seminífero desde las células sustentaculares de Sertoli durante un proceso llamado espermiación (68).

La espermiogénesis, es la serie de cambios que experimentan las espermátides para su transformación en espermatozoides. Estos cambios son, la formación del acrosoma, la condensación del núcleo, la formación del cuello, pieza intermedia y cola, y la eliminación de la mayor parte del citoplasma (69).

### ***1.1.3.3 Fertilización (Capacitación y reacción acrosomal)***

La capacitación espermática, son los cambios fisiológicos que sufre un espermatozoide para adquirir la capacidad de fecundar un óvulo, cuando se encuentra atravesando el moco cervical (70).

En dicho proceso, los espermatozoides adquieren la capacidad de: desarrollar una movilidad vigorosa (“hiperactivación”), liberar el contenido del acrosoma por exocitosis (reacción acrosomal) para poder penetrar la zona pelúcida, y finalmente, fusionarse con la membrana citoplásmica del ovocito y fertilizarlo (71).

En la reacción acrosomal, el espermatozoide, que se ha ido capacitando durante su ascenso por la cavidad uterina, encontrará en el tercio externo de la trompa de Falopio al ovocito. Cuando la cabeza del espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida del ovocito, libera acrosina (enzima), que la hidroliza y perfora. Esto, unido al movimiento que genera la cola espermática, impulsará al espermatozoide al espacio perivitilino del ovocito (72).

## **1.2 Antecedentes del problema**

### **1.2.1 Estrés oxidativo y exposición a fluoruro**

El NaF en concentraciones por arriba de 1.5 mg/L, es perjudicial para huesos y dientes, y también para los tejidos blandos (73). En estudios previos se ha reportado que el consumo de NaF en modelos animales, en tratamientos agudos de 14 días con una concentración de 150, 300 y 600 mg/L aumenta la presión arterial, acompañado de un aumento de los biomarcadores de estrés oxidativo como MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y PCO, NO y NOX, así como de los

marcadores genéticos de inflamación, así como también una disminución de la actividad de GST (74,75).

Por otra parte se ha evidenciado que en estudios subcrónicos en concentraciones de NaF que van de 25-150 mg/L, ha generado neuroinflamación en el sistema nervioso central (76,77), hígado (78–81), riñón (79,80,82) y corazón (80). Por otra parte también se ha evidenciado que la exposición a NaF con 20 mg/Kg de peso en ratas, tiene como consecuencia alteraciones tiroideas, del neurodesarrollo y antioxidantes (83), observando un aumento de peroxidación lipídica, oxidación proteica y NO, y disminución de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GSH, y GR. Además se vio disminución de tioles proteicos, del estado antioxidante, ácido úrico, zinc y cobre (29,73,76,78–84).

#### ***1.2.1.1 Estrés oxidativo y exposición a fluoruro a nivel reproductivo***

El NaF genera daño oxidativo a nivel reproductivo en testículo o en el espermatozoide, ya sea en la membrana espermática, causando defectos en la estructura y en la función de espermatozoide (flagelo, acrosoma o la mitocondria), o alterando el DNA espermático (85,86). Se ha reportado en diferentes estudios en ratas, la presencia de estrés oxidativo en el testículo con la administración subcrónica de NaF en concentraciones de 15-100 mg/L, observándose una disminución en la actividad de GSH, SOD, CAT, GPx, GST, GR, G6PD y peroxidasas, así como, aumento en los marcadores de estrés oxidativo (TBARS, LOOH, PC y CD), y de los niveles de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y MDA (84,87–90).

Otras investigaciones en ratas expuestas a NaF (25 mg/kg), durante 56 días, reportaron presencia de daños a nivel espermático, en donde los niveles de ERO y MDA se encontraban elevados, también observaron disminución de la capacidad total antioxidante, junto con los niveles de CAT y peroxidasa (25,91–94).

#### **1.2.2 Efectos reproductivos asociados a la exposición de fluoruro**

La exposición crónica a NaF afecta negativamente la función reproductiva masculina, presentándose alteraciones a nivel hormonal (disminución de los niveles testosterona, FSH y LH), en concentraciones desde 2 hasta a 150 mg/L. Afectando la estructura testicular y la

espermatogénesis, en donde, existe pérdida de células germinales, ausencia de alargamiento de espermátides, disminución de espermatoцитos y atrofia de túbulos seminíferos (84,87,88,91,95–100).

#### **1.2.2.1 Calidad espermática**

El NaF, causa una amplia variedad de defectos estructurales y funcionales; estudios recientes con exposición *in vivo* en ratas, en concentraciones de 10-150 mg/L, durante un periodo entre 2 y 11 meses, observaron disminución de la motilidad, conteo y porcentaje de supervivencia de espermatozoides; y aumento de anomalías espermáticas (25,84,91,95–99,101–109).

#### **1.2.2.2 Daño al DNA**

Recientemente, se ha estudiado en modelos animales, el efecto del NaF (30, 70, 150 mg/L) en la integridad del núcleo espermático, observando que el DNA es altamente susceptible al ion, con porcentajes elevados de desnaturalización (104). También se ha estudiado la fragmentación del DNA en el tejido testicular, observando crecimiento de espermatogonias y espermatoцитos, junto con ocasionales espermátides redondas, mostrando características morfológicas de apoptosis, que incluye, la condensación y marginación de la cromatina nuclear, así como hinchazón de mitocondrias con degeneración o pérdida de crestas (100).

#### **1.2.2.3 Fertilidad**

La exposición subcrónica con NaF durante un ciclo de espermatogénesis en ratones ( $50 \pm 2$ ), repercute en la capacidad de los espermatozoides de fertilización, disminuyendo la hiperactivación espermática, y como consecuencia la capacitación y la reacción acrosomal, ocasionando baja habilidad para fertilizar los óvulos (25,96,102). Estudios *in vivo*, con exposiciones durante 49 días y concentraciones de 150mg/L, obtuvieron una disminución en el número de hembras embarazadas después de haber sido apareadas con machos expuestos, así como un menor número de fetos viables (92).

### **1.2.3 Estrés oxidativo y obesidad**

La OB deteriora la calidad de vida a causa de sus complicaciones asociadas, como diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, asma, trastornos del sueño, disfunción hepática, disfunción renal e infertilidad. Recientes investigaciones sugieren que el estrés oxidativo es el factor crítico que relaciona la OB con sus complicaciones asociadas (41,58).

Se ha reportado, que la obesidad inducida por dietas altas en grasa (45-60% kcal de grasa), durante periodos prolongados, en modelos animales, están acompañadas por un aumento de estrés oxidativo en el tejido hepático, cardíaco y renal, causando una reducción en las actividades de CAT, GPx, SOD y en los niveles de GSH, aumentando los niveles de MDA y PCO (41,54,110,111).

#### ***1.2.3.1 A nivel reproductivo***

El estrés oxidativo testicular, es una característica común en la fertilidad masculina, jugando un rol significativo; estudios en ratas con dietas inductoras de OB, con aumento del 45% de calorías totales de grasa, durante un plazo de entre 8 y 19 semanas, aumentan los niveles de peroxidación lipídica, inhibe la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx, esto conlleva disminución en la espermatogénesis, daño al DNA y a la calidad espermática (112–119).

### **1.2.4 Efectos reproductivos asociados a la obesidad y a las dislipidemias**

El consumo excesivo de grasas por más de 10 semanas en ratas, aumenta los niveles en sangre de estradiol y disminuye los niveles de testosterona, LH y FSH; también se observó desorganización y atrofia del epitelio seminífero, las células espermáticas estaban dispersas y laxas, y hubo adhesión entre las células de Sertoli, todas estas características de anormalidades en la espermatogénesis (113,114,120–125).

#### ***1.2.4.1 Calidad espermática***

La OB tiene un efecto negativo en la reproducción, ya que reduce la calidad espermática, especialmente, alterando la estructura física y molecular de las células

germinales en los testículos y espermatozoides maduros (126). En estudios realizados por 11 y 18 semanas con dietas modificadas con mayor contenido lipídico, se obtuvo como resultado disminución en los parámetros de calidad espermática: motilidad, concentración, progresividad o viabilidad (parámetro indicador del potencial de fertilización) y aumento de las malformaciones morfológicas (113,114,116,117,119,120,122–125,127–130).

#### ***1.2.4.2 Daño al DNA espermático***

Se ha investigado efecto de la OB inducida por dietas hiperlipídicas (33% de grasa), por 20 semanas en modelos animales, con la integridad del núcleo espermático, observando fragmentación del DNA (núcleos con halos muy pequeño o sin halos) (114,119,122,128,131).

### 1.3 Planteamiento del problema

Actualmente se reconoce a la fluorosis como un problema de salud a nivel nacional e internacional. En nuestro país, los estados que presentan concentraciones altas de NaF en el agua potable son Guanajuato, San Luis Potosí, Durango, Coahuila e Hidalgo, siendo el límite máximo permisible entre 0.7-2 mg/L (6,7), afectando a la población que la consume principalmente en los dientes y huesos, deteriorando el esmalte, afectando la hipermineralización de huesos y la calcificación de los ligamentos (13). Además, la fluorosis afecta órganos como el cerebro (77), corazón, hígado, riñón (80) y testículos causando daños estructurales, así como en los espermatozoides disminuyendo su calidad y función (84,94,105,106). También se ha visto que la exposición crónica a NaF produce estrés y daño oxidativo, aumentando la peroxidación lipídica y disminuyendo la actividad antioxidante (25,90,105) causando disminución de la fertilidad.

Por otra parte, la OB, causada por la sobrealimentación y los malos hábitos como el sedentarismo, en México, se presenta en el 76.6% en la población general, según las cifras obtenidas de la ENSANUT 2016 (63), relacionándose con un gran número de enfermedades como la diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares, síndrome metabólico, cáncer, asma, disfunción renal y hepática e infertilidad (32). A nivel reproductivo, se asocia con la generación de estrés y daño oxidativo (41), disminuyendo los niveles de hormonas como la testosterona, FSH y LH, así como, aumentando los lípidos circundantes ocasionando afecciones en la espermatogénesis, la calidad y la integridad del ADN espermático, generando la disminución de la capacidad de fertilización (116,130).

La infertilidad, en los últimos años, ha representado un motivo de consternación para la población, debido al aumento de parejas que no pueden lograr un embarazo después de un año de mantener relaciones sexuales sin utilizar algún método anticonceptivo, esto a causa de diversos factores asociados; en México, afecta al 20 % de la población adulta, de las cuales se dice que el 20% de las parejas que la presentan no se ha podido identificar la razón, el 40% se da en las mujeres y el otro 40% en los hombres (132), siendo las principales causas la obstrucción de conductos, alteraciones en a nivel testicular, desequilibrio hormonal, tabaquismo, obesidad, exposición ambiental o edad avanzada (133).

## 2 JUSTIFICACIÓN

En México se estima que 1.5 millones de parejas presentan un problema de infertilidad, de los cuales, el 40% se presenta en los hombres; esto derivado de diversos factores causantes, como la edad, la obesidad, la exposición a contaminantes, los defectos congénitos, la exposición a altas temperaturas por tiempo prolongado, el consumo compulsivo de alcohol, el tabaquismo, el consumo de algunos medicamentos o los defectos en los órganos y procesos reproductivos.

Múltiples estudios han reportado que el NaF es uno de los contaminantes ambientales ampliamente distribuido en la naturaleza, cuya exposición crónica representa un problema de salud en varias regiones de México ocasionando una alta prevalencia de fluorosis superando el límite máximo permisible emitido por la PROY NOM-250-SSA1-2014, agua para uso y consumo humano. Asimismo, se ha observado que la exposición de NaF genera daño oxidativo en varios órganos incluyendo el sistema reproductor masculino afectando la calidad de los espermatozoides, desde su membrana espermática hasta el material genético ocasionando su fragmentación, y por tanto su capacidad de fertilización.

Por otro lado, la OB siendo un factor determinante en la aparición de infertilidad en varones, se estima está presente en 4 de cada 10 personas en nuestro país, ocasionando alteraciones metabólicas en órganos blandos incluyendo a los testículos. Numerosos estudios han demostrado que el consumo elevado de calorías en la dieta, en especial de grasas, aumenta las probabilidades de desarrollar problemas a nivel reproductivo, ocasionando una disminución de la concentración de hormonas y generando estrés y daño oxidativo en el sistema reproductor masculino, ocasionando alteraciones en la espermatogénesis, induciendo con esto infertilidad.

En consecuencia a lo mencionado anteriormente, es conveniente llevar a cabo estudios en donde se exponga subcrónicamente al NaF en condiciones de obesidad con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre el daño a nivel reproductivo que ocasionan; debido a que hay una gran cantidad de población expuesta a ambas condiciones sin haber sido estudiadas en conjunto para este fin.

### **3 HIPÓTESIS**

La co-exposición crónica de NaF con una DHL, tendrán un efecto sinérgico negativo en la calidad espermática, la integridad de membrana espermática, el estrés y daño oxidativo en los espermatozoides de ratas Wistar.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Evaluar el efecto de la DHL sobre la toxicidad reproductiva inducida por la exposición subcrónica a NaF en ratas Wistar macho.

#### **4.2 Específicos**

1. Evaluar la obesidad ocasionada por una DHL durante 90 días, evaluando el índice de adiposidad, la eficiencia alimentaria y el perfil lipídico en ratas Wistar macho.
2. Estimar el nivel de exposición con NaF a través de su concentración en orina mediante una técnica potenciométrica en ratas expuestas subcrónicamente a NaF con DHL.
3. Evaluar la calidad de los espermatozoides midiendo la motilidad, viabilidad, y concentración en ratas expuestas subcrónicamente a NaF con DHL.
4. Analizar el efecto de la DHL sobre la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante la prueba de hipo-osmolaridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de ratas expuestas subcrónicamente a NaF.
5. Determinar el estrés oxidativo y daño oxidativo en ratas con DHL expuestas subcrónicamente a NaF, midiendo la actividad enzimática de GPx y las concentraciones de GSH, MDA y carbonilos de proteínas.
6. Analizar el efecto de la DHL y la exposición subcrónica a NaF sobre los cambios histológicos en testículos de ratas Wistar macho.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Tamaño de muestra y muestreo

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar adquiridas en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los animales se mantuvieron en cuartos con una temperatura de 18-23 °C, con una humedad relativa de 40 - 70%, un ciclo de luz oscuridad de 12h, con libre acceso a agua y alimento de acuerdo al Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CIEQUAL). Se formaron 6 grupos de 6 animales en forma aleatoria de la siguiente manera:

#### Grupos Experimentales:

- **Grupo I (Control):** Dieta estándar
- **Grupo II (Dieta hiperlipídica):** Aumento del 50% kcal de grasa
- **Grupo III (Flúor-dosis alta):** 10 mg/Kg de NaF + dieta estándar
- **Grupo IV (Flúor dosis alta + dieta hiperlipídica):** 10 mg/Kg de NaF + dieta hiperlipídica

### 5.2 Inducción de obesidad

Durante el tratamiento, se cuantificó el nivel sérico de colesterol total y triglicéridos extrayendo sangre mediante punción en la vena lateral de la cola de la rata y el nivel de NaF en la orina en los días 0, 30, 45, 60, 75 y 90. Al término del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se evaluó la calidad espermática (conteo, viabilidad y concentración espermática), la integridad de la membrana espermática (prueba Hos-Test). El estrés y daño oxidativo fue evaluada a través de las concentraciones de a) MDA, b) carbonilos de proteínas, c) GSH, d) antioxidantes totales, e) actividad de GPx, y por último se evaluaron los cambios morfológicos de los testículos mediante un análisis histológico.

Los grupos control fueron administrados con una dieta estándar para roedores de laboratorio (LabChows™ 5008, PMI Nutrition Institutional, Brentwood MO) y a los grupos con DHL con una dieta con 50% kcal de grasa y agua *ad libitum* durante todo el tratamiento. Para la preparación de 1 kg de alimento se pesaron 730 g de alimento estándar molidos

previamente, 200 g de manteca de cerdo y 100.9 g de clara de huevo, se mezclaron y se agregaron 300 mL de agua desionizada, posteriormente se horneó a  $180 \pm 5$  °C durante 20 minutos (113,134,135).

El diagnóstico de OB, se basó en el índice de adiposidad (60,61,136,137) y la cuantificación de la tasa de eficiencia alimentaria (61,62).

### 5.3 Perfil lipídico

Se realizó el perfil lipídico en suero sanguíneo de las ratas en los días 0, 30, 45, 60, 75 y 90 de tratamiento.

#### Procedimiento

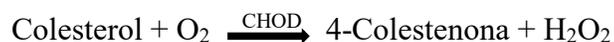
Se obtuvieron 0.5 mL de sangre de las venas laterales de la cola de las ratas, posteriormente se centrifugaron las muestras a 4000 RPM durante 10 minutos, se separó el sobrenadante (suero) y se colocó en tubos eppendorf para su posterior análisis.

#### 5.3.1 Colesterol total

La determinación cuantitativa de colesterol total se realizó utilizando el kit colorimétrico, Sprinreact® 41021

#### Principio del método

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra analizada (138,139).

## Procedimiento

Las muestras analizadas se manejaron bajo las siguientes condiciones:

Tabla 2. Técnica de cuantificación de colesterol total, utilizando el método de Naito (138) con el kit Sprinreact® 41021			
	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
R (µL)	250	250	250
Patrón (µL)	--	2.5	--
Muestra (µL)	--	--	2.5

Por último, se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se leyeron las absorbancias a 505 nm en un espectrofotómetro marca EPOCH™ (BioTeck®. Instruments, Inc., Winooski, VT).

### 5.3.2 Triglicéridos

La determinación cuantitativa de los triglicéridos se realizó con el kit colorimétrico, Sprinreact® 1001311.

#### Principio del método

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:





La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra analizada (140–142).

### Procedimiento

En una microplaca de 96 pozos se colocaron los siguientes volúmenes:

Tabla 3. Técnica de cuantificación de triglicéridos utilizando el método de Buccolo (140) con el kit Sprinreact® 1001311			
	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
RT (μL)	250	250	250
Patrón (μL)	--	2.5	--
Muestra (μL)	--	--	2.5

Mezclar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente leer la absorbancia a 505 nm. El color es estable como mínimo 30 minutos.

## 5.4 Calidad espermática

La calidad espermática es una prueba simple de gran importancia para la evaluación de la infertilidad y para el estudio de patologías causadas por la exposición a productos químicos, factores químicos, medicamentos.

### 5.4.1 Motilidad

#### Principio

La motilidad espermática se describió de acuerdo a los parámetros de la OMS, agrupando a las células en dos grupos: células móviles y células inmóviles (143).

#### Procedimiento

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se disectaron los testículos, epidídimo y los conductos deferentes de donde se extraen los espermatozoides. La muestra

fue colocada en tubos de 1.5 mL con NaCl al 0.9% y se mantuvieron en baño María a una temperatura de 37 °C. Un volumen de 3 µL de muestra se colocó en el portaobjetos y se leyó al microscopio óptico a 10X por duplicado.

#### **5.4.2 Viabilidad**

Nos permite cuantificar el número de espermatozoides vivos, aunque estos no se muevan. El azul tripán es un colorante aniónico del grupo de los colorantes azoicos utilizado para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. De esta manera se cuantifican el número de células con y sin colorante asignando porcentajes de células con y sin daño (143).

#### **Procedimiento**

En tubo de 1.5 mL se colocaron 10 µL de la muestra de espermatozoides y 10 µL de colorante azul de tripano, se mezclaron suavemente para colocar 15 µL de la muestra en portaobjetos. Se leyeron al microscopio óptico a 40 X, a 100 células por duplicado.

#### **5.4.3 Concentración espermática**

Es un parámetro que se relaciona directamente con el índice de fertilización y consiste en determinar en número de espermatozoides por unidad de volumen. Este aspecto, además puede funcionar como indicativo de la capacidad que los testículos poseen para producir espermatozoides (143).

#### **Procedimiento**

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron: 500 µL de solución tritón 0.1% y 25 µL de la muestra de espermatozoides. Se homogeneizo gentilmente y se colocaron 8 µL de la muestra en la Cámara de Neubauer. La lectura se realizó en “Z”, para después sumar las cantidades de cada cuadrante observado, el total se multiplicó por 105 que es el factor de dilución y este resultado se multiplicó por 10,000 que es el factor de cámara. Cada lectura se observó al microscopio óptico a 40X por duplicado.

## **5.5 HOS-TEST**

La prueba de hinchazón hipo-osmótica o HOS-T, evalúa la integridad de membrana de los espermatozoides mediante la determinación de su capacidad para mantener el equilibrio entre la célula y su entorno. El influjo de fluido debido a la tensión hipo-osmótica ocasiona que la cola de los espermatozoides se enrolle y se hinche. El porcentaje de espermatozoides hinchados, mide la cantidad de espermatozoides que tienen una membrana plasmática funcional (144). Combinado con una tinción por azul de tripano, HOS-T permite evaluar el estado de la membrana de los espermatozoides en la cola. Por tanto, se identificarán dos tipos de espermatozoides (145).

### **Procedimiento**

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 300  $\mu$ L de solución hipo-osmótica (se pesaron 0.735 g de citrato de sodio y 1.35 g de fructuosa para preparar 100 mL) y 30  $\mu$ L de la muestra de espermatozoides. La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora y se agregó a la mezcla 25  $\mu$ L de buffer de formaldehído al 10% y 24 horas después, se realizó la lectura al microscopio a 40X. En portaobjetos se colocaron 10  $\mu$ L de la mezcla y 5  $\mu$ L de colorante azul de tripano, la lectura se realizó a 100 células por duplicado.

## **5.6 Estrés oxidativo**

El desbalance en la producción de ERO y la defensa antioxidante provoca el estrés oxidativo, ocasionando una gran variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, que si se mantiene por un largo periodo de tiempo genera deterioro e inclusive la muerte celular. Es por esto que se ha implementado la evaluación del daño oxidativo a través de la medición de diferentes productos terminales de la acción oxidante de proteínas, lípidos y ADN, como lo es la acumulación de grupos carbonilos y de malondialdehído, así como la medición de la concentración de antioxidantes y la actividad antioxidante total (146).

## Procedimiento:

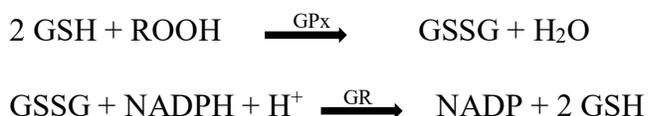
Los testículos fueron pesados y colocados en tubos Falcon de 50 mL, se agregó PBS 1X en la siguiente proporción 1.5 g de peso – 2.25 mL; se homogenizo y se mantuvieron en hielo para su evaluación.

### 5.6.1 Glutación peroxidasa

La actividad de GPx se realizó por el kit enzimático RANSEL (RS 505) Randox®.

#### Principio del método

Éste método se basa en la técnica reportada por Paglia y Valentine (147). La Glutación Peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación de Glutación (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El Glutación oxidado (GSSG) en presencia de Glutación reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP<sup>+</sup>. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm.



## Procedimiento

Fue requerida una muestra recién extraída de espermatozoides  $10 \times 10^6$ . Se centrifugó la muestra inicial a 5000 RPM durante 10 minutos, fueron tomados 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, y se agregó una solución tritón 0.1% y PBS 1X en concentración (1:1), se incubo durante una hora y posteriormente se centrifugó a 5000 RPM a 4 °C durante 10 minutos, las muestras fueron colocadas en la microplaca de la siguiente manera:

Tabla 4. Técnica para cuantificar la actividad de GPx espermático de acuerdo al método de Paglia y Valentine (147).	
Reactivos	Muestra (volumen)
Reactivo 1. Glutación 4 mM, Glutación reductasa $\geq 0.5$ U/L, NADPH 0.34 mM y buffer fosfato 0.05 M pH:7.2 EDTA 4.3 mM	125 $\mu\text{L}$
Reactivo 2. Hidroperóxido de Cumeno 0.18 mM	5 $\mu\text{L}$
Muestra	2.5 $\mu\text{L}$

Por último, la absorbancia fue registrada a 340 nm por triplicado.

### 5.6.2 Glutati3n reducido

La determinaci3n de la concentraci3n de GSH se realiz3 por el m3todo publicado por Beutler y cols. (1963), en resumen el m3todo consiste en la formaci3n del 2-nitro-5-tiobenzoato cuando el compuesto DTNB, es agregado y reacciona con los grupos sulfihidrilos presentes en el GSH, formando un compuesto de color amarillo (148).

#### Procedimiento

El ensayo fue realizado seg3n las siguientes consideraciones:

Tabla 5. T3cnica para determinaci3n de la concentraci3n de GSH testicular utilizando el m3todo de Beutler (148).	
Reactivos o soluciones	Muestra (volumen)
Muestra (homegeinizado de test3culo)	250 $\mu$ L
875 $\mu$ L EDTA (0.015 M) + 125 $\mu$ L TCA (50% w/v)	1000 $\mu$ L
Tris 0.4 M	500 $\mu$ L
DTNB 0.63 M	12.5 $\mu$ L
Se evalu3 la absorbancia a 420 nm.	

### 5.6.3 Actividad antioxidante total

Los m3todos de determinaci3n de la actividad antioxidante total se basan en comprobar como un agente oxidante induce da3o oxidativo a un sustrato oxidable, da3o que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, aunque tambi3n se pueden basar en la cuantificaci3n de los productos formados de la acci3n antioxidante. Tal es el caso del 2,2-difenil-1 – picrilidrazilo (DPPH $\cdot$ ), utilizado como un oxidante iniciador y el 3cido 2,2'-azino-bis- 3-etilbenzotiazolina-6-sulf3nico (ABTS $\cdot^+$ ) utilizado para evaluar los pasos iniciales oxidaci3n en tiempos cortos (149).

#### Procedimiento previo:

Las muestras fueron descongeladas y llevadas al v3rtex durante 5 minutos hasta que la muestra estuviera homog3nea, de la proporci3n anterior de muestra con PBS 1X (1.5 g de peso – 2.25 mL) se tomaron 35  $\mu$ L y agregaron 65  $\mu$ L de PBS, posteriormente fueron

centrifugadas a 10,600 RPM durante 15 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante para la determinación de las siguientes pruebas:

### 5.6.3.1 DPPH'

La actividad antioxidante total se determina por la técnica escrita por Brand-Williams y cols. 1995, brevemente la reacción del DPPH' con un compuesto antioxidante o reductor produce DPPH<sub>2</sub> hidrazina, obteniendo un cambio de color de morado a amarillo (150).

La curva estándar fue preparada de la siguiente manera: se tomaron diferentes alícuotas de Trolox (1.5 mM) y se adicionaron diferentes volúmenes de etanol como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6. Técnica de preparación de curva patrón de DPPH' utilizando Trolox como referencia.			
<b>Tubo</b>	<b>Concentración (µg/µL)</b>	<b>Etanol (µL)</b>	<b>Trolox (µL)</b>
1	0	20	0
2	20	16	4
3	40	12	8
4	60	8	12
5	80	4	16
6	100	0	20

El DPPH' fue preparado pesando 0.788 mg en un tubo de 1.5 mL con aluminio para impedir el contacto con la luz. Fue adicionado 1 mL de metanol y se agitó; el contenido fue colocado en un matraz de 10 mL y se aforo a volumen.

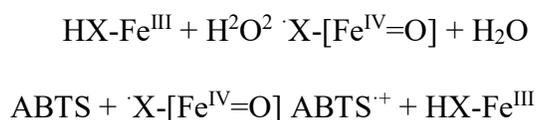
Para preparar los ensayos en la placa de 96 pozos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de solución estándar de Trolox para la curva o 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 90  $\mu\text{l}$  de DPPH $\cdot$ , se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad y se leyó a 515nm.

### 5.6.3.2 ABTS $\cdot^+$

La actividad antioxidante total se determinó por el kit colorimétrico Sigma-Aldrich CS0790

#### Principio del método

El principio del ensayo de antioxidantes es la formación del radical ferrilo de mioglobina desde metmioglobina y peróxido de hidrógeno, que oxida el ABTS $\cdot^+$  (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) para producir un catión radical, ABTS $\cdot^+$ , un cromógeno soluble que es de color verde y se puede determinar espectrofotométricamente a 405 nm:



En esta ecuación, HX-Fe<sup>III</sup> es metmioglobina y X-[Fe<sup>IV</sup>=O] es ferrilo de mioglobina

#### Procedimiento

Preparación de la curva de estándares Trolox de acuerdo con las siguientes consideraciones.

Tabla 7. Preparación de la curva patrón de ABTS $\cdot^+$			
Tubo	Solución de trabajo Trolox 1.5 mM ( $\mu\text{L}$ )	Buffer de Ensayo 1X ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de Trolox (mM)
1	0	500	0
2	5	495	0.015
3	15	485	0.045
4	35	465	0.105

5	70	430	0.21
6	140	360	0.42

Para preparar los ensayos en la placa de 96 pozos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de Trolox para la curva estándar o 10  $\mu\text{L}$  de muestra, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de mioglobina, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de sustrato  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  a cada pozo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de paro de reacción, y por último se leyó la absorbancia de punto final a 405 nm usando un lector de placas.

## 5.7 Daño oxidativo

### 5.7.1 Malondialdehído (MDA)

Ésta técnica es una herramienta conveniente para la detección de subproductos naturales de la peroxidación lipídica como el MDA y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (151).

El MDA en la muestra reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA de sus siglas en inglés) en presencia de calor, para generar un aducto MDA-TBA, el cual, produce un compuesto de coloración roja, que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 532 nm (151).

### Procedimiento

En tubos de 15 mL se colocaron: 100  $\mu\text{L}$  del homogenado y 200  $\mu\text{L}$  de solución TBA (pesar para 10 mL 0.05 g de TBA, 1.6 de TCA y 200  $\mu\text{L}$  de HCl) por duplicado, para el blanco se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. La mezcla fue homogenizada con la ayuda del vórtex y posteriormente se colocó en baño María a 90 °C durante 40 minutos. Una vez concluido el tiempo se colocaron en hielo para detener la reacción y en seguida se centrifugaron a 3000 RPM por 10 minutos. Por último se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de la muestra en la microplaca y se leyeron inmediatamente a 532 nm.

## 5.7.2 Carbonilos

Para la medición de la concentración de proteínas carbonilo se realizó por la técnica descrita por Levine y cols, 1990, el cual se determina mediante la derivación de grupos carbonilo de proteínas con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que conduce a la formación de aductos estables de dinitrofenil hidrazona (DNP) que se puede detectarse espectrofotométricamente a 375 nm proporcional a los carbonilos presentes en el tejido (152).

### **Procedimiento**

En tubos de 1.5 mL se colocaron: 100  $\mu$ L de homogenado y 20  $\mu$ L de solución de sulfato de estreptomicina (10% w/v) por duplicado, se centrifugo la mezcla a 4000 rpm durante 5 minutos, posteriormente el sobrenadante se dividió en partes iguales y se colocaron 28  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA 20%) para precipitar la proteína, las 4 muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue decantado y se adicionaron al sedimento de 2 de las muestras 250  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM en HCl 2 M), y a las otras dos 250  $\mu$ L de ácido clorhídrico (HCl 2 M), se mezclaron en el vórtex durante 1 hr. A continuación, se adicionaron a cada muestra 250  $\mu$ L de TCA al 20% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 6000 RPM durante 15 minutos y posteriormente se lavaron los precipitados 3 veces con una mezcla (1:1) de acetato de etilo: etanol, para eliminar el exceso de DNPH. El sedimento de proteína final se disolvió en 208  $\mu$ L de clorhidrato de guanidina (6M) y se colocaron en una microplaca 200  $\mu$ L de esta muestra, después se leyeron en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 370 nm.

### **5.7.2.1 Cuantificación de proteína**

Se utilizaron los homogenados de testículo y las muestras espermáticas para la cuantificación de proteína mediante el kit colorimétrico Bio-Rad® 500-0113, con el fin de determinar el estrés y daño oxidativo por unidad de proteína de tejido y espermático.

## **Principio del método**

El ensayo de proteína DC <sup>TM</sup> (compatible con detergente) es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteína después de la solubilización del detergente. La reacción es similar al ensayo de Lowry (153).

El ensayo se basa en la reacción de la proteína con una solución alcalina de tartrato de cobre y un reactivo de Folin. Hay dos pasos que conducen al desarrollo del color: la reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino, y la posterior reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre. El desarrollo del color se debe principalmente a los aminoácidos: tirosina y triptófano y, en menor medida, cistina, cisteína e histidina. Las proteínas producen una reducción del reactivo de Folin por la pérdida de 1, 2 o 3 átomos de oxígeno, por lo tanto produciendo una o más de varias especies posibles reducidas que tienen un color azul característico con una absorbancia máxima a 750 nm y una absorbancia mínima a 405 nm.

### **Técnica:**

En la microplaca se colocaron directamente: 2.5  $\mu$ L de muestra del homogenado, 2.5  $\mu$ L de agua, 25  $\mu$ L del reactivo A (solución de tartrato alcalino de cobre) y 200  $\mu$ L de reactivo B (reactivo de Folin diluído), se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y después se leyeron a una longitud de onda de 750 nm.

## **5.8 Concentración de fluoruro en orina**

### **Principio del método**

Esta técnica se realiza mediante un electrodo sensible a los iones de fluoruro, el cual cuando está en contacto con una solución que contiene dichos iones, se desarrolla un potencial del electrodo a través del elemento sensible del mismo, que depende del nivel de iones fluoruro libres en la solución, el cual se mide frente a un potencial de referencia constante con un medidor digital de pH/mV. El potencial medido correspondiente al nivel de ión fluoruro en solución se describe mediante la ecuación de Nernst (154,155).

## Procedimiento

El NaF se secó previamente en horno a 110 °C durante 2 horas, a partir del reactivo seco se preparó una solución stock de 1000 ppm de NaF (0.2210 g disueltos en 100 mL de agua desionizada), posteriormente fue realizado un gráfico de calibración, para lo cual se preparó una solución de 50 mg/L (5 mL aforados a 100 mL con agua desionizada), a continuación se elaboró cada punto de la curva de calibración como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 8. Técnica de cuantificación de NaF en orina utilizando el método potenciométrico con electrodo de ion específico (155)			
Concentración NaF (mg/L)	Solución stock de 50 ppm (mL)	Agua desionizada (mL)	Volumen final (mL)
BCO	---	25	25
0.1	0.050	24.95	25
0.3	0.150	24.85	25
1	0.500	24.5	25
3	1.5	23.5	25
10	5	20	25

Se colocaron en una proporción (1:1) 500  $\mu$ L de cada dilución y de TISAB en tubos de 50 mL. A cada muestra se le midió el potencial (mV) con un electrodo selectivo de fluoruro y se graficaron los resultados en función del logaritmo de la concentración de cada solución estándar.

La orina de 24 horas fue colectada mediante el uso de jaulas metabólicas en los días 0, 30, 45, 60, 75 y 90 días de tratamiento. Para la cuantificación urinaria de NaF las muestras fueron descongeladas hasta que estuvieran a temperatura ambiente. Se colocaron en tubos de 50 mL, 500  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de TISAB, posteriormente se midió el potencial (mV) con el electrodo selectivo de NaF durante dos minutos de contacto.

## 5.9 Histología testicular

Por último se evaluaron los cambios morfológicos de los testículos mediante la técnica de histología.

Una vez extraídos los testículos, se fijaron en recipientes herméticos que contienen solución de formol (10%). Los testículos, se procesaron mediante la técnica histológica convencional:

1. Para remover el agua de los tejidos fijados se deshidrataron de la siguiente manera:

Tabla 9. Procedimiento para la fijación del tejido	
Baño	Duración
1. Etanol al 80%	1 hr
2. Etanol al 96%	1 hr
3. Etanol absoluto	1 hr
4. Etanol absoluto	1 hr
5. Etanol absoluto	1 hr

2. Posteriormente se clarificaron con xilol en 3 pasos:

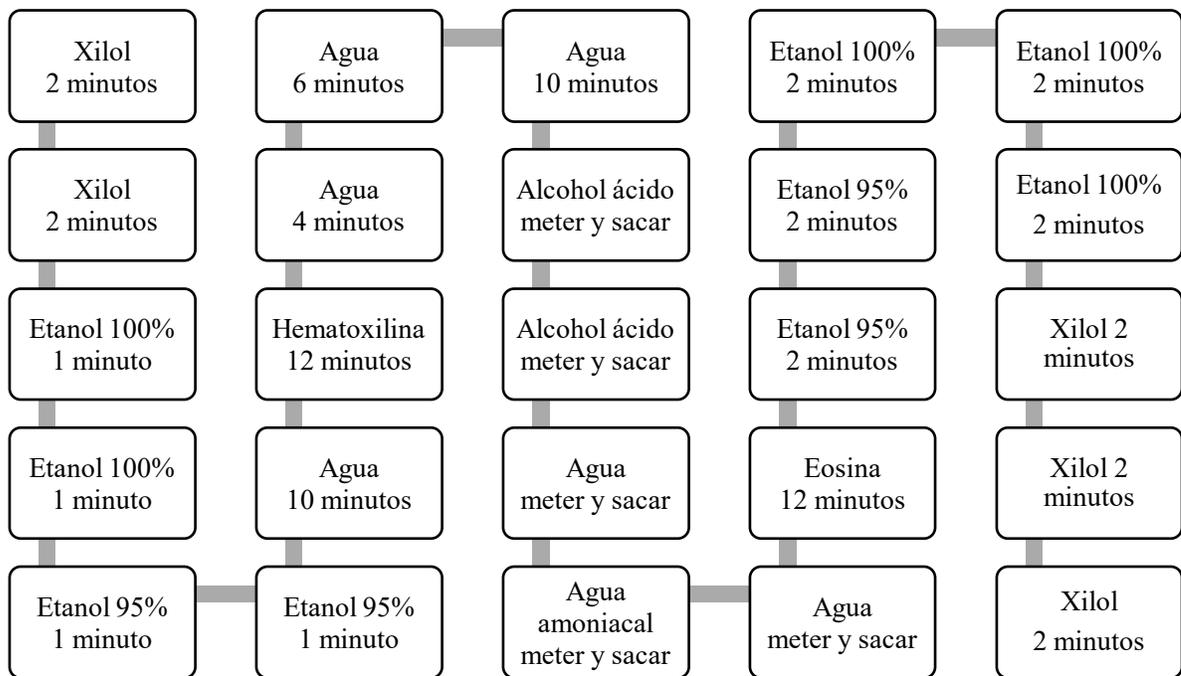
Tabla 10. Procedimiento para la clarificación del tejido	
Diafanización	Duración
1. Etanol en xilol (50%)	1 hr
2. Xilol	1 hr
3. Xilol	1 hr

3. Las muestras se impregnaron en parafina absoluta a 53-56°C:

Tabla 11. Procedimiento de inclusión en parafina de las muestras	
Impregnación	Duración
1. Parafina absoluta (53-56 °C)	1 hr
2. Parafina absoluta	1 hr
3. Parafina absoluta	1 hr

4. Se colocaron en moldes para formar bloques que se llevaron al micrótopo y se dejó secar por 48 horas para que solidificaran por completo.
5. Fueron realizados cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, los cortes se pasaron por baño María a 40°C (al baño María fue agregada grenetina en cantidad suficiente para facilitar la manipulación del corte).
6. Se colocaron en un portaobjetos y se secaron sobre parrilla a 40°C.

La tinción con hematoxilina y eosina se llevó a cabo mediante el tren de tinción sumergiendo los portaobjetos con las muestras como se muestra en la figura 2:



**Figura 2.** Tren de tinción de hematoxilina y eosina

Para el montaje se colocó resina natural y encima un cubreobjetos (cuidando que no queden burbujas de aire) para su preservación y posterior lectura al microscopio óptico. Se realizó un análisis descriptivo que incluyó las estructuras anatómicas del testículo sano y la comparación con los hallazgos en el tejido expuesto. Fue utilizado un microscopio de luz con cámara digital Moticam 1000 (1.3 Mpixel USB 2.0). Para el estudio de los parámetros específicos de la histología testicular se utilizó la escala de Johnsen (156).

Tabla 12. Escala de Johnsen	
Puntaje	Descripción
10	Espermatogénesis completa y túbulos perfectos.
9	Muchos espermatozoides presentes, espermatogénesis desorganizada.
8	Sólo unos pocos de espermatozoides presentes.
7	No hay espermatozoides sino muchas espermátides presentes.
6	Sólo unas pocas espermátides presentes.
5	No hay espermatozoides o espermátides presentes, pero muchos espermatoцитos presentes.
4	Sólo algunos espermatoцитos presentes.
3	Sólo espermatogonias presentes.
2	No hay células germinales presentes.
1	Ni células germinales, ni células de sertoli presentes.

### 5.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados comparando dos muestras, expresándose como las medias  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos individuales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba Tukey y un valor  $p < 0.05$  se consideró como significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism 5.01.

## 6 DIAGRAMA EXPERIMENTAL

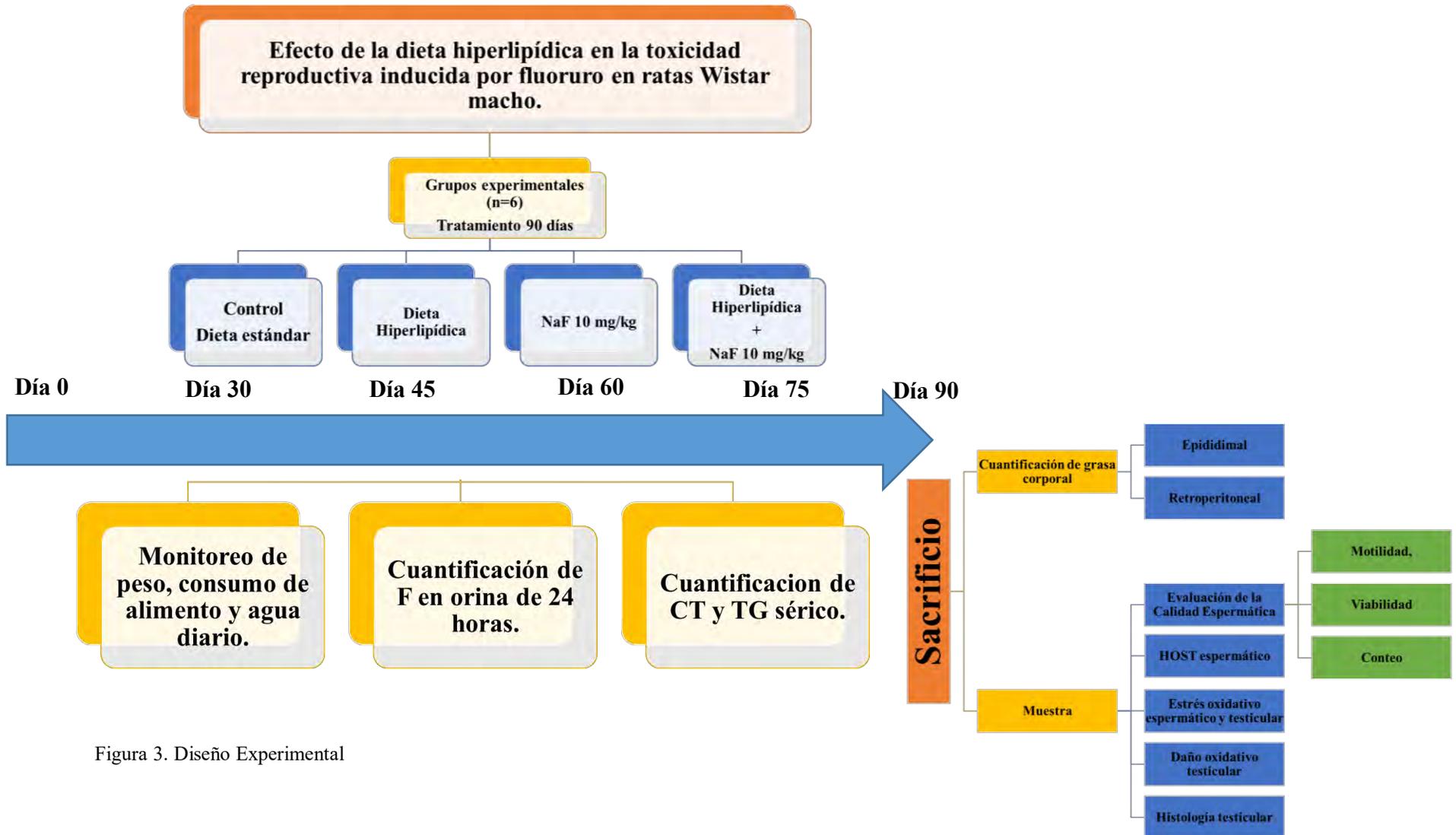


Figura 3. Diseño Experimental

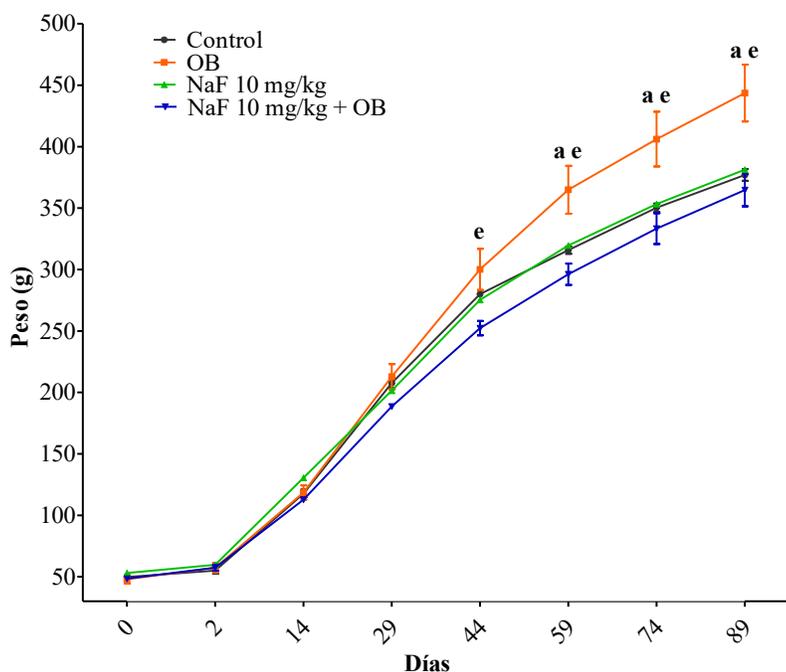
## 7. Resultados

### 7.1 Efecto de la DHL

Después de someter a los animales a una DHL durante 90 días, se determinó la influencia que tuvo ésta sobre los indicadores de obesidad como el peso corporal, la ganancia de peso, el contenido de grasa, el índice de adiposidad, la eficiencia alimentaria y el perfil de lípidos de ratas Wistar. Debido a la cepa utilizada el 38.5% de los animales presentaron resistencia como lo indican las investigaciones previas (136,157,158), motivo por el cual se aumentó el número de animales expuestos para reunir la muestra necesaria que fuera estadísticamente significativa.

#### 7.1.1 Peso corporal

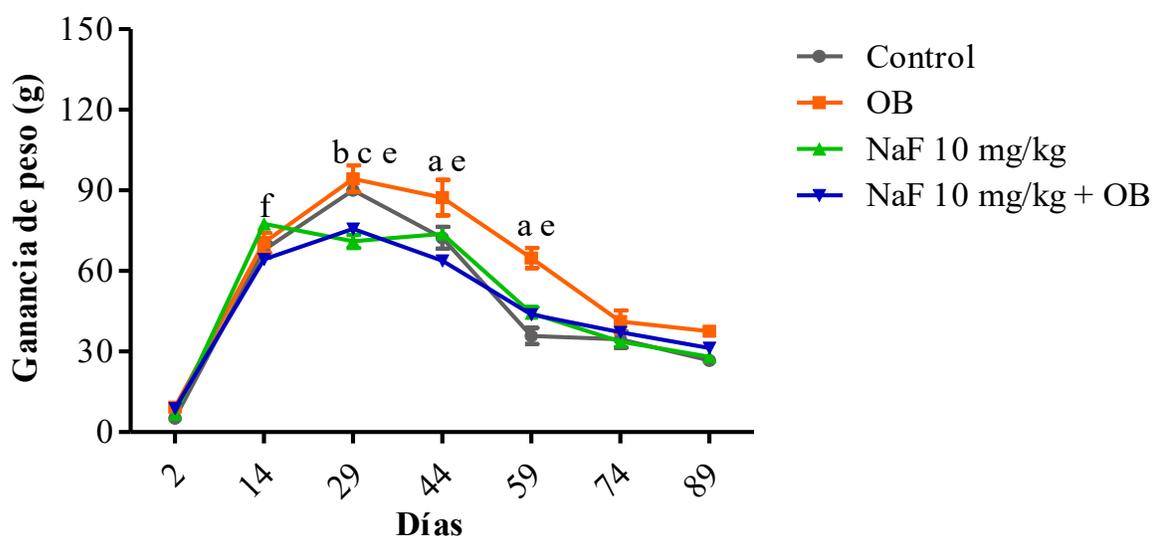
Los resultados que se obtuvieron en cuanto al peso corporal se muestran en la figura 4, en donde pudo observarse un aumento significativo de peso del grupo obeso a partir del día 59 en comparación con el grupo control ( $P<0.001$ ), y una disminución del grupo expuesto a NaF 10mg/kg + OB a partir del día 44 en comparación con el grupo obeso ( $P<0.001$ ).



**Figura 4. Efecto de la DHL sobre el peso corporal de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post test Bonferroni; valores de  $P<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.1.2 Ganancia de peso

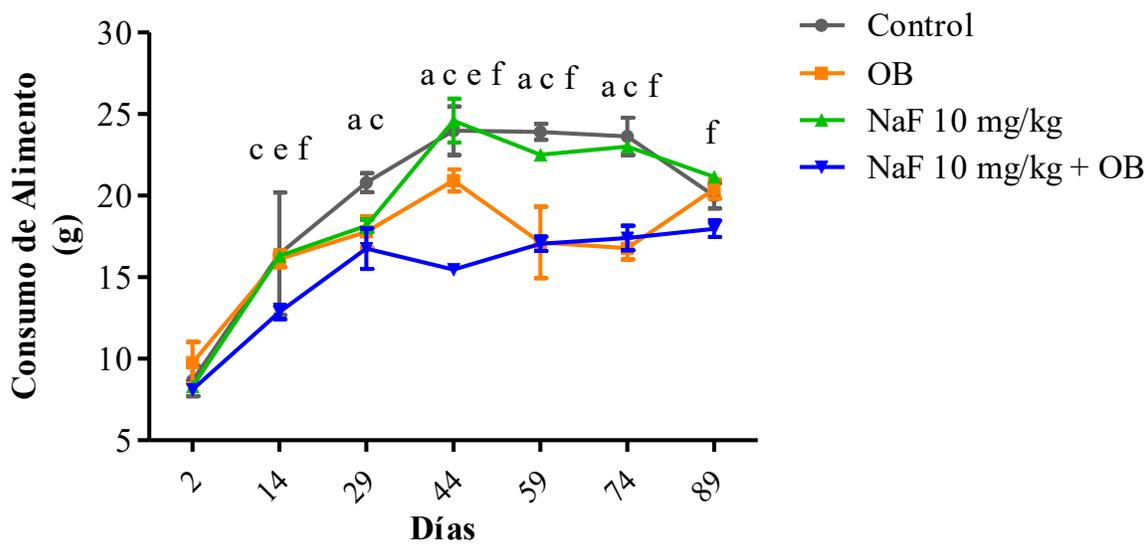
La ganancia de peso después de los 90 días de administración de una DHL, se muestra en la figura 5, en donde se aprecia un patrón similar de crecimiento en todos los grupos siendo el pico máximo el día 29, con una disminución paulatina conforme los días de exposición aumentan. Por lo tanto, se observa un aumento significativo de la ganancia de peso del grupo obeso en los días 44 y 59 ( $P<0.001$ ) en comparación con el grupo control, una disminución significativa del grupo NaF 10 mg/kg ( $P<0.001$ ) y co-expuesto ( $P<0.01$ ) en el día 29 en comparación con el grupo control. Además se observó una disminución significativa del grupo co-expuesto en comparación con el grupo OB en los días 29, 44 y 59 ( $P<0.001$ ) y con el grupo NaF 10 mg/kg en el día 14 ( $P<0.05$ ).



**Figura 5. Efecto de la DHL sobre la ganancia de peso en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.2 Consumo de alimento

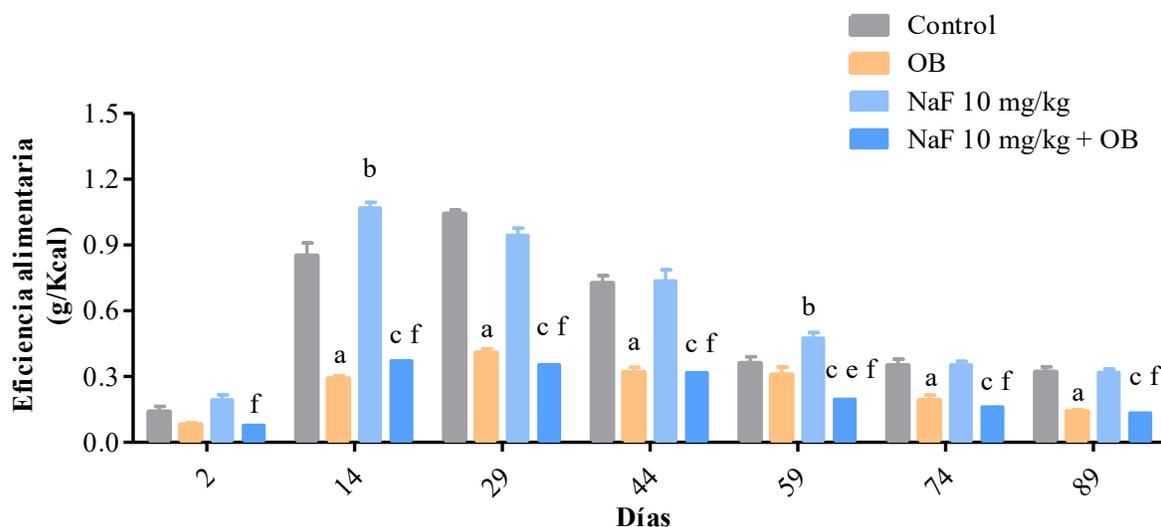
Los datos representados en la figura 6 muestran el consumo de alimento de los animales durante 90 días, en donde se observa que los grupos de DHL tuvieron un consumo menor de alimento en comparación con los grupos con dieta normal, siendo su consumo 1.3 veces menor.



**Figura 6. Efecto de la DHL sobre el consumo de alimento en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.3 Eficiencia alimentaria

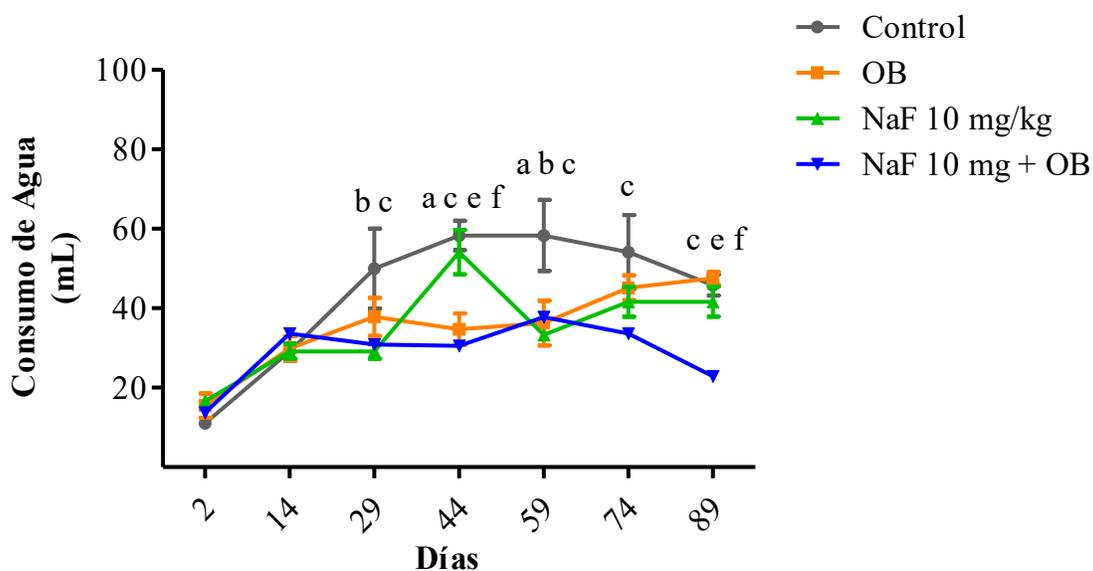
La determinación de este parámetro se basó en el peso y el consumo de alimento por día, obteniendo como resultado diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre grupos. El grupo obeso muestra una disminución en comparación con el grupo control a partir del día 2 de exposición ( $P < 0.001$ ), siendo 2.34 veces menor en comparación con el grupo control, en cuanto al grupo co-expuesto se observa una menor eficiencia alimentaria ( $P < 0.001$ ), siendo 1.07 veces en comparación con el grupo obeso y 2.53 veces en comparación con el grupo NaF 10 mg/kg (figura 7).



**Figura 7: Efecto de la DHL sobre la eficiencia alimentaria en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.4 Consumo de agua

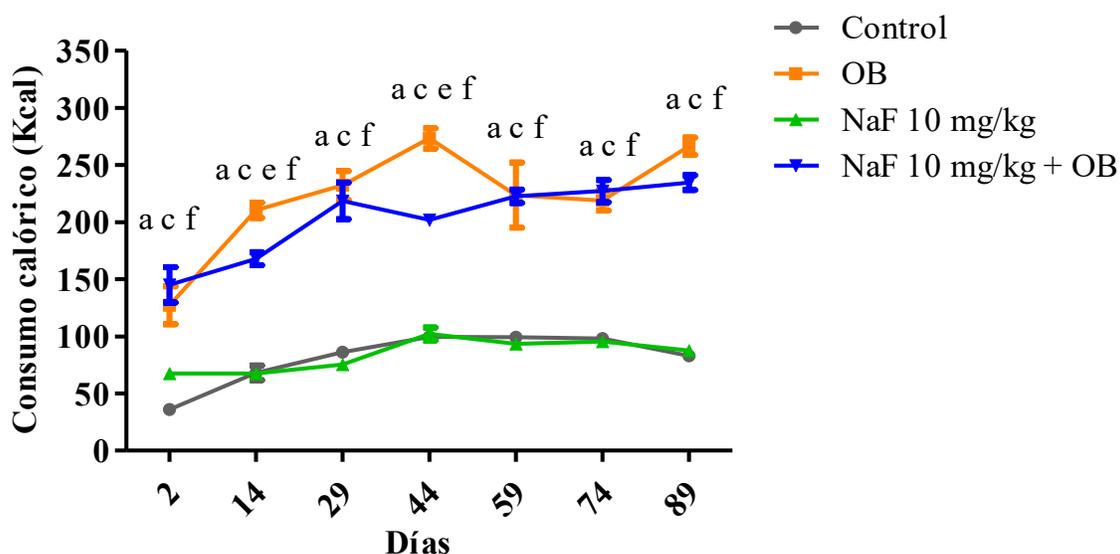
Los resultados obtenidos acerca del consumo de agua entre grupos se muestran en la figura 8, en donde se aprecia una disminución del consumo de agua del grupo obeso en los días 44 y 59 ( $P < 0.01$ ) en comparación con el grupo control. En el grupo de NaF disminuyó en los días 29 y 50 ( $P < 0.001$ ) en comparación con el control y el grupo co-expuesto a partir del día 29 en comparación con el grupo control ( $P < 0.01$ ). También, se aprecia una disminución ( $P < 0.001$ ) del consumo de agua entre el grupo co-expuesto y el grupo obeso en los días 44 y 89 ( $P < 0.01$ ) y por último una disminución entre el grupo NaF 10 mg/kg y el grupo co-expuesto en los mismos días ( $P < 0.01$ ).



**Figura 8. Efecto de la DHL sobre el consumo de agua en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.5 Consumo calórico

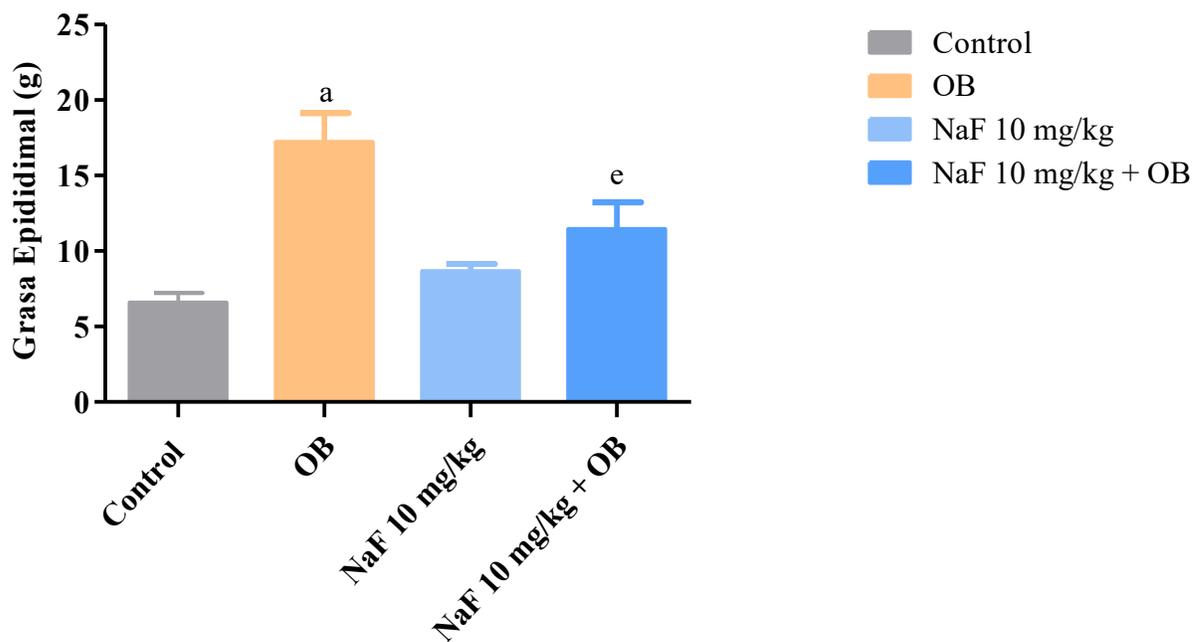
El consumo de calorías representado en la figura 9 muestra una diferencia calórica significativa ( $P < 0.001$ ) entre los grupos con DHL y dieta normal, esto aun cuando, como se mencionó anteriormente, el consumo de alimento era mayor en los grupos de dieta normal.



**Figura 9. Efecto de la DHL sobre el consumo calórico en ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.5.1 Contenido de grasa epididimal

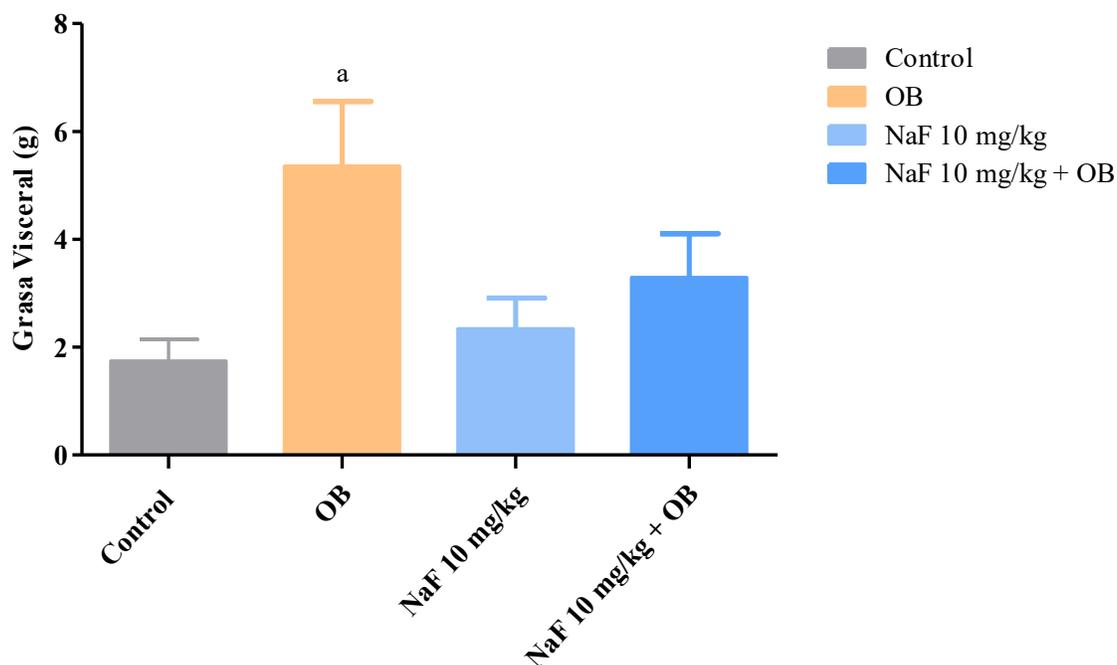
Al término de la administración, los animales fueron sacrificados y los resultados obtenidos sobre el contenido de grasa epididimal se muestran en la figura 10, en donde se distingue un incremento significativo ( $P < 0.001$ ) en el grupo obeso (OB) en comparación con los demás grupos, siendo 2.61 veces más que el grupo control, 1.98 veces más que el grupo NaF 10 mg/kg y 1.5 veces más que el grupo NaF 10 mg/kg + OB, seguido por el grupo co-expuesto, como se esperaba por la dieta administrada, se observa también una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo co-expuesto y el grupo OB (Figura 10).



**Figura 10: Efecto de la dieta DHL sobre el contenido de grasa epididimal de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.5.2 Contenido de grasa visceral

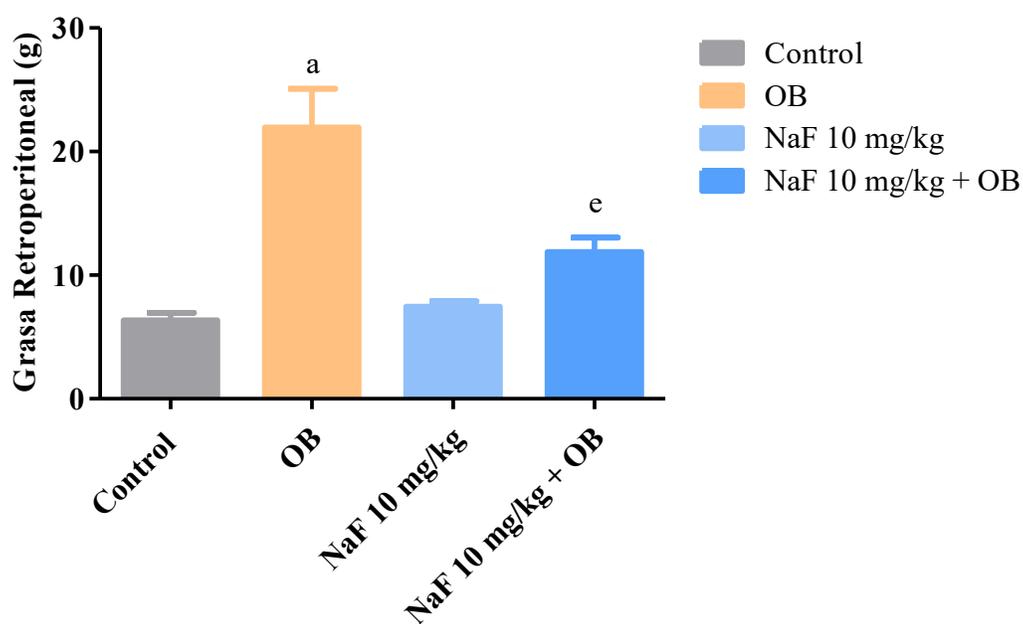
El contenido de grasa visceral está representado en la figura 11, en donde se observa un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el grupo obeso (OB), conteniendo 3.07 veces más grasa que el grupo control.



**Figura 11. Efecto de la DHL sobre el contenido de grasa visceral de ratas Wistar macho expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en la siguiente comparación: a: control vs OB.

### 7.5.3 Contenido de grasa retroperitoneal

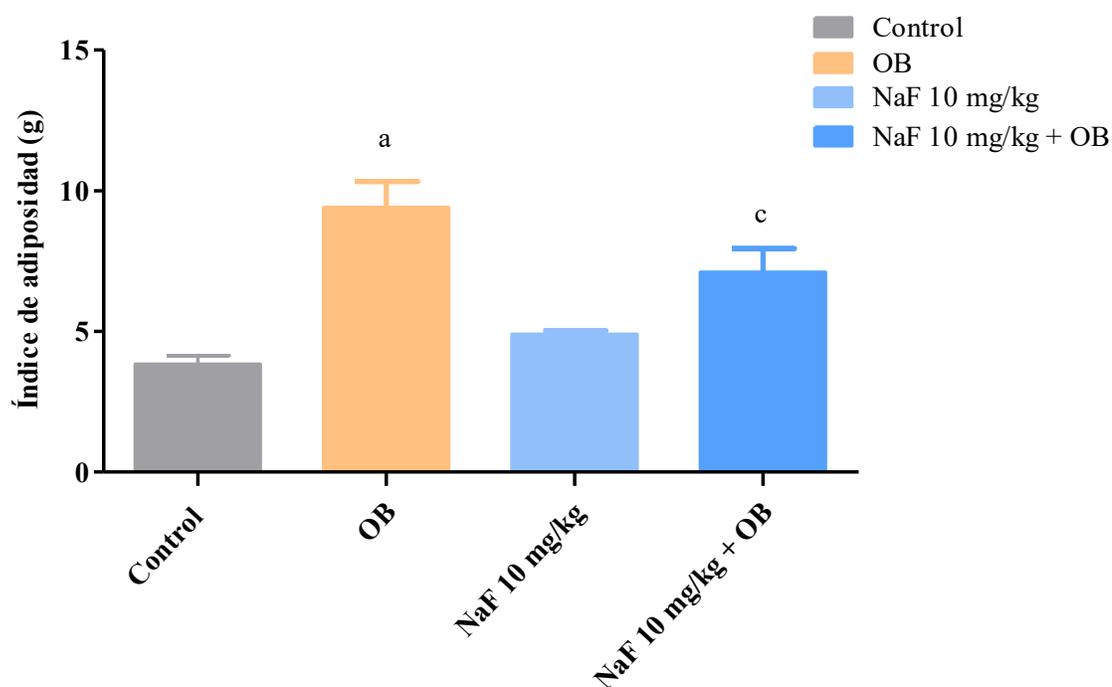
El contenido de grasa retroperitoneal se muestra en la figura 12, en donde se observa que el grupo obeso (OB) tuvo una mayor cantidad de grasa retroperitoneal en comparación con los demás grupos ( $P < 0.001$ ), siendo 3.44 veces mayor en comparación con el grupo control, 2.94 veces más grande que el grupo NaF 10 mg/kg y 1.84 veces que el grupo NaF 10 mg/kg + OB, también se observa una disminución entre el grupo co-expuesto y el grupo OB ( $P < 0.01$ ).



**Figura 12 . Efecto de la DHL sobre el contenido de grasa retroperitoneal de ratas expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: Control vs OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

#### 7.5.4 Índice de adiposidad

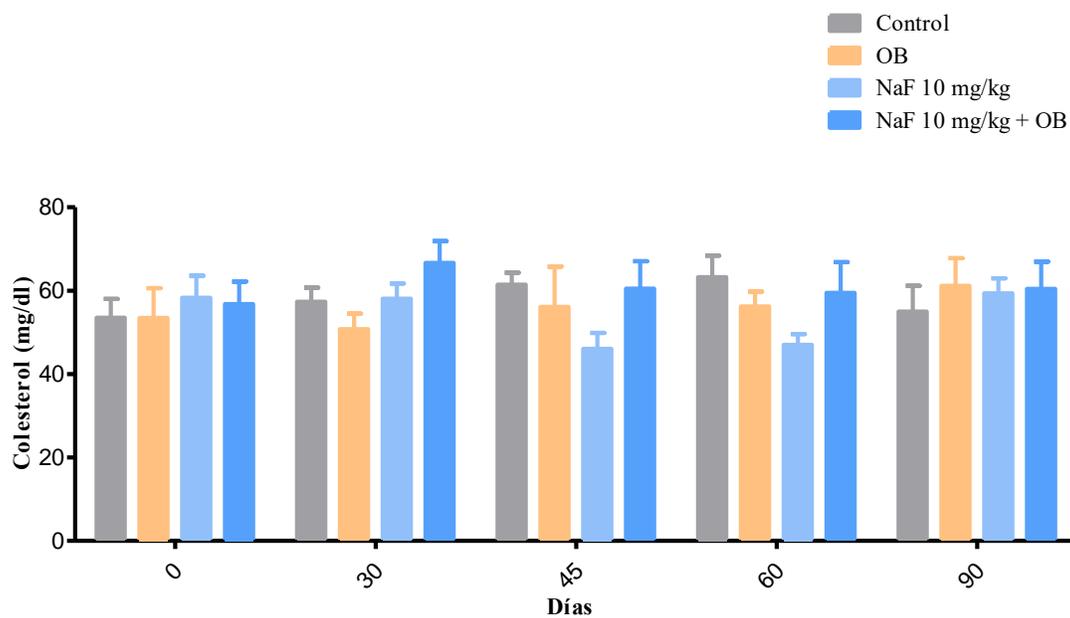
El índice de adiposidad se obtuvo con el fin de evaluar el contenido de grasa del peso total de los animales, la figura 13 muestra los resultados obtenidos en donde se distingue una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) entre el grupo obeso y el grupo control, y entre el grupo NaF 10 mg/kg + OB y el grupo control ( $P < 0.01$ ). Por tanto, se observa que el grupo obeso cuenta con un índice de adiposidad 2.44 veces mayor que el grupo control y el grupo NaF 10 mg/kg + OB es 1.84 veces mayor que el control.



**Figura 13. Efecto de la DHL sobre el índice de adiposidad de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.5.5 Cuantificación de colesterol total

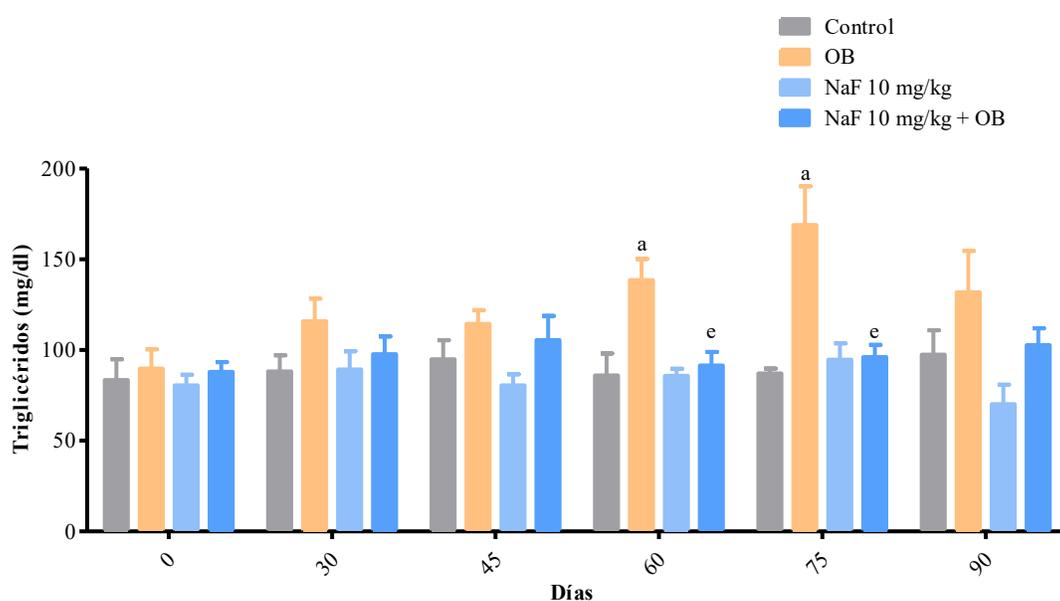
Dentro de la evaluación de la obesidad se realizó la cuantificación del colesterol total como se muestra en la figura 14, en donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos.



**Figura 14: Efecto de la DHL sobre los niveles de colesterol total de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### 7.5.6 Cuantificación de triglicéridos

Los resultados de la cuantificación de triglicéridos se muestran en la figura 15, en donde se pueden observar un aumento significativo en el grupo obeso en comparación con el grupo control, en los días 60 ( $P < 0.01$ ) y 75 ( $P < 0.001$ ), y una disminución entre el grupo co-expuesto y el grupo OB en los días 60 ( $P < 0.05$ ) y 75 ( $P < 0.001$ ).

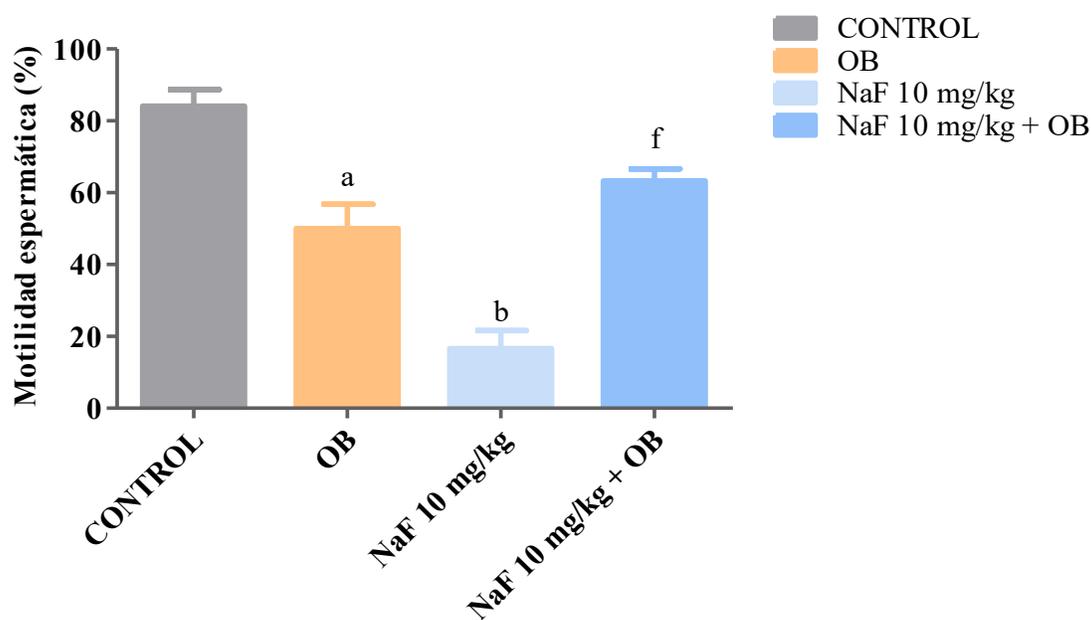


**Figura 15: Efecto de la DHL sobre los niveles de triglicéridos en ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.6 Calidad espermática

### 7.6.1 Motilidad

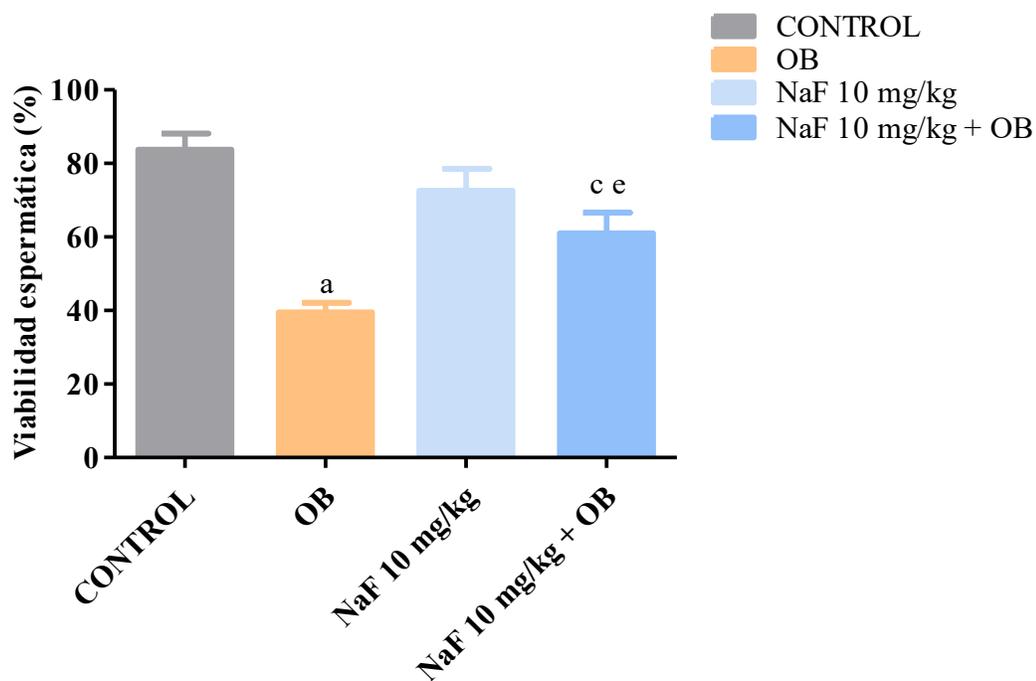
Con el fin de evaluar la calidad de las células espermáticas después de los 90 días de tratamiento se realizó la prueba de motilidad (figura 16) en donde se muestran el porcentaje de espermatozoides móviles, observando una disminución significativa en el grupo OB 1.6 veces ( $P < 0.001$ ) y el grupo NaF 10 mg/kg en comparación con el grupo control, siendo 4.3 menor ( $P < 0.001$ ), y un aumento significativo del grupo co-expuesto en comparación con el grupo NaF 10 mg/kg ( $P < 0.001$ ).



**Figura 16: Efecto de la DHL sobre la motilidad espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.6.2 Viabilidad

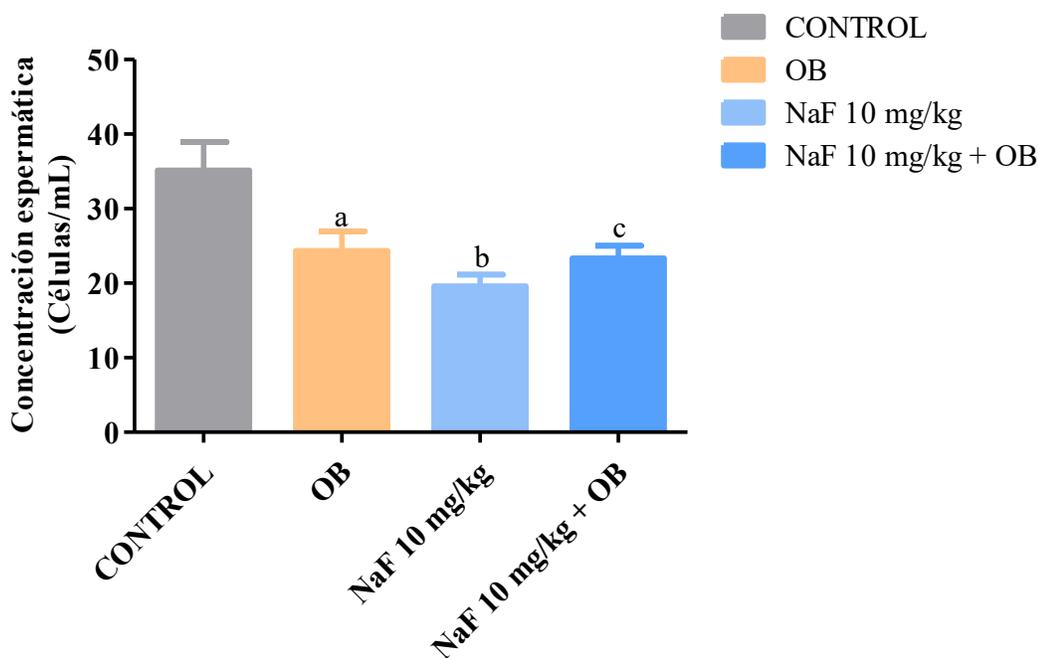
Con el fin de evaluar la calidad de las células espermáticas después de los 90 días de administración se realizó la prueba de viabilidad en donde se cuantificó el porcentaje de espermatozoides viables (figura 17), en donde observamos una disminución significativa 1.9 veces del grupo obeso ( $P < 0.001$ ), así como del grupo co-expuesto siendo 1.3 veces en comparación con el grupo control, y un aumento 1.5 veces del grupo co-expuesto en comparación con el grupo OB ( $P < 0.01$ ).



**Figura 17: Efecto de la DHL sobre la viabilidad espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; c: control vs NaF 10 mg/kg; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.6.3 Concentración espermática

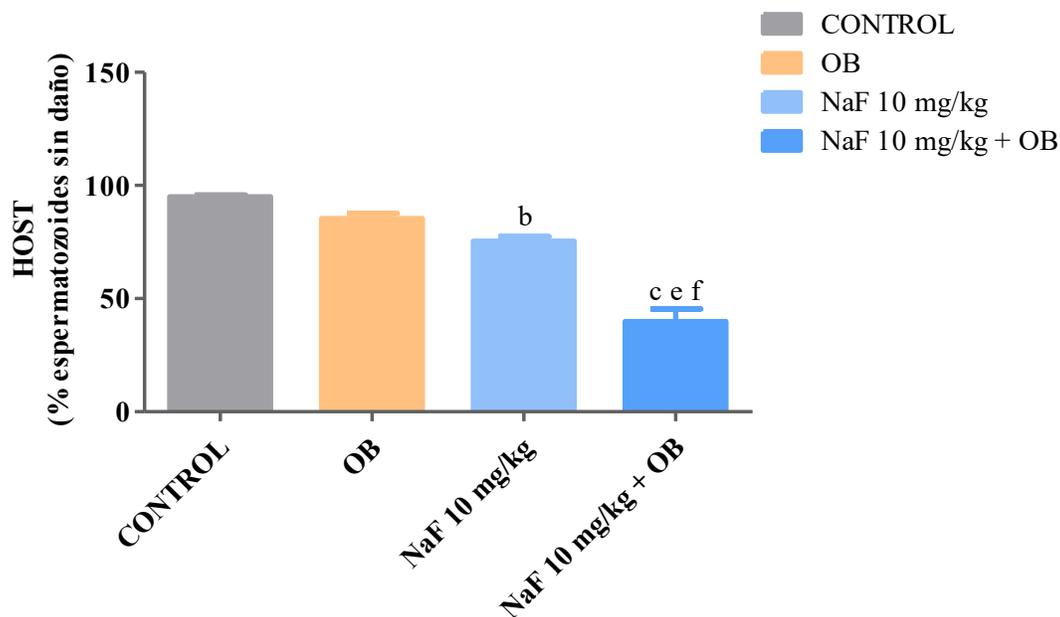
Con el fin de evaluar la calidad de las células espermáticas después de los 90 días de administración se realizó la prueba de concentración en donde se presentó el número de espermatozoides por unidad de volumen como se muestra en la figura 18, donde pudo observarse una disminución significativa de los grupos obeso ( $P < 0.05$ ) siendo 1.4 veces menor, NaF 10 mg/kg ( $P < 0.01$ ), siendo 1.7 veces menor y NaF 10 mg + OB ( $P < 0.05$ ) siendo 1.5 veces menor en comparación con el grupo control.



**Figura 18: Efecto de la DHL sobre la concentración espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB.

#### 7.6.4 HOS-Test

Los resultados de la prueba hipoosmótica se muestra en la figura 19, en la que se observó como resultado una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) 1.2 veces menor del grupo NaF 10 mg/kg en comparación con el grupo control. Por otra parte el grupo co-expuesto tuvo una disminución de 2.3 veces en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ), 2.1 veces con el grupo obeso ( $P < 0.001$ ) y 1.8 veces con el grupo NaF 10 mg/kg ( $P < 0.001$ ).

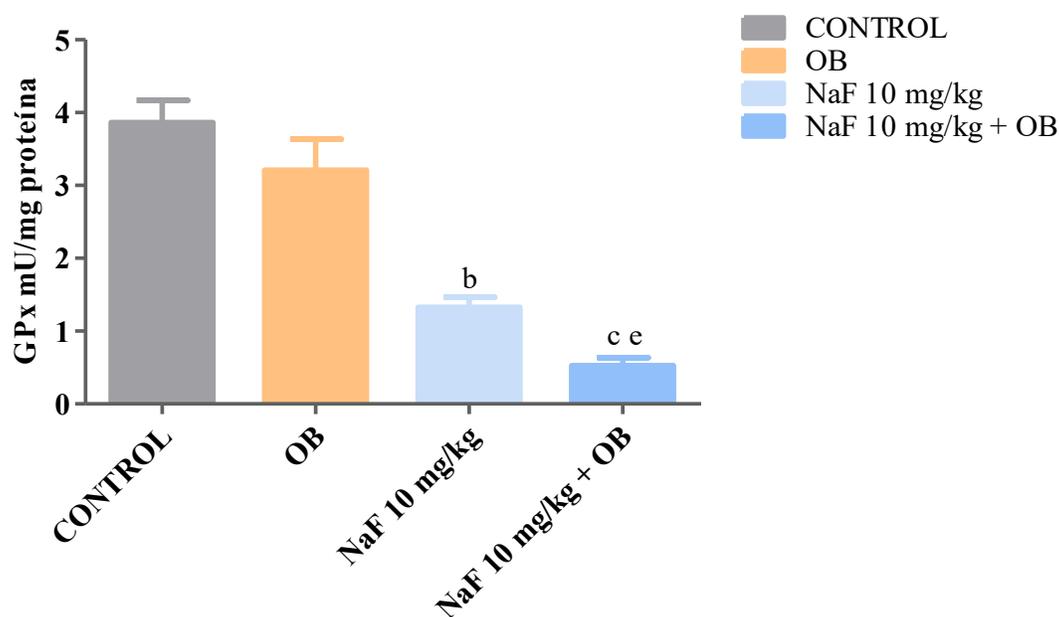


**Figura 19: Efecto de la DHL sobre la hipoosmolaridad de la membrana espermática de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tuckey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.7 Estrés oxidativo

### 7.7.1 Glutación peroxidasa (GPx)

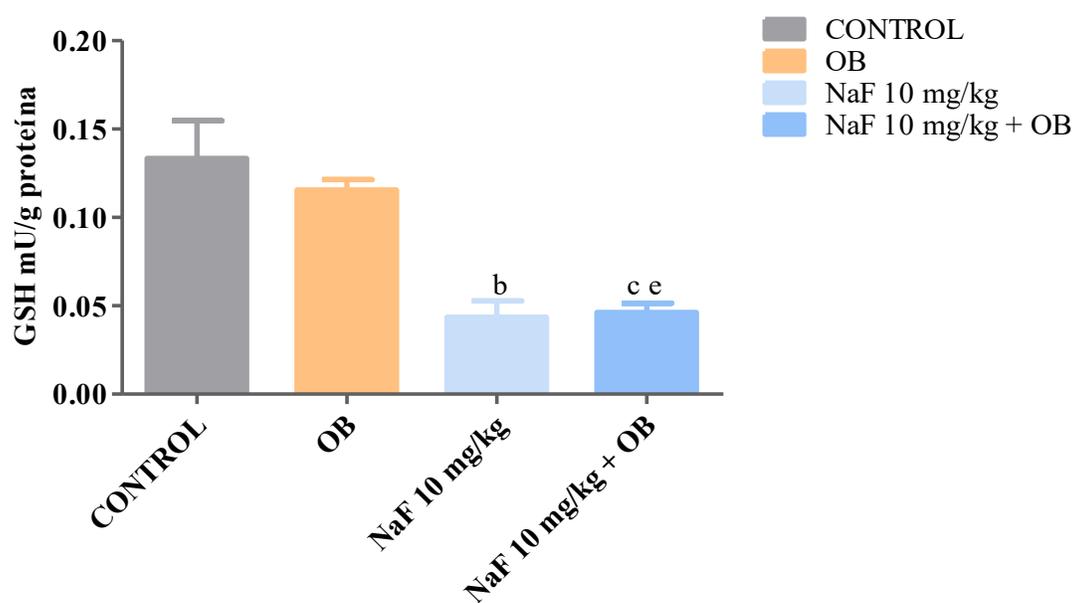
La figura 20 muestra el resultado de la actividad de GPx, en donde se observó una disminución significativa del grupo NaF 10 mg/kg 2.9 veces menor en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ), así mismo, el grupo co-expuesto muestra una disminución 7.3 veces en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ) y 6 veces en comparación con el grupo obeso ( $P < 0.001$ ).



**Figura 20: Efecto de la DHL sobre la actividad de GPx de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.7.2 Glutación (GSH)

Para los niveles de GSH los cuales se muestran en la figura 21, se observó una disminución significativa del grupo NaF 10 mg/kg 3 veces menor en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ), así mismo, el grupo co-expuesto muestra una disminución de 2.8 veces menor en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ) y 2.4 veces menor en comparación con el grupo obeso ( $P < 0.01$ ).

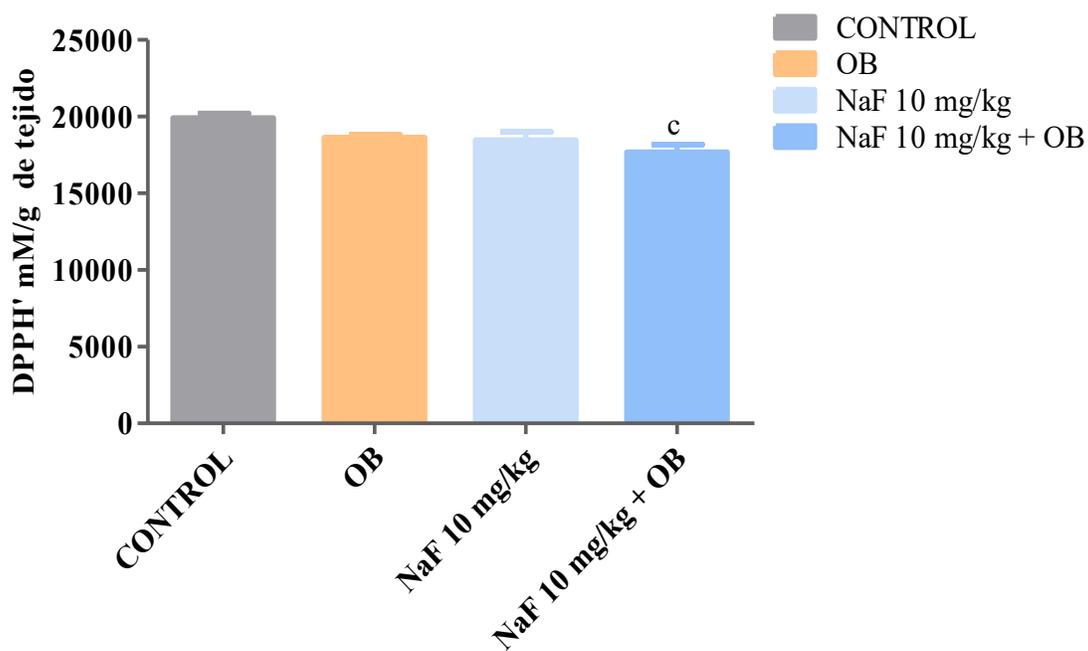


**Figura 21: Efecto de la DHL sobre los niveles de GSH de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.7.3 Actividad antioxidante total

#### 7.7.3.1 DPPH'

Los resultados de los valores de antioxidantes totales (figura 22) mostraron una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) 1.12 veces menor del grupo NaF 10 mg/kg + OB en comparación con el grupo control.



**Figura 22: Efecto de la DHL sobre la actividad antioxidante total (DPPH') de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tukey; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en la siguiente comparación: c: control vs NaF 10 mg/kg + OB.

### 7.7.3.2 ABTS<sup>•+</sup>

Los resultados de la prueba ABTS<sup>•+</sup> (figura 23) muestran una disminución estadísticamente significativa 1.3 veces del grupo NaF 10 mg/kg + OB en comparación con el grupo control (P<0.05).

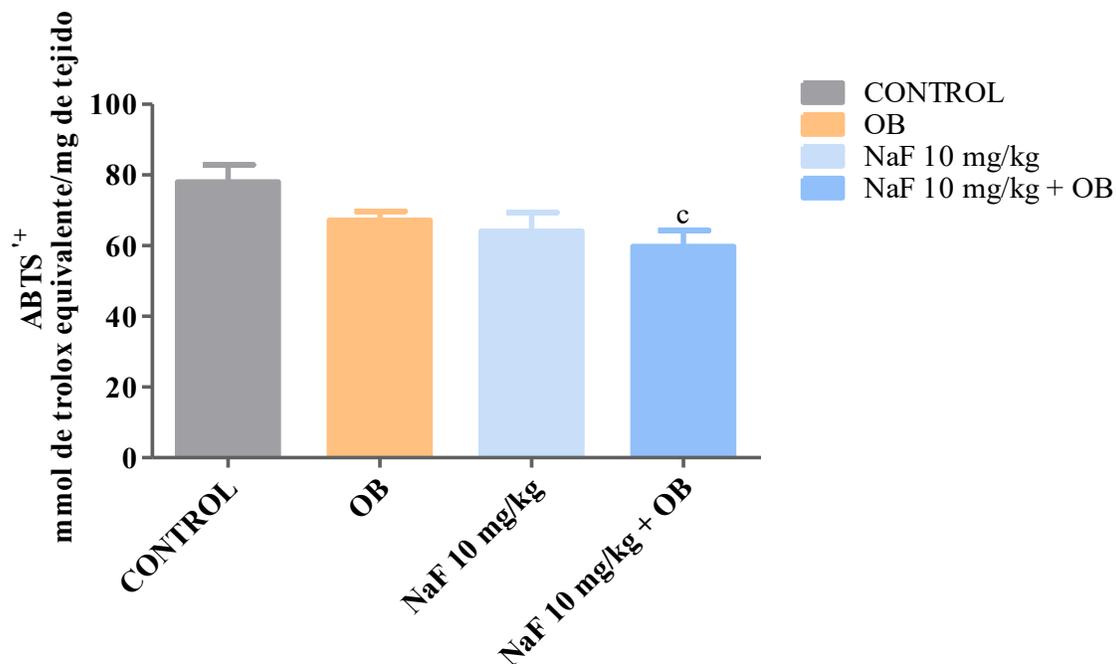
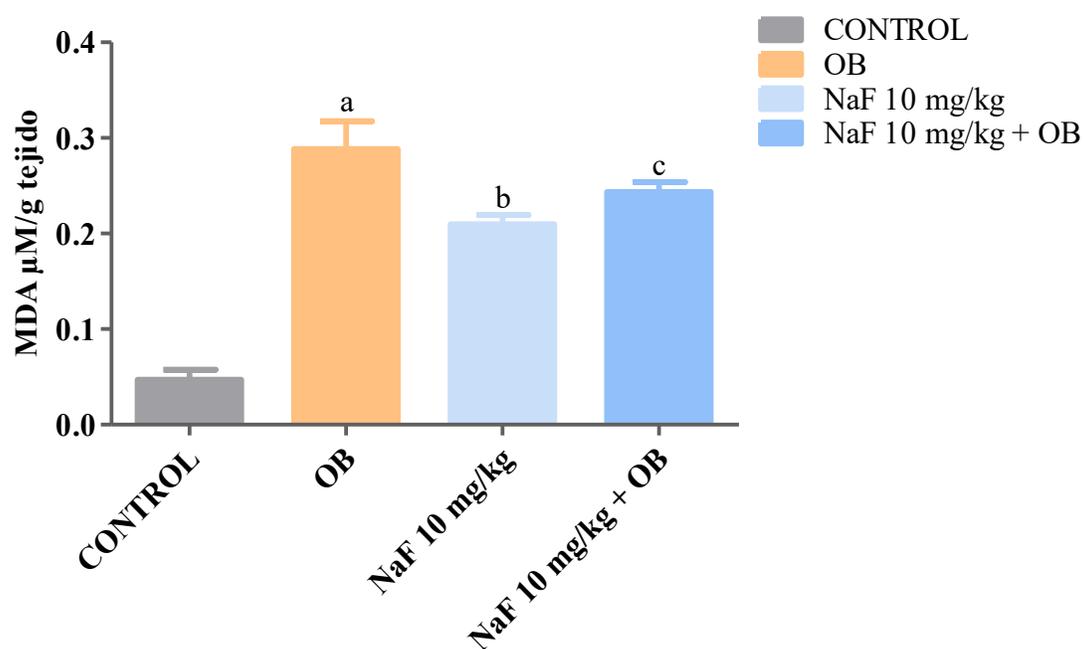


Figura 23: Efecto de la DHL sobre la actividad antioxidante total (ABTS<sup>•+</sup>) de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF. Los resultados se expresaron como Media ± SEM (n=6), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tukey; valores de P<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en la siguiente comparación: c: control vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.8 Daño oxidativo

### 7.8.1 Malondialdehído (MDA)

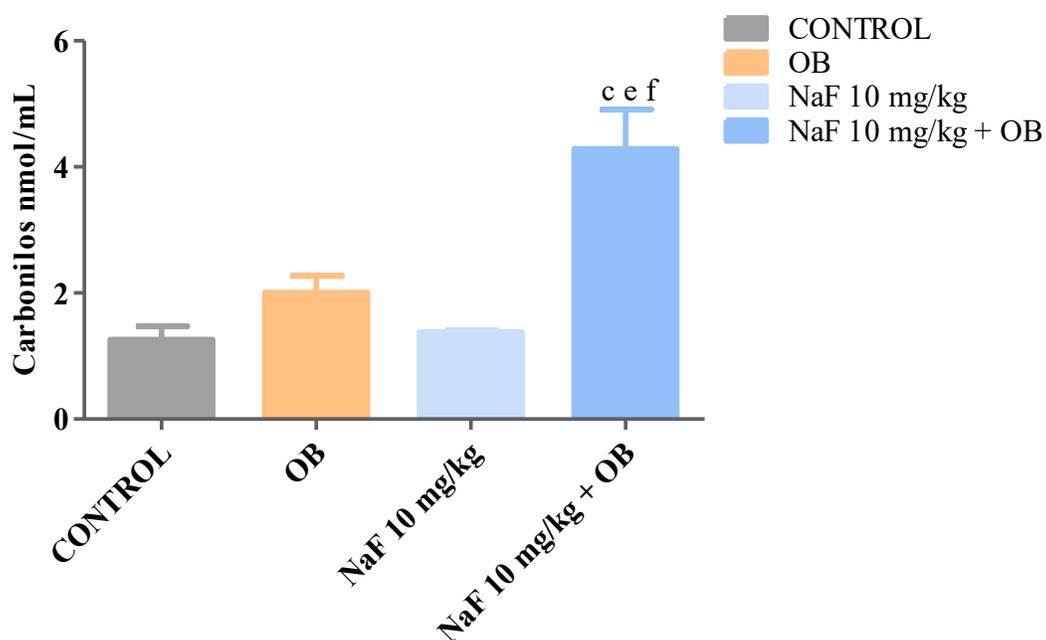
La cuantificación de MDA como resultado de la peroxidación lipídica se muestra en la figura 24 en donde se observó un aumento significativo 6.1 veces mayor del grupo obeso ( $P<0.001$ ), 4.4 veces del grupo NaF 10 mg/kg ( $P<0.01$ ) y 5.1 veces del grupo co-expuesto ( $P<0.001$ ) en comparación con el grupo control.



**Figura 24: Efecto de la DHL sobre la concentración de MDA de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con su post-test Tukey; valores de  $P<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: a: control vs OB; b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.8.2 Carbonilos

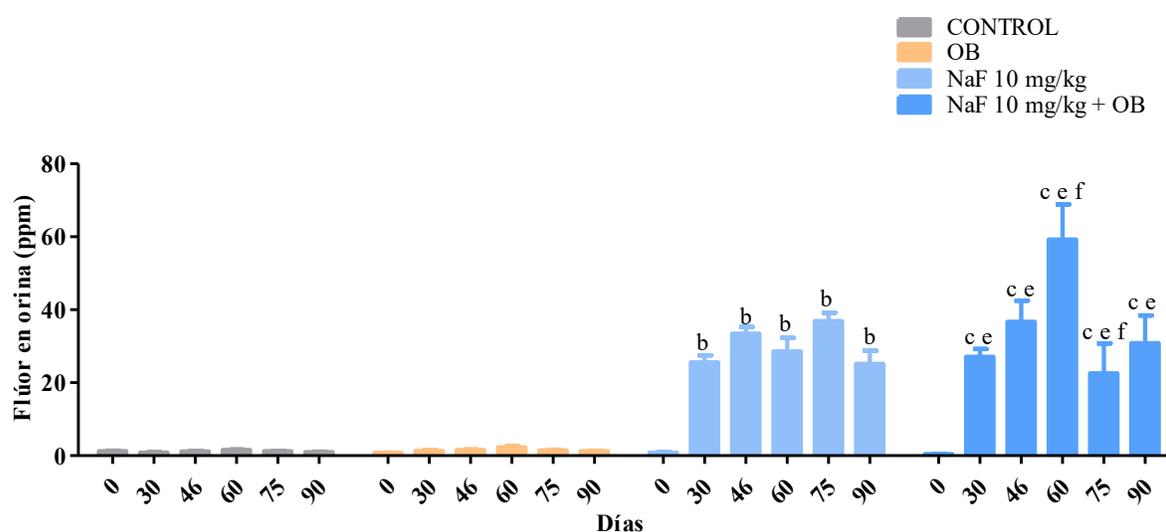
Para la cuantificación de proteínas carboniladas los resultados mostraron un incremento significativo 3.3 veces mayor del grupo co-expuesto en comparación con el control ( $P < 0.001$ ), 2.1 veces mayor en comparación con el grupo obeso ( $P < 0.01$ ) y 3.1 veces mayor en comparación con el grupo NaF 10 mg/kg ( $P < 0.001$ ), como se observa en la figura 25.



**Figura 25: Efecto de la DHL sobre la concentración de carbonilos de proteínas de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.9 Cuantificación de fluoruro en orina

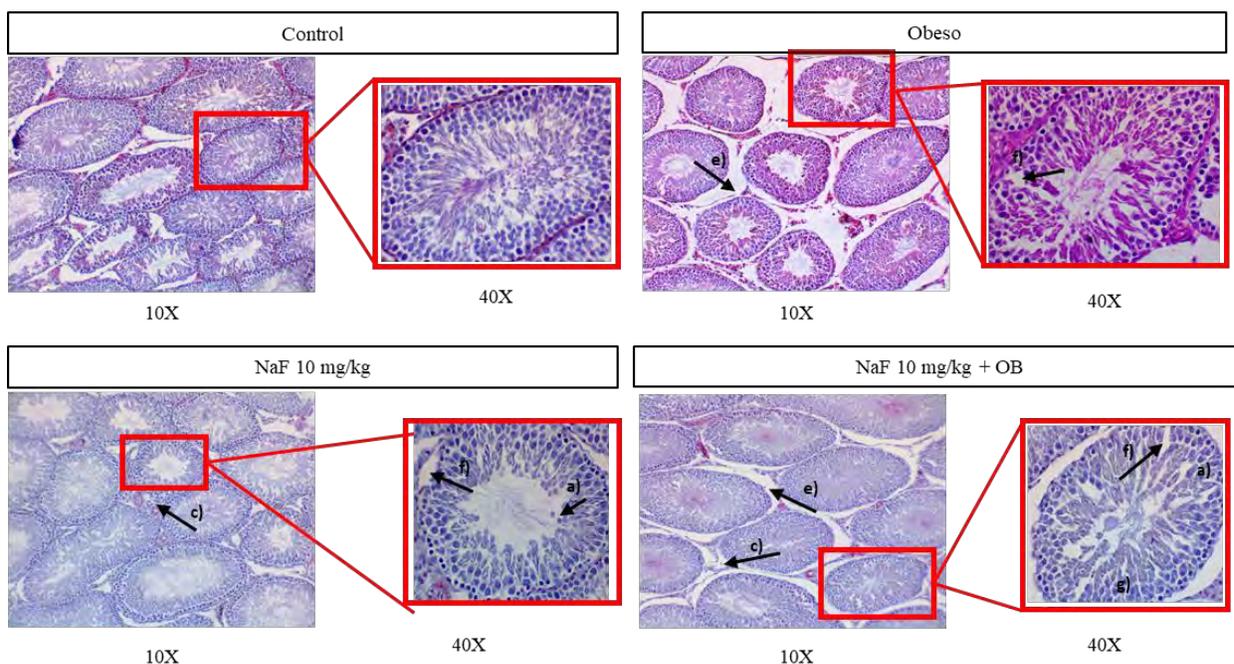
Los resultados obtenidos de la cuantificación de NaF excretado se realizaron en la orina recolectada en 24 horas de los animales expuestos y se visualiza en la figura 26. Donde pudo observarse el incremento de NaF en los grupos expuestos, además en el día 60 se observa un incremento significativo ( $P < 0.001$ ) de NaF en el grupo co-expuesto en comparación con NaF 10 mg/kg, así como una disminución en el día 75 ( $P < 0.001$ ) entre los mismos grupos.



**Figura 26. Efecto de la DHL sobre la cuantificación de NaF en la orina de 24 horas de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF.** Los resultados se expresaron como Media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con su post-test Bonferroni; valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se describen en las siguientes comparaciones: b: control vs NaF 10 mg/kg; c: control vs NaF 10 mg/kg + OB; e: OB vs NaF 10 mg/kg + OB; f: NaF 10 mg/kg vs NaF 10 mg/kg + OB.

## 7.10 Histología

Dentro de la prueba histológica se utilizó la escala de medición de cambios espermatogénicos de Johnsen, evaluando 25 túbulos por testículo. En el grupo control no se observaron cambios, lo que sugiere una espermatogénesis normal con una puntuación de  $9.18 \pm 0.019$ . En cuanto al grupo co-expuesto con dosis de 10 mg/kg, se observó la disminución significativa con un puntaje de  $6.83 \pm 0.10$ , en comparación con el grupo control ( $P < 0.001$ ), OB ( $P < 0.001$ ), NaF 5.5 mg/kg + OB ( $P < 0.001$ ) y NaF 10 mg/kg ( $P < 0.001$ ). Además de una moderada desorganización de las células germinales, moderada descamación, edema intersticial moderado, una moderada vacuolización de túbulos seminíferos y arresto o detención de la espermatogénesis.



**Figura 27:** Efecto de la DHL sobre la histología testicular de ratas Wistar expuestas subcrónicamente a NaF. Se puede observar a) desorganización de células germinales, b) descamación de células, c) reducción de células germinales, d) edema intersticial, e) vacuolización de túbulos seminíferos, f) arresto o detención espermatogénico

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Inducción de obesidad

Actualmente, se ha evidenciado, que el aumento de lípidos en la dieta y el tipo de grasa que se consume como la grasa saturada, genera un cúmulo de energía, el cual es almacenado en el tejido adiposo blanco en forma de triglicéridos (159); la sobrecarga de ácidos grasos saturados en la dieta estimula la hipertrofia adiposa, debido a un rápido proceso de absorción en los adipocitos (61,160,161) y tiene como consecuencia la expansión del tejido para adaptar tanto el incremento de los lípidos exógenos procedentes de la dieta, como los lípidos endógenos que se producen por un aumento en la lipogénesis de *novo* (161–163). En el presente estudio, se estableció un modelo de obesidad en ratas Wistar macho, en donde la administración de una dieta con 50% de kilocalorías de lípidos durante 90 días generó un 75% de ratas obesas, como se ha evidenciado en otras investigaciones (136,164,165). Además de un incremento 2.5 veces de la grasa epididimal, 3.08 la visceral y 3.47 la retroperitoneal, elevando así 2.4 veces el porcentaje de adiposidad.

Por otra parte se observó un aumento del consumo calórico total y la eficiencia alimentaria del grupo obeso como se ha reportado con estudios afines como el de Noeman y cols., 2011, los cuales trabajaron con una dieta con 46% de kcal de grasa durante 16 semanas administrada a ratas Wistar, observando un incremento significativo de peso, así como del colesterol total y de los triglicéridos (110). Además Lima-Leopoldo y cols., 2008 observaron un incremento de peso, así como del porcentaje de grasa, del consumo calórico y de la eficiencia alimentaria, en ratas Wistar después de administrar una dieta con 45.2% de grasa durante 15 semanas (62). Por su parte Oliveira y cols., 2013, indicaron que al administrar diferentes dietas occidentales o de cafetería durante 20 semanas, el incremento del peso corporal y de la eficiencia alimentaria en ratas Wistar (61). Además Binder y cols., 2012, percibieron un incremento del peso corporal y de los depósitos de tejido adiposo después de administrar una dieta con 40% de kcal de grasa a ratones C57BL/6 durante 10 semanas (166), mientras que Liu y cols., 2016, administraron una dieta con 60% de grasa a ratones C57BL/6 observando aumento del peso corporal, y del contenido de grasa después de 8 semanas de administración (129). Con base a los estudios reportados en la literatura podemos concluir

que el modelo de inducción de obesidad utilizado fue el adecuado de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

## **8.2 Disminución del peso corporal en la co-exposición a NaF y DHL.**

El peso corporal de ratas Wistar co-expuestas a NaF y DHL durante 90 días mostró una disminución estadísticamente significativa 1 vez en comparación con el grupo OB ( $P > 0.001$ ), lo cual pudo ser ocasionado por la exposición a NaF, el cual se ha visto que puede generar, una reducción de la ingesta de alimentos, así como de la absorción de nutrientes, lo que ocasionaría una descompensación de macromoléculas celulares y por lo tanto la disminución de peso (89), además se pudieron haber ocasionado cambios en el metabolismo lipídico debido a la dosis de NaF utilizada y al tiempo de exposición al tóxico, como han explicado estudios previos en donde la grasa ingerida por la dieta ocasiona incremento de la absorción del NaF al reducir la tasa de vaciamiento gástrico en el duodeno, por lo tanto incrementan los niveles plasmáticos de NaF (167–169), provocando cambios en el metabolismo lipídico (89), específicamente disminuyendo la apolipoproteína E involucrada en el transporte y distribución de lípidos, afectando la vía del colesterol, así como induciendo estrés oxidativo en el retículo endoplásmico, aumentando la expresión de la proteína regulada por glucosa (GRP78), que reduce la proteína de unión al elemento regulador de esterol (SREBP), desactivando la síntesis de Tg (167), otra propuesta sería por la inhibición de la enzima fosfatidato fosfatasa generada por el NaF, enzima que juega un papel clave en la síntesis de triglicéridos (20), otras enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo lipídico y pudieron haber sido alteradas por la exposición a NaF son la triglicérido lipasa, la esterasa no específica y la pirofosfatasa (170), explicando también el resultado de la disminución de triglicéridos del grupo co-expuesto; concordando con otras investigaciones como la de Sun y cols., 2017, los cuales demostraron que la exposición crónica a NaF en concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L reduce el peso corporal 1.04, 1.1 y 1.19 veces respectivamente, en relación dosis dependiente en ratones Kunming (90). Por su parte, Feng y cols., 2015, muestran que la exposición con NaF a una dosis de 25 mg/kg, durante 7 semanas en ratas Sprague-Dawley, disminuyó el peso corporal 1.07 veces (91), Thangapandiyam y cols., 2015 al administrar la misma dosis de NaF a ratas Wistar durante 4

semanas también observaron una disminución 1.3 veces después de 4 semanas (89). También se evaluó el contenido de grasa corporal, parámetro utilizado como indicador del cúmulo de grasa generado por la administración de la DHL observando una disminución de la grasa epididimal 1.5 veces y 1.85 veces la retroperitoneal demostrando el efecto del fluoruro en el metabolismo lipídico. Para el contenido de grasa visceral se observa la disminución entre el grupo OB y co-expuesto, aunque no fue estadísticamente significativo, sin embargo, se mantiene el incremento del índice de adiposidad en comparación con el grupo control y NaF 10 mg/kg, como lo han observado otros investigadores en donde encuentran aumento de la acumulación de tejido adiposo sin que el peso corporal aumentara significativamente (171,172). Otro parámetro utilizado, es la eficiencia alimentaria, con el fin de evaluar la capacidad de transformar las calorías consumidas en peso corporal, observando una disminución significativa ( $P < 0.001$ ) probablemente ocasionado por la dosis del NaF administrado generando un balance energético negativo junto con alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos por su característica de inhibición enzimática, con su consecuente disminución de la ganancia de peso (20); y finalmente en cuanto a los niveles séricos de colesterol no se obtuvieron diferencias significativas, probablemente por la adaptación del organismo al NaF relacionado con dosis altas sin importar el tiempo de exposición o el tipo de dieta administrada (167,173) Por lo anteriormente descrito es necesario realizar más estudios para conocer el mecanismo de acción definitivo de NaF con dietas hiperlipídicas en el metabolismo lipídico.

### **8.3 Efecto de la co-exposición de fluoruro y DHL sobre la calidad espermática.**

Los resultados obtenidos en cuanto a la motilidad espermática, mostraron un aumento significativo del grupo co-expuesto en comparación con el grupo NaF 10 mg/kg ( $P > 0.001$ ), probablemente ocasionado por el contenido de ácidos grasos proporcionados por la manteca con la que se realizó la DHL disminuyendo el daño ocasionado por el NaF, aunque el mecanismo de acción no ha sido establecido, son pocas las investigaciones que han asociado al consumo de dietas ricas en ácidos grasos con un aumento de la motilidad espermática (116,174), Ferramosca y cols., 2017, observaron dicho aumento después de administrar una DHL con un 35% de kcal de grasa más una suplementación de aceite de olivo o aceite de krill

a ratas Sprague-Dawley durante 4 semanas (116), cuando suplementaron ácido oleico en ratones, por su parte, Chavarro y cols. 2014 encontraron una relación positiva entre el consumo de ácidos grasos, específicamente ácido esteárico, y la motilidad espermática en un estudio con 209 universitarios (174), sin embargo es necesario realizar más investigaciones identificar la forma en la que los ácidos grasos actúan en la motilidad espermática.

Por otro lado se pudo observar una disminución significativa de la viabilidad y la concentración de espermatozoides del grupo co-expuesto con respecto al grupo control, ( $P > 0.001$ ). Esto podría explicarse debido a dos mecanismos, el primero por el daño a la membrana plasmática de los espermatozoides generado por la exposición a NaF, ocasionando una mayor peroxidación lipídica que conlleva una disminución de la capacidad de la fertilización espermática (109), como los resultados obtenidos en investigaciones en las que se expusieron crónicamente a NaF en concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L a ratones, observando la disminución del conteo espermático en presencia de concentraciones mayores de NaF (95,97,102), mientras que, en investigaciones en ratas Wistar se observó que la exposición con una dosis de 5 mg/kg durante 8 semanas, disminuyó la viabilidad y la concentración espermática (25,98). El segundo mecanismo puede ser explicado como consecuencia del aumento de la grasa epididimal ocasionado por la DHL, la cual por su característica termorreguladora podría aumentar la temperatura gonadal, generando una fertilidad más baja (112) como ha sido reportado en investigaciones en las que inducen obesidad a animales con 65% de lípidos en la dieta disminuyendo la viabilidad y conteo espermático después de 3 meses de exposición (175), con la misma tendencia en dietas con 20.7% de manteca de cerdo y 2.9% de aceite de soya durante 8 semanas (120), así como con el aumento del 45% de grasas (122). Otra prueba utilizada en la evaluación de las alteraciones en los espermatozoides inducidas por la co-exposición fue la prueba HOS-Test que evalúa el daño en la membrana plasmática (144), observando el incremento de daño del grupo co-expuesto en comparación con los controles posiblemente debido a la baja cantidad de enzimas antioxidantes citoplasmáticas que poseen los espermatozoides como SOD, CAT y Glutación peroxidasas/reductasas haciéndolos más susceptibles al daño oxidativo (176), así como, a los niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados que poseen en la membrana plasmática. Por lo tanto, el entorno lipídico al que están expuestos los espermatozoides

probablemente tenga un papel importante en el desarrollo y la función del esperma, induciendo peroxidación lipídica (112), con lo cual podemos comprobar el efecto sinérgico generado por la exposición a NaF y a DHL en los espermatozoides.

#### **8.4 Estrés y daño oxidativo generado por la co-exposición a dietas hiperlipídicas y NaF.**

En cuanto a la evaluación del estrés y daño oxidativo los parámetros utilizados fueron la cuantificación de la concentración de GSH en el testículo y la actividad de GPx en los espermatozoides observando una disminución significativa de ambos en el grupo co-expuesto en comparación con los grupos control y obeso; y para la medición del daño oxidativo generado por la co-exposición los resultados indican un aumento significativo de las concentraciones de MDA y de proteínas carboniladas en comparación con el grupo control, obeso y expuesto a NaF 10 mg/kg; lo cual podría explicarse a las bajas concentraciones de enzimas reparadoras de ERO en los espermatozoides (85), en las mitocondrias de los espermatozoides tienen poca capacidad para responder al ataque de ERO al no poder producir más enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) para contrarrestar el estrés oxidativo y reparar el daño del ADN (177). Además, la exposición a NaF puede haber generado deficiencia de zinc en los testículos (178,179), disminuyendo los niveles de testosterona (88,89,91,97), y lo que es más importante, aumentando la generación de estrés oxidativo en los testículos, lo que conduce a la aparición de espermatozoides de mala calidad (25,29,76,83,88,93). Esto se relaciona con estudios previos como el de Zhang y cols. 2013, los cuales encontraron una disminución de la actividad de la enzima CAT y aumento de la concentración de MDA en ratas expuestas a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L de NaF durante 12 semanas (87), Das-Sarkar y cols. 2006, administraron 20 mg/kg de NaF a ratas Wistar durante 28 días obteniendo una disminución en la actividad de CAT, peroxidasas y SOD aumentado las concentraciones de MDA y citosina desaminasa (88), también Izquierdo-Vega y cols., 2008, observaron una disminución en la actividad de SOD junto con un aumento de las concentraciones de  $O_2^{\cdot-}$  y MDA (25). Además, se ha reportado en diversas investigaciones que los ácidos grasos elevados promueven la generación de  $O_2^{\cdot-}$  (180), además de ser susceptibles a la oxidación, al estimular la formación de radicales libres y

aumentar la acumulación de subproductos oxidativos (181). También se ha correlacionado con el IMC y los biomarcadores del estrés oxidativo (182), generando disminución de las actividades de enzimas antioxidantes como SOD y GPx (183,184); como se observa en investigaciones en las que administran dietas con aumento del 65% de lípidos (32.5% de manteca de cerdo y 32.5 de aceite de maíz) durante 1, 2 y 3 meses, obteniendo como resultado la disminución de las actividades de SOD y GPx, y aumenta las concentraciones de MDA, tanto en testículos como en espermatozoides (112). Zhang y cols., después de 9 y 18 semanas de exposición con aumento de 45% de lípidos observaron una disminución en la concentración de GSH y de las actividades de CAT y GPx, así como de la actividad antioxidante total, además de un aumento en las concentraciones de MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO (113). Por otro lado, en investigaciones en diferentes modelos animales, como conejo y rata, en órganos como corazón e hígado, han observado que el consumo de dietas con modificaciones en el contenido de grasa y expuestos crónicamente a fluoruro en concentraciones desde 50 mg/L, disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como CAT, SOD, GSH, GPx y GR, así como. aumenta la concentración de MDA (89,185–187). Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que la co-exposición a NaF y dietas hiperlipídicas puede generar infertilidad masculina induciendo estrés y daño oxidativo tanto en testículo como en espermatozoides.

## **8.5 Histología**

Los resultados obtenidos del estudio de la histología testicular muestran una disminución significativa en el puntaje de Johnsen del grupo co-expuesto de 10 mg/kg en comparación con los controles. También se observó desorganización y descamación de las células germinales, con presencia de edema intersticial, vacuolización de los túbulos seminíferos y arresto o detención espermatogénica, una de las posibles explicaciones a este resultado es que las células germinales contienen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (97,188), además de una baja capacidad antioxidante, lo que las hace vulnerables al estrés oxidativo, el cual pudo ser generado por la exposición a NaF (89,188), que ha demostrado aumentar la generación de ERO y disminuir enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GPx (25,80,88,89); lo que concuerda con los resultados obtenidos. Además se han vinculado las

bajas concentraciones de testosterona con la disminución de la espermatogénesis y por ende de la concentración espermática, por daños en las células de Leydig (98), como lo reportado por Thangapandiyan y cols., 2015 observando aumento de lesiones morfológicas testiculares en ratas expuestas a NaF con dosis de 25 mg/kg durante 28 días a ratas (89). También Öncü y cols., 2007, observaron una disminución severa de la espermatogénesis, así como, una degeneración generalizada de las células espermáticas en el epitelio seminífero después de administrar a ratas Wistar, 30 mg/kg de NaF durante 120 días (189), igualmente Wei y cols, 2016, observaron la interrupción de la espermatogénesis, con presencia de vacuolas y descamación después de exponer a ratas Wistar a 25, 50 y 50 mg/L de NaF durante 180 días (95). Por otra parte Ghosh y cols., 2002, observaron una disminución de los espermatozoides en el lumen y dilatación de los túbulos seminíferos de ratas expuestas a 20 mg/kg de NaF durante 29 días (188). Por su parte la obesidad se asocia con los cambios morfológicos testiculares al disminuir las concentraciones de testosterona y aumentar las concentraciones de estradiol por la acumulación excesiva de grasa (120,121,128) Estos cambios de testosterona y estradiol pueden ser consecuencia de la elevación de las concentraciones de la enzima aromatasa, responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos los cuales si se elevan las concentraciones tiene un efecto negativo en el hipotálamo, ya que regulan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que cuando disminuye, tienen como consecuencia la disminución de las hormonas LH y FSH reduciendo la producción de testosterona y espermatozoides (120), tal y como lo observó por Jia y cols., 2018, que al administrar una dieta con 10% de manteca, 10% de sacarosa, 1.5% de colesterol, 0.5% de sales biliares y 5% de yema de huevo en polvo durante 112 días en ratas Wistar, presentaron vacuolización de los túbulos seminíferos, además de desorganización de células espermáticas (164), de igual manera Ghosh y cols, 2018, observaron que el daño ocasionado por la dieta hipelipídica es dependiente del tiempo de exposición, ocasionando una desorganización de las células espermáticas en el epitelio seminífero, atrofia y vacuolización de los túbulos seminíferos, así como del espacio intersticial, después de administrad una dieta con 65% de lípidos a ratones a Swiss albinos durante 30, 90 y 150 días (175) Mu y cols., observaron alteraciones en la espermatogénesis, con presencia de túbulos seminíferos atrofiados y un mayor número de vacuolas en ratones alimentados con DHL después de 8 semanas de alimentación, esto por la disminución de la testosterona, FSH y LT (190); por lo que se puede

comprobar que tanto el NaF como las dietas hiperlipídicas tienen efecto sinérgico al generar cambios en la espermatogénesis por la generación de estrés oxidativo y la disminución de hormonas sexuales.

## 9 CONCLUSIONES

La dieta con el 50% de kilocalorías de lípidos durante 90 días de exposición aumenta el peso corporal, el índice de adiposidad y los triglicéridos séricos, sin embargo la co-exposición de la DHL con fluoruro disminuye la ganancia de peso y el contenido de grasa epididimal y retroperitoneal, aunque mantiene el incremento del índice de adiposidad.

También, la co-exposición a DHL y fluoruro, aumenta la motilidad espermática, disminuye la viabilidad y la concentración espermática, además de incrementar el daño a la membrana plasmática del espermatozoide.

A su vez, la co-exposición a dietas hiperlipídicas y fluoruro genera estrés oxidativo al disminuir la actividad antioxidante total y los niveles de GSH, así como la actividad de GPx y genera daño oxidativo al aumentar las concentraciones de MDA y de proteínas carboniladas, y genera cambios en la espermatogénesis ocasionando moderada desorganización de las células germinales, descamación, edema intersticial, vacuolización de túbulos seminíferos y arresto de la espermatogénesis.

## 10 REFERENCIAS

1. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry). Toxicological profile of fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. US Public Heal Serv Agency Toxic Subst Dis Regist. 2003;9(September).
2. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana: NOM-013-SSA2-2014 Para la prevención y control de enfermedades bucales. 2014.
3. Gómez Soler S. Fundamentos de la actuación preventiva y terapéutica del flúor. In: Cuenca Sala E, Baca García P, editors. Odontología preventiva y comunitaria Principios, métodos y aplicaciones. 4<sup>o</sup> Edición. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2013. p. 131–45.
4. Doull J, Boekelheide K, Farishian BG, Isaacson RL, Klotz JB, Kumar J V., et al. Fluoride in drinking water: A Scientific Review of EPA's standards. Washington DC, United States of America: National Research Council; 2006.
5. Armienta MA, Segovia N. Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. Environ Geochem Health. 2008;30(4):345–53.
6. Secretaría de Salud. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana, PROY NOM-250-SSA1-2014, Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua y requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados, su control. 2014.
7. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. 2015.
8. Esteller M V., Rodríguez R, Cardona A, Padilla-Sánchez L. Evaluation of hydrochemical changes due to intensive aquifer exploitation: Case studies from Mexico. Environ Monit Assess. 2012;184(9):5725–41.
9. Del Razo LM, Corona JC, García-Vargas G, Albores A, Cebrián ME. Fluoride levels in well-water from a chronic arsenicism area of Northern Mexico. Environ Pollut.

1993;80(1):91–4.

10. González-Horta C, Ballinas-Casarrubias L, Sánchez-Ramírez B, Ishida MC, Barrera-Hernández A, Gutiérrez-Torres D, et al. A concurrent exposure to arsenic and fluoride from drinking water in Chihuahua, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(5):4587–601.
11. Cabrera Cruz RBE, Gordillo Martínez AJ, Cerón Beltrán Á. Inventario de contaminación emitida a suelo, agua y aire en 14 municipios del estado de Hidalgo, México. *Rev Int Contam Ambient*. 2003;19(4):171–81.
12. De la Cruz Cardoso D, Castillo Chaires I, Arteaga Mejía M, Cervantes Sandoval A, Pinelo Bolaños P. Análisis de la concentración de fluoruro en aguas embotelladas de diferentes entidades federativas de la República Mexicana. *Rev ADM*. 2013;70(2):81–90.
13. Ranjan R, Ranjan A. Toxic Effects. In: *Fluoride toxicity in animals*. SpringerBriefs in Animal Sciences; 2015. p. 35–51.
14. Melo V, Cuamatzi O. Minerales. In: *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2º Edición. México: Editorial Reverté; 2007. p. 364–5.
15. Rivas Gutierrez J, Huerta Vega L. Fluorosis dental : metabolismo, distribución y absorción del fluoruro. *Adm*. 2005;62(6):225–9.
16. Buzalaf MAR, Whitford GM. Fluoride Metabolism. In: *Fluoride and the Oral Environment*. 2011. p. 20–36.
17. Pardo López B, Villafranca F de C, Fernández Mondragón MP, García Suárez Á, Cobo Plana M. Higiene Bucodental. In: *Manual del técnico superior en higiene bucodental*. Sevilla, España: Editorial MAD; 2005. p. 194–200.
18. Collins TFX, Sprando RL, Black TN, Shackelford ME, Bryant MA, Olejnik N, et al. Multigenerational evaluation of sodium fluoride in rats. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(6):601–13.
19. Messer HH. Fluorine. In: Frieden E, editor. *Biochemistry of Essential Ultratrace*

- Elements. Florida, United States of America: Plenum Press; 1984. p. 55–88.
20. Adamek E, Pawłowska-Góral K, Bober K. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin*. 2005;51(2):69–85.
  21. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):319–33.
  22. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res*. 2009;88(5):461–5.
  23. Zhang Y, Li W, Chi HS, Chen J, DenBesten PK. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol*. 2007;26(8):633–41.
  24. Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF- $\kappa$ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*. 2008;179(1):1–5.
  25. Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, Del Razo LM. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;230(3):352–7.
  26. García-Montalvo EA, Reyes-Pérez H, Del Razo LM. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*. 2009;263(2–3):75–83.
  27. Şireli M, Bülbül A. The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the guinea pig. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2004;28(3):591–5.
  28. Liu G, Chai C, Cui L. Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;13(3):199–204.
  29. Hassan HA, Yousef MI. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(9):2332–7.

30. Niu Q, Chen J, Xia T, Li P, Zhou G, Xu C, et al. Excessive ER stress and the resulting autophagic flux dysfunction contribute to fluoride-induced neurotoxicity. *Environ Pollut.* 2018;233:889–99.
31. Notas médicas de la OMS. Obesidad y Sobrepeso. *Notas Médicas.* 2016.
32. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana: NOM-008-SSA3-2010. Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. *Diario Oficial de la Federación.* 2010.
33. Ayela Pastor MRT. Obesidad: Problemas y soluciones. España: Editorial EDUCA; 2009. 13-18 p.
34. Cañete Estrada R, Gil Campos M, Moya Benavent M. Diagnóstico, Prevención y Tratamiento de la obesidad infantil. In: Gil Hernández Á, editor. *Tratado de Nutrición Nutrición clínica.* 2º Edición. Madrid, España: Editorial Panamericana; 2010. p. 388–417.
35. Mataix Verdú J. Valoración del Estado Nutricional. In: Mataix Verdú J, Carazo Marín E, editors. *Nutrición para Educadores.* 2º. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos y Fundación Universitaria Iberoamericana; 2005. p. 591–613.
36. Marques-Lopez I, Russolillo G, Martínez JA. Valoración de Estado Nutricio. In: Astiasarán Anchia I, Aldaz Lasheras B, Ariño Plana AH, Martínez Hernández JA, editors. *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria.* Madrid, España: Editorial Díaz de Santos; 2003. p. 455–73.
37. Benito Trejo A. Evaluación del estado de nutrición. In: Pérez-Lizaur AB, García-Campos M, editors. *Dietas normales y terapéuticas: los alimentos en la salud y la enfermedad.* 6º. México: Editorial McGraw Hill Education; 2014. p. 81–102.
38. Vio F, Albala C. Obesidad y colesterol. In: Albala C, Kain J, Burrows R, Díaz E, editors. *Obesidad: un desafío pendiente.* Santiago de Chile: Editorial Universitaria; 2000. p. 36.
39. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana: NOM-037-SSA2-2012. Prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. 2012.

40. Anderson TJ, Mancini GBJ, Genest J, Grégoire J, Lonn EM, Hegele RA. The New Dyslipidemia Guidelines: What Is the Debate? *Can J Cardiol.* 2015;31(5):605–12.
41. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(10):423–44.
42. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am.* 2018 Jan;102(1):13–33.
43. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016;148:183–93.
44. McMurray F, Patten DA, Harper M-E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity.* 2016;24(11):2301–10.
45. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences.* 2013. p. 10497–538.
46. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(3):269–84.
47. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: Molecular mechanisms. Vol. 1, *Cardiovascular Diabetology.* 2002.
48. Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(2):168–78.
49. Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, Marciniak A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol.* 2000;51(4 Pt 2):883–96.
50. Ortega RM, Rodríguez-Rodríguez E, Aparicio A, Jiménez-Ortega AI, Palmeros C, Perea JM, et al. Young children with excess of weight show an impaired selenium status. *Int J Vitam Nutr Res.* 2012;82(2):121–9.

51. Strauss RS. Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). National Health and Nutrition Examination Survey. *J Pediatr.* 1999;134(2):160–5.
52. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(8):590–7.
53. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Vol. 12, *International Journal of Molecular Sciences.* 2011. p. 3117–32.
54. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Chang LS, Viswanathan P, Mohanty P, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-KB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4476–9.
55. Martínez J a. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem.* 2006;62(4):303–6.
56. Khan NI, Naz L, Yasmeen G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pakistan J Pharm Sci.* 2006;19(1):62–5.
57. Jung R. Obesity as a disease. *Br Med Bull.* 1997;53(2):307–21.
58. Pi-Sunyer FX. Health implications of obesity. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(6 Suppl):1595S–1603S.
59. Suárez Román G, Perera Calderín A, Clapés Hernández S, Fernández Romero T, Egaña Morales E. Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. *MediSur.* 2013;11(5):569–73.
60. Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, et al. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(5):479–86.

61. Junior S a, Padovani CR, Rodrigues S a, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, et al. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):65.
62. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca<sup>2+</sup> handling. *Brazilian J Med Biol Res*. 2008;41(7):615–20.
63. Hernández Ávila M, Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Cuevas Nasu L, Gómez Acosta LM, Gaona Pineda EB, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016. Cuernavaca, México; 2016.
64. OM-C Institución de Salud. Obesidad y Dislipidemia. 2016.
65. Gutiérrez J, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México; 2012.
66. Barone LR. Reproducción Masculina. In: Barone LR, editor. *Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano*. Buenos Aires, Argentina: Grupo Clasa; 2004. p. 163–8.
67. A. Castells Golorons, García JA. Órganos Sexuales. In: Golorons AC, García JA, editors. *Manual Práctico de Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano*. Barcelona, España: Ediciones CEDEL; 1992. p. 155–84.
68. Ross MH, Pawlina W. Sistema Genital Masculino. In: Ross MH, Pawlina W, editors. *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 6° Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2012. p. 784–807.
69. Sadler TW, Langman J. Gametogénesis: conversión de las células germinales en gametos masculinos y femeninos. In: Sadler TW, Langman J, editors. *Embriología médica: con orientación clínica*. 10th ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2008. p. 24–30.
70. Badajoz V, Delgado JA, Bajo JM. Factor masculino. Estudio del varón estéril. In: Milán Pérez F, Bruna Catalán I, editors. *Fundamentos de Reproducción*. Madrid,

España: Editorial Panamericana; 2009. p. 57–66.

71. Betancourt Rule M, Edmundo BG, Casas Hernández E, Ducolomb Ramírez Y. Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. In: Jiménez LF, Merchant H, editors. *Biología celular y molecular*. México: Editorial Pearson; 2003. p. 679–711.
72. Hernández ER, Nieto M, Gómez-Palomares JL. Fecundación e implantación embrionaria. In: Milán Pérez F, Bruna Catalán I, editors. *Fundamentos de Reproducción*. Madrid, España: Editorial Panamericana; 2009. p. 36–40.
73. Perumal E, Paul V, Govindarajan V, Panneerselvam L. A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol Lett*. 2013;223(2):236–51.
74. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Asenuga ER, Adejumobi AO, Ajibade TO, Ige TM, et al. Sodium fluoride induces hypertension and cardiac complications through generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappa beta. *Environ Toxicol*. 2017;32(4).
75. Ma Y, Ma Z, Yin S, Yan X, Wang J. Arsenic and fluoride induce apoptosis, inflammation and oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chemosphere*. 2017;167:454–61.
76. Basha PM, Madhusudhan N. Pre and post natal exposure of fluoride induced oxidative macromolecular alterations in developing central nervous system of rat and amelioration by antioxidants. *Neurochem Res*. 2010;35(7):1017–28.
77. Chen R, Zhao LD, Liu H, Li HH, Ren C, Zhang P, et al. Fluoride Induces Neuroinflammation and Alters Wnt Signaling Pathway in BV2 Microglial Cells. *Inflammation*. 2017;40(4):1123–30.
78. Niu R, Han H, Zhang Y, Wang J, Zhang J, Yin W, et al. Changes in Liver Antioxidant Status of Offspring Mice Induced by Maternal Fluoride Exposure During Gestation and Lactation. *Biol Trace Elem Res*. 2016;172(1):172–8.
79. Bouaziz H, Croute F, Boudawara T, Soleilhavoup JP, Zeghal N. Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Exp Toxicol Pathol*. 2007;58(5):339–49.

80. Bharti VK, Srivastava RS, Kumar H, Bag S, Majumdar AC, Singh G, et al. Effects of melatonin and epiphyseal proteins on fluoride-induced adverse changes in antioxidant status of heart, liver, and kidney of rats. *Adv Pharmacol Sci.* 2014;2014.
81. Lu Y, Luo Q, Cui H, Deng H, Kuang P, Liu H, et al. Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Aging (Albany NY).* 2017;9(6):1623–39.
82. Song C, Fu B, Zhang J, Zhao J, Yuan M, Peng W, et al. Sodium fluoride induces nephrotoxicity via oxidative stress-regulated mitochondrial SIRT3 signaling pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1).
83. Banji D, Banji OJF, Pratusha NG, Annamalai AR. Investigation on the role of *Spirulina platensis* in ameliorating behavioural changes, thyroid dysfunction and oxidative stress in offspring of pregnant rats exposed to fluoride. *Food Chem.* 2013;140(1–2):321–31.
84. Adedara IA, Olabiyi BF, Ojuade TD, Idris UF, Onibiyo EM, Farombi EO. Taurine reverses sodium fluoride-mediated increase in inflammation, caspase-3 activity and oxidative damage along the brain-pituitary-gonadal axis in male rats. *CanJPhysiol Pharmacol.* 2017;(1205–7541 (Electronic)).
85. Long H, Jin Y, Lin M, Sun Y, Zhang L, Clinch C. Fluoride toxicity in the male reproductive system. Vol. 42, *Fluoride.* 2009. p. 260–76.
86. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008;14(3):243–58.
87. Zhang S, Jiang C, Liu H, Guan Z, Zeng Q, Zhang C, et al. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;271(2):206–15.
88. Das (Sarkar) S, Maiti R, Ghosh D. Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat. *Reprod Toxicol.* 2006;22(4):606–12.
89. Thangapandiyan S, Miltonprabu S, Thangapandiyan S. Epigallocatechin gallate potentially attenuates Fluoride induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and

- dyslipidemia in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;29:321–35.
90. Sun Z, Li S, Guo Z, Li R, Wang J, Niu R, et al. Effects of Fluoride on SOD and CAT in Testis and Epididymis of Mice. *Biological Trace Element Research.* 2017;1–6.
  91. Feng D, Huang H, Yang Y, Yan T, Jin Y, Cheng X, et al. Ameliorative effects of N-acetylcysteine on fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in male rats' testis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015;792:35–45.
  92. Sun Z, Niu R, Wang B, Jiao Z, Wang J, Zhang J, et al. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo. *Arch Toxicol.* 2011 Nov;85(11):1441–52.
  93. Das S, Maiti R, Ghosh D. Induction of oxidative stress on reproductive and metabolic organs in sodium fluoride-treated male albino rats: protective effect of testosterone and vitamin e coadministration. *Toxicol Mech Methods.* 2005;15(4):271–7.
  94. Sun Z, Li S, Yu Y, Chen H, Ommati MM, Manthari RK, et al. Alterations in epididymal proteomics and antioxidant activity of mice exposed to fluoride. *Archives of Toxicology.* 2017;1–12.
  95. Wei R, Luo G, Sun Z, Wang S, Wang J. Chronic fluoride exposure-induced testicular toxicity is associated with inflammatory response in mice. *Chemosphere.* 2016;153:419–25.
  96. Dvořáková-Hortová K, Šandera M, Jursová M, Vašinová J, Pěkníková J. The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Anim Reprod Sci.* 2008;108(1–2):157–70.
  97. Cao J, Chen Y, Chen J, Yan H, Li M, Wang J. Fluoride exposure changed the structure and the expressions of Y chromosome related genes in testes of mice. *Chemosphere.* 2016;161:292–9.
  98. Gupta RS, Khan TI, Agrawal D, Kachhawa JBS. The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats. *Toxicol Ind Health.* 2007;23(9):507–13.
  99. Zhang J, Zhang Y, Liang C, Wang N, Zheng H, Wang J. Choline supplementation alleviates fluoride-induced testicular toxicity by restoring the NGF and MEK

- expression in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;310:205–14.
100. Zhang S, Niu Q, Gao H, Ma R, Lei R, Zhang C, et al. Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride. *Environ Pollut*. 2016;212:97–104.
  101. Sun Z, Zhang W, Li S, Xue X, Niu R, Shi L, et al. Altered miRNAs expression profiling in sperm of mice induced by fluoride. *Chemosphere*. 2016;155:109–14.
  102. Sun Z, Niu R, Su K, Wang B, Wang J, Zhang J, et al. Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in sperm from mice: An in vivo study. *Arch Toxicol*. 2010;84(5):353–61.
  103. Kim J, Kwon W-S, Rahman MS, Lee J-S, Yoon S-J, Park Y-J, et al. Effect of sodium fluoride on male fertility. *Andrology*. 2015;
  104. Sun Z, Niu R, Wang B, Wang J. Altered sperm chromatin structure in mice exposed to sodium fluoride through drinking water. *Environ Toxicol*. 2012;
  105. Sm S, Mahaboob Basha P. Fluoride Exposure Aggravates the Testicular Damage and Sperm Quality in Diabetic Mice: Protective Role of Ginseng and Banaba. *Biol Trace Elem Res*. 2017;177(2):331–44.
  106. Zhao Y, Zhao J, Wang J, Wang J. Fluoride exposure changed the structure and the expressions of HSP related genes in testes of pubertal rats. *Chemosphere*. 2017;184:1080–8.
  107. Sun Z, Xue X, Zhang Y, Niu R, Wang J. Effect of sodium fluoride on the sperm mitochondrial DNA in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;492(3):295–9.
  108. Zhang J, Li Z, Qie M, Zheng R, Shetty J, Wang J. Sodium fluoride and sulfur dioxide affected male reproduction by disturbing blood-testis barrier in mice. *Food Chem Toxicol*. 2016;94:103–11.
  109. Lu Z, Wang S, Sun Z, Niu R, Wang J. In vivo influence of sodium fluoride on sperm chemotaxis in male mice. *Arch Toxicol*. 2014;88(2):533–9.
  110. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress

markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2011;3:17.

111. Mahmoudi M, Charradi K, Limam F, Aouani E. Grape seed and skin extract as an adjunct to xenical therapy reduces obesity, brain lipotoxicity and oxidative stress in high fat diet fed rats. *Obesity Research and Clinical Practice.* 2016;
112. Santos M, Rodríguez-González GL, Ibáñez C, Vega CC, Nathanielsz PW, Zambrano E. Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2015;308(41):R219–25.
113. Zhao J, Zhai L, Liu Z, Wu S, Xu L. Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014.
114. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 2011;34(5 PART 1):402–10.
115. Omu AE. Sperm parameters: Paradigmatic index of good health and longevity. Vol. 22, *Medical Principles and Practice.* 2013. p. 30–42.
116. Ferramosca A, Moscatelli N, Di Giacomo M, Zara V. Dietary fatty acids influence sperm quality and function. *Andrology.* 2017;5(3):423–30.
117. Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, et al. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes.* 2015;39(4):549–56.
118. Gujjala S, Putakala M, Gangarapu V, Nukala S, Bellamkonda R, Ramaswamy R, et al. Protective effect of *Caralluma fimbriata* against high-fat diet induced testicular oxidative stress in rats. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:167–76.
119. Chen XL, Gong LZ, Xu JX. Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. *Animal.* 2013;7(2):287–92.

120. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS One*. 2015;10(4).
121. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Actas Urol españolas*. 2012;36(3):153–9.
122. Palmer NO, Bakos HW, Owens J a, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high fat diet improves metabolic health and reverses perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;5005:768–80.
123. Borges BC, Garcia-Galiano D, da Silveira Cruz-Machado S, Han X, Gavrilina GB, Saunders TL, et al. Obesity-Induced Infertility in Male Mice Is Associated With Disruption of Crisp4 Expression and Sperm Fertilization Capacity. *Endocrinology*. 2017;158(9):2930–43.
124. Zhao JL, Zhao YY, Zhu WJ. A high-fat, high-protein diet attenuates the negative impact of casein-induced chronic inflammation on testicular steroidogenesis and sperm parameters in adult mice. *Gen Comp Endocrinol*. 2017;252:48–59.
125. Cui X, Long C, Zhu J, Tian J. Protective Effects of Fluvastatin on Reproductive Function in Obese Male Rats Induced by High-Fat Diet through Enhanced Signaling of mTOR. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(2):598–608.
126. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):253–63.
127. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod*. 2010;82(1):96–104.
128. Zhang E, Xu F, Liang H, Yan J, Xu H, Li Z, et al. GLP-1 Receptor Agonist Exenatide Attenuates the Detrimental Effects of Obesity on Inflammatory Profile in Testis and Sperm Quality in Mice. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(5):457–66.
129. Liu H, Liu X, Wang L, Sheng N. Brown adipose tissue transplantation ameliorates

- male fertility impairment caused by diet-induced obesity. *Obesity Research and Clinical Practice*. 2016;
130. Ferramosca A, Conte A, Moscatelli N, Zara V. A high-fat diet negatively affects rat sperm mitochondrial respiration. *Andrology*. 2016;4(3):520–5.
  131. Duale N, Steffensen IL, Andersen J, Brevik A, Brunborg G, Lindeman B. Impaired sperm chromatin integrity in obese mice. *Andrology*. 2014;2(2):234–43.
  132. Rosas MR. Infertilidad masculina: Causas, Diagnóstico y Tratamiento. *Ámbito Farm*. 2007;26(7):70–5.
  133. American Society for reproductive medicine. *Edad y Fertilidad: Guía Para Pacientes*. 2013.
  134. Campos DHS De, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF Do, Oliveira-Junior SA De, Silva DCT Da, et al. Obesity Preserves Myocardial Function During Blockade of the Glycolytic Pathway. *Arq Bras Cardiol*. 2014;17–21.
  135. Gu H, Liu L, Ma S, Liu Y, Ren Y, Zhai L, et al. Inhibition of SOCS-3 in adipocytes of rats with diet-induced obesity increases leptin-mediated fatty acid oxidation. *Endocrine*. 2009;36(3):546–54.
  136. Wang C-Y, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421–33.
  137. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Guizoni DM, Campos DHS, Fernandes T, Oliveira EM, et al. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014;9(1).
  138. Naito HK. Cholesterol. Kaplan A et al., editor. Toronto; 1984. 1194-11206 and 437 p.
  139. Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem*. 1978;24(12):2161–5.
  140. Buccolo G, David H. Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes. *Clin Chem*. 1973;19(5):476–82.

141. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982;28(10):2077–80.
142. Kaplan A et al. Tryglycerides. In: *Clin Chem The CV Mosby Co St Louis*. Toronto; p. 437 and Lipids 1194-120.
143. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5° Edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
144. Jeyendran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. 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.
145. Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, et al. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;102(1):53–6.
146. Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cuba Med Milit*. 2000;29:192–8.
147. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158–69.
148. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61(5):882–8.
149. Quintanar Escorza MA, Calderón Salinas JV. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Rev Educ Bioquímica*. 2009;28(3):89–101.
150. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25–30.
151. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52(C):302–10.
152. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol*.

- 1990;186(C):464–78.
153. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
  154. Thermo Fisher Scientific Inc. User Guide: Fluoride Ion Selective Electrode. 2011.
  155. Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun L. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Argentina; 2016.
  156. Johnsen SG. Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm Res Paediatr*. 1970;1(1):2–25.
  157. Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(4):E875-85.
  158. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli ELB, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res*. 2008;41(3):253–9.
  159. Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol y Nutr*. 2014;61(2):100–12.
  160. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783–7.
  161. Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P, et al. Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance. *Cell Metab*. 2014;20(6):1049–58.
  162. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013;19(10):1338–44.
  163. Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):376–85.

164. Jia Y-F, Feng Q, Ge Z-Y, Guo Y, Zhou F, Zhang K-S, et al. Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urol.* 2018;18(1):42.
165. Levin BE. Arcuate NPY neurons and energy homeostasis in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 1999;276(2):R382–7.
166. Binder NK, Hannan NJ, Gardner DK. Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health. *PLoS One.* 2012;7(12).
167. Dionizio A, Pereira HABS, Araujo TT, Sabino-Arias IT, Fernandes MS, Oliveira KA, et al. Effect of Duration of Exposure to Fluoride and Type of Diet on Lipid Parameters and De Novo Lipogenesis. *Biol Trace Elem Res.* 2018;
168. Miller RF, Phillips PH. The Enhancement of the Toxicity of Sodium Fluoride in the Rat by High Dietary Fat. *J Nutr.* 1955;56(4):447–54.
169. Buttner W, Muhler JC. The Retention of Fluoride by the Skeleton, Liver, Heart and Kidney as a Function of Dietary Fat Intake in the Rat. *J Nutr.* 1958;65(2):259–66.
170. Y Chiba F, Garbin CA, Mattera MSMS, Mota MS, Pereira RF, Sumida DH, et al. Chronic treatment with NaF promotes dyslipidemia in rats. 2015 p. 205.
171. la Fleur SE, van Rozen AJ, Luijendijk MCM, Groeneweg F, Adan RAH. A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. *Int J Obes.* 2010;34(3):537–46.
172. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *J Nutr.* 2003;133(4):1081–7.
173. Pereira HAB da S, Leite A de L, Charone S, Lobo JGVM, Cestari TM, Peres-Buzalaf C, et al. Proteomic Analysis of Liver in Rats Chronically Exposed to Fluoride. *PLoS One.* 2013;8(9):e75343.
174. Chavarro JE, Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, Cutillas-Tolín A, López-Espín JJ, Torres-Cantero AM. Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. *Hum Reprod.* 2014;29(3):429–40.

175. Ghosh S, Mukherjee S. Testicular germ cell apoptosis and sperm defects in mice upon long-term high fat diet feeding. *J Cell Physiol*. 2018;
176. Frączek M, Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa.
177. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;250(1–2):70–9.
178. Foresta C, Garolla A, Cosci I, Menegazzo M, Ferigo M, Gandin V, et al. Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1134–45.
179. Krasowska A. Zinc protection from fluoride-induced testicular injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Toxicol Lett*. 2004;147(3):229–35.
180. Bakker SJL, Ijzerman RG, Teerlink T, Westerhoff H V., Gans ROB, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: The missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and  $\beta$ -cell failure? Vol. 148, *Atherosclerosis*. 2000. p. 17–21.
181. Furukawa S, Fujita T, Shumabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Makajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752–61.
182. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Vol. 30, *International Journal of Obesity*. 2006. p. 400–18.
183. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes*. 2002;26(9):1159–64.
184. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem*. 2002;35(8):627–31.
185. Umarani V, Muvvala S, Ramesh A, Lakshmi BVS, Sravanthi N. Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity

and dyslipidemia in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(2):143–9.

186. Sun L, Gao Y, Zhang W, Liu H, Sun D. Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(3):1000–6.
187. Birkner E, Grucka-Mamczar E, Stawiarska-Pięta B, Birkner K, Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk S, et al. The Influence of Rich-in-Cholesterol Diet and Fluoride Ions Contained in Potable Water Upon the Concentration of Malondialdehyde and the Activity of Selected Antioxidative Enzymes in Rabbit Liver. *Biol Trace Elem Res*. 2009;129(1–3):137–42.
188. Ghosh D, Das S, Maiti R, Jana D, Das UB. Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 2002;16:385–90.
189. Öncü M, Kocak A, Karaoz E, Darici H, Savik E, Gultekin F. Effect of long-term fluoride exposure on lipid peroxidation and histology of testes in first- and second-generation rats. *Biol Trace Elem Res*. 2007;118(3):260–8.
190. Mu Y, Yan W-J, Yin T-L, Zhang Y, Li J, Yang J. Diet-induced obesity impairs spermatogenesis: a potential role for autophagy. *Sci Rep*. 2017;7:43475.

## 11 ANEXOS

### 11.1 Reactivos

Reactivos	Número de Catálogo
Colesterol Total Sprinreact® 41021	R: 41021R
	Cal: 1002320
HDLc-P Sprinreact® 1001095	R:1001095
	Cal HDLc/LDLc: 33901
Tg Sprinreact® 1001311	R: 1001311
	Cal: 1002328 5 mL
Fluoruro de sodio polvo	Reactivos Meyer 2395-100g
TISAB II solution	Sigma-Aldrich® 89466-500mL
NaCl 0.9% estéril	Solución CS PISA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich® T9284-500mL
Solución azul de tripano 0.4%	Sigma® T8154-100mL
D-(—)-Fructosa	Sigma® F2543-500G
Citrato de sodio tribásico dihidratado	Sigma-Aldrich® S4641-500G
Formaldehído 37%	Merk® 15858
Cloruro de sodio cristal	J.T.Baker® 3624-01
Fosfato de sodio dibásico, 8-hidrato cristal	J.T.Baker® 3824-01
Cloruro de potasio cristal	J.T.Baker® 3040-01
Fosfato de sodio monobásico cristal	J.T.Baker® 3246-01
TBA( 2-Thiobarbituric Acid)	J.T.Baker® V774-05
Ácido Tricloroacético	Fermont 03702
Ácido clorhídrico	Reactivos Analíticos A1500
Sulfato de estreptomina	Fluka® 85884
5,5'-Ditiobis(ácido-2-nitrobenzoico)	Sigma® D8130-5G
Acetato de etilo anhidro 99.8%	Sigma-Aldrich® 270989-1L
Etanol	Sigma-Aldrich® 459836-1L
Lauril sulfato SDS 95%	Sigma® L-5750

Ensayo de Proteína Bio-Rad DC	Reactivo A: Solución de tartrato de cobre alcalino
	Reactivo B: Reactivo Folin
L- Glutati3n reducido	Sigma-Aldrich® G4251-10G
5,5'-Dithiobis(3cido 2-nitrobenzoico) (DTNB) ≥98%	Sigma® D8130
EDTA (3cido etilenodiaminatetraacetic)3	Sigma-Aldrich® EDS-100G
Trisma® base BioXtra pH10.5-12.0 (1M en H <sub>2</sub> O) ≥99.9%	Sigma® T6791-100G
GPx RANSEL (RS 505) Randox®	R1a
	R1b Tamp3n
	R2 Hidroper3xido de cumeno
2,2-Difenil-1-picrilhidrazil	Aldrich® D9132-1G
Metanol	J.T.Baker® 9093-02
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)	Sigma-Aldrich® 238813
Antioxidantes totales Sigma-Aldrich CS0790	Buffer de ensayo 10X: Sigma-Aldrich® A3605
	Soluci3n de paro: Sigma-Aldrich® S3446
Mioglobina de coraz3n de caballo	Sigma-Aldrich® M1882
ABTS, 10 mg	Sigma-Aldrich® A9941
Buffer Fosfato-Citrato	Sigma-Aldrich® P4809
Per3xido de hid3geno 3%	Sigma-Aldrich® 323381

## 11.2 Preparaci3n de alimento

Para preparar 1 kg de alimento con 50% de kcal de grasa:

Moler alimento est3ndar (LabChows™ 5008, PMI Nutrition Institutional, Brentwood MO)

Pesar 730 gramos de alimento estándar

Pesar 200 gramos de manteca de cerdo

Pesar 100.9 gramos de clara de huevo

Mezclar y agregar 350 mL de agua desionizada

Hornear durante 20 minutos a 180 °C por lado



### 11.3 Preparación de soluciones

#### A. Flúor

Secar el NaF en horno a 110 °C durante 2 horas.

Solución Stock:

Pesar 0.2210 g de NaF seco

Disolverlos en 100 mL de agua desionizada.

Solución de NaF 50 ppm:

Tomar 5 mL de la solución Stock

Aforarlo a 100 mL con agua desionizada.

#### B. Solución NaCl 0.9%

Para preparar 250 mL de la solución:

Pesar 2.25 g de NaCl

Agregar agua desionizada y llevar a agitación hasta disolver

Aforar a 250 mL

Se conserva a temperatura ambiente

### **C. Tritón 0.1%**

Para preparar 100 mL de solución:

Tomar 0.1 mL de Triton X-100

Disolver en 100 mL de PBS 1X

### **D. Solución hipoosmótica**

Para preparar 100 mL:

Pesar 0.735 g de citrato de sodio hidratado

Pesar 1.35 g de fructosa

Agregar agua desionizada, agitar hasta disolver

Aforar a 100 mL

Se conserva en congelación

### **E. Solución formaldehído 10% (formol buffereado al 10%)**

Para preparar 500 mL:

Pesar 2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

Pesar 3.25 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Agregar agua desionizada, agitar hasta disolver

Mezclar ambas soluciones

Agregar 50 mL de formaldehído en solución 37%

Aforar a 500 mL

Reposar por 24 horas

Ajustar pH a 6.8

Se conserva a temperatura ambiente

### **F. Solución PBS 10X**

Para preparar 500 mL:

Pesar 40 g de NaCl

Pesar 1 g de KCl  
Pesar 7.2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Pesar 1.2 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver  
Primero se agrega el NaCl y después el resto de las soluciones  
Aforar a 500 mL  
Ajustar a pH 7.4

Para preparar PBS 1X:

Tomar 100 mL de la solución PBS 10X  
Aforar a 1000 mL

#### **G. Solución TBA**

Para preparar 10 mL:

Pesar 0.05 g de TBA  
Pesar 1.6 g de TCA  
200 µL de HCl concentrado

Se debe preparar al instante

Cuidar el volumen del TCA

#### **H. Sulfato de estreptomicina 10 % p/v**

Para preparar 100 mL:

Pesar 10 g de sulfato de estreptomicina  
Disolver  
Aforar a 100 mL

#### **I. Dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM)**

Para preparar 100 mL:

Pesar 0.19814 g de DNPH  
Agregar HCl 2.5 M y agitar hasta disolver  
Aforar a 100 mL

**J. HCl 2.5 M**

Para preparar 100 mL de solución:

Tomar 21.097 mL de HCl al 36.5%

Aforar a 100 mL

**K. Ácido tricloroacético (TCA 20%)**

Para preparar 100 mL:

Pesar 20 g de TCA

Disolver

Aforar a 100 mL

**L. SDS 6%**

Para preparar 100 mL de solución

Pesar 6 g de SDS

Aforar a 100 mL

**M. EDTA 0.015 M pH 7.4**

Para preparar 500 mL

Pesar 2.8 g de EDTA (sal disódica)

Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver

Aforar a 500 mL

**N. TCA 50%**

Para preparar 10 mL

Pesar 5 g de TCA

Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver

Aforar a 10 mL

**O. Tris 0.4 M pH 8.9**

Para preparar 250 mL

Pesar 15.8 g de Tris

Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver

Aforar a 250 ml

**P. DTNB 0.63 M**

Para preparar 2.5 mL

Pesar 10 mg de Reactivo de Ellman (DTNB)

Disolver en 2.5 mL de metanol absoluto

Preparar el día del experimento

**Q. Estándar de GSH en forma reducida**

Para preparar 50 mL

Pesar 4.7 mg de GSH

Agregar agua desionizada y agitar hasta disolver

Aforar a 50 ml

Preparar el día del experimento

**R. DPPH'**

Para preparar 10 mL

Pesar en tubo de 1.5 mL con aluminio 0.788 mg de DPPH'

Adicionar 1 mL de metanol puro

Pasar el contenido a un matraz aforado de 10 mL con aluminio el contenido del tubo y enjuagar hasta que el metanol salga transparente y aforar

Refrigerar (se puede utilizar hasta 1 semana después de realizarlo)