



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

TEMA:

“Efecto de la diabetes inducida con estreptozotocina sobre la capacidad reproductiva de ratones CD1⁺”

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

LUIS ÁNGEL ROJAS CRUZ

DIRECTOR: DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, JUNIO 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Luis Ángel Rojas Cruz**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"EFECTO DE LA DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA DE RATONES CD1+"**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

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

- PRESIDENTE: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún
- PRIMER VOCAL: Dra. Norma Leticia Manríquez Morán
- SEGUNDO VOCAL: Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
- TERCER VOCAL: Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
- SECRETARIO: M. en C. Mario Segura Almaraz
- PRIMER SUPLENTE: Dr. Pablo Octavio Aguilar
- SEGUNDO SUPLENTE: Biól. María del Carmen González Rodríguez

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 13 de mayo de 2015

Dra. Sylvia Martínez Hernández
Responsable de Titulaciones de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



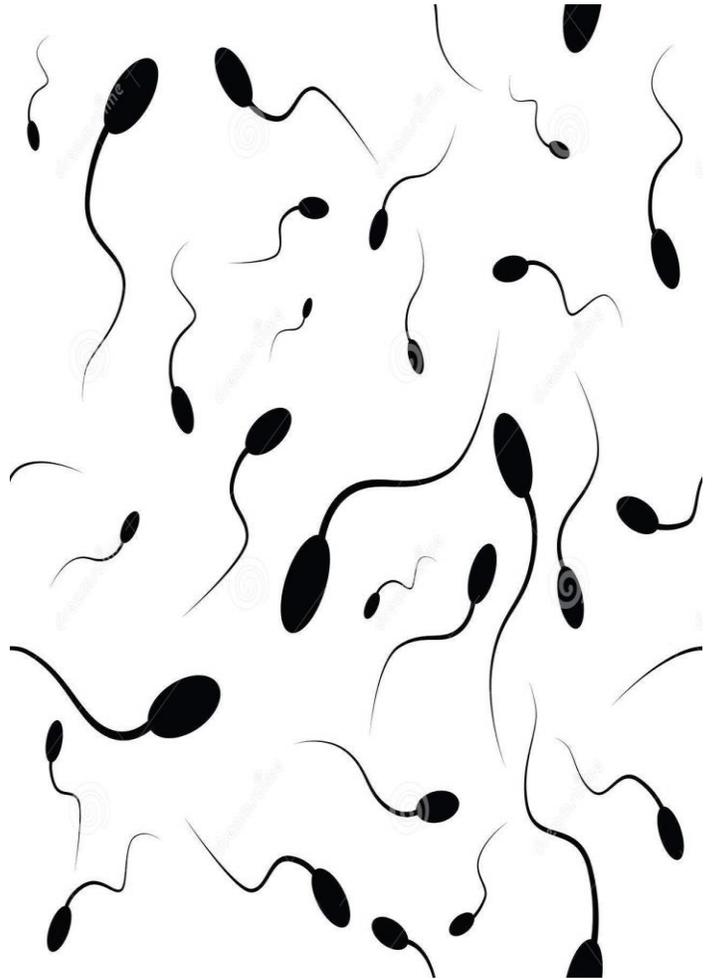
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
 Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2532, Fax 2109



Dedicatoria

Con todo mi cariño y mi amor para la persona que hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, por ser la mejor mujer, la mejor amiga y por supuesto la mejor Mamá, que día a día te esfuerzas por darme lo mejor, no tengo palabras para agradecerte todo en esta vida. Eres el motor de mi vida ¡Te amo mamá!

A la mujer más fuerte que conozco, a mi Mamá Lupita por heredarme el gusto y pasión sobre esta profesión, por sus consejos y los buenos momentos a lado suyo.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinita y sinceramente al Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez por haberme permitido elaborar este trabajo con él, por su esfuerzo, dedicación, consejos y mucha paciencia, por todo el apoyo que me brindo durante este tiempo. Sin dejar de lado que se ganó mi lealtad y respeto, de igual forma hago mención de que me siento en deuda con él por todo lo recibido durante el periodo que ha durado esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún, Dra. Norma Leticia Manríquez Morán, Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega, M.C. Mario Segura Almaraz, Dr. Pablo Octavio Aguilar y Biól. María del Carmen González Rodríguez, por sus comentarios, observaciones y tiempo para enriquecer este trabajo.

A mis tías, Patty e Isa que siempre estuvieron al pendiente de mí, brindándome su apoyo incondicional, así también agradezco a mi prima Isa, por ser parte de mi vida, por crecer y alcanzar nuestros sueños siempre juntos, gracias por tus consejos y compañía.

A mi hermana Sandra por siempre creer en mí, a mi familia en general por siempre estar.

A mis compañeras de laboratorio por su ayuda, consejos y momentos amenos que compartimos Eve, Dulce y Denisse.

A mis grandes amigos y compañeros de generación: Cinthía, Vero, Diana, Carlos, Carla, Víctor, Daniela, Anggie, Alfredo, Jazmín, Ceci, Michelle, Chabelly, Clau y Víctor Pérez, por brindarme su amistad y compartir grandes momentos con ustedes.

A ti Adri por todo el apoyo incondicional que me has dado este tiempo, por ser parte de mi vida, por tus consejos, tu compañía y grandes momentos juntos.

Índice de abreviaturas.

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

C₆H₁₂O₆: Fructuosa

C₆H₁₂O₆: Glucosa

CaCl₂: Cloruro de calcio

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DMG: Diabetes mellitus gestacional

DMID: Diabetes mellitus insulino dependiente

DMNID: Diabetes mellitus no insulino dependiente

EROS: Especies reactivas de oxígeno

FSH: Hormona folículo estimulante

GAD₆₅: Autoanticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico

GLUT 1: Transportador de glucosa 1

GLUT 2: Transportador de glucosa 2

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

HOST-test: Prueba Hipo Osmótica

IAA: Autoanticuerpos Anti-insulina

ICA: Anticuerpos Anti-células de los islotes de Langerhans

IP: Intraperitoneal

IV: Intravenoso

KCl: Cloruro de potasio

KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico

LH: Hormona luteinizante

MgSO₄: Sulfato de magnesio

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio dibásico anhidro

Na₃C₆H₅O₇: Citrato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NAD: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Solución salina amortiguadora de fosafatos

RA: Reacción acrosomal

Rpm: revoluciones por minuto

SNP: sistema nervioso periférico

STZ: Estreptozotocina

TP: Teca peri-nuclear

Índice

1.	RESUMEN	X
2.	INTRODUCCIÓN	- 1 -
2.1	Fisiopatología de la DM.....	- 3 -
2.2	Mecanismos de secreción de la insulina	- 4 -
2.3	Clasificación de la diabetes	- 6 -
2.4	Complicaciones de la diabetes	- 7 -
2.5	Reproducción	- 8 -
2.5.1	Espermatogénesis	- 8 -
2.5.2	Morfología del espermatozoide.....	- 10 -
2.5.3	Fisiología del espermatozoide.....	- 13 -
3.	ATENEDENTES	- 18 -
3.1	Diabetes experimental	- 18 -
3.2	Mecanismo de acción de STZ	- 19 -
3.3	Inducción de DM por STZ en animales.....	- 19 -
3.4	Animales de experimentación (Ratón cepa CD1 ⁺)	- 20 -
3.5	Estudios previos	- 21 -
4.	JUSTIFICACIÓN.....	- 23 -
5.	OBJETIVOS	- 24 -
5.1	Objetivo general.....	- 24 -
5.2	Objetivos particulares	- 24 -
6.	HIPÓTESIS.....	- 25 -
7.	MATERIAL.....	- 26 -
7.1	Material biológico	- 26 -
7.2	Reactivos	- 26 -
8.	MÉTODOS.....	- 27 -
8.1	Inducción de la diabetes	- 27 -
8.2	Obtención de los espermatozoides.....	- 27 -
8.3	Calidad espermática.....	- 28 -
8.3.1	Análisis de motilidad espermática	- 28 -
8.3.2	Evaluación de la viabilidad espermática	- 29 -

8.4	Evaluación de la concentración espermática	- 29 -
8.5	Valoración de la integridad de la membrana espermática	- 29 -
8.6	Reacción acrosomal.....	- 30 -
8.7	Pruebas estadísticas	- 32 -
9.	RESULTADOS	- 33 -
9.1	Concentración espermática	- 33 -
9.2	Motilidad espermática	- 34 -
9.3	Viabilidad espermática	- 35 -
9.4	Integridad de la membrana espermática	- 36 -
9.5	Reacción acrosomal espontánea.....	- 37 -
10.	DISCUSIÓN.....	- 38 -
11.	CONCLUSIONES	- 42 -
12.	BIBLIOGRAFÍA	- 43 -

Índice de cuadros y figuras

Número	Nombre	Página
Cuadro 1.	Porcentaje de mortalidad en América	2
Cuadro 2.	Causas principales de mortalidad en México	2
Cuadro 3.	Composición del medio M-16	28
Figura 1.	Representación esquemática de la composición de los islotes de Langerhans	4
Figura 2.	Mecanismo de secreción de la insulina en células β	6
Figura 3.	Estructura de los tubos seminíferos de los testículos de mamíferos	9
Figura 4.	Esquema general de la espermatogénesis	10
Figura 5.	Esquema general del espermatozoide de mamífero	12
Figura 6.	Organización de la cabeza del espermatozoide de mamífero	13
Figura 7.	Representación de la reacción acrosomal	17
Figura.8	Representación de daño en la integridad de la membrana (Hos-test)	30
Figura 9.	Análisis de la concentración espermática	33
Figura 10.	Motilidad espermática	34
Figura 11.	Viabilidad espermática	35
Figura 12.	Integridad de la membrana plasmática	36
Figura 13.	Perdida del acrosoma	37

1. RESUMEN

En este trabajo, se indujo la diabetes en ratones de la cepa CD1⁺, utilizando 150 mg/kg de estreptozotocina (STZ), la cual fue ministrada vía intraperitoneal (I.P). Luego de la inducción los animales se mantuvieron en cuidados controlados durante 60 días, después de este periodo los animales se sacrificaron para realizar la evaluación de la concentración, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides; también se utilizó la prueba hipo-osmótica (HOST-test) para determinar el daño de la membrana plasmática de los espermatozoides; finalmente se evaluó el efecto de la diabetes inducida sobre la pérdida del acrosoma de los espermatozoides.

Para el análisis de resultados se utilizó una prueba t de student para datos donde se compararon dos grupos y un ANOVA para comparar más de dos grupos, previamente comprobada la normalidad por la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la diabetes inducida por STZ ocasiona daños en la calidad del espermatozoide alterando de manera negativa su movilidad y viabilidad respecto al grupo control. Por otro lado, se observó que la diabetes afectó la integridad de la membrana plasmática de la cabeza y el flagelo de los espermatozoides ya que se observó una disminución significativa en el porcentaje de las células viables con buena integridad de la membrana; sumado al efecto de la diabetes sobre la pérdida del acrosoma después de 1 y 2 horas de incubación, donde se observó un porcentaje significativamente mayor de pérdida de acrosoma en los espermatozoides de los animales diabéticos al compararlos con los espermatozoides de los animales control.

2. INTRODUCCIÓN

En la sociedad mundial actualmente se efectúa un gran avance en la tecnología, lo cual ha incrementado el uso de las nuevas “herramientas electrónicas”, brindando así una mayor comodidad para el ser humano. Sin embargo, las sociedades actuales, casi a la par con la tecnología, han aumentado la presencia de enfermedades crónico degenerativas no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, crónico respiratorias, cáncer y diabetes (Nieto, 2010).

La Diabetes Mellitus (DM), es una enfermedad metabólica crónica, caracterizada por altos índices de glucosa en la sangre (hiperglucemia), asociada a una deficiencia absoluta o relativa de la secreción de la insulina (ADA, 2008; Razgado, 2010). La organización mundial de la salud (OMS), considera a la diabetes como un problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de muerte y discapacidades en los adultos. En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes, se calcula que en el 2012 murieron 1.5 millones de personas a causa de DM, más del 80 % de las muertes por DM se registran en países de ingresos bajos y medios. La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre el 2005 y 2030 (Nava y Veras, 2010).

Cálculos recientes revelan que en los países latinoamericanos y del Caribe, las tasas más elevadas de prevalencia de diabetes corresponden a Belice (12.4%) y México (10.7%). Estados Unidos de América (USA) presenta una prevalencia alrededor de 9.3%, llegando a prácticamente el 16%, en la frontera México-Estadounidense (Organización Panamericana de la salud [PAHO], 2012; Gil *et al.*,

2013). En los últimos años la Diabetes en América se ha mantenido como la tercer causa de muerte el continente, con un total de 6.92% de muertes durante el 2012 (Cuadro. 1).

Causas principales de mortalidad en las Américas en el 2012			
	Causas principales	% de defunciones	Número de defunciones.
1	Enfermedades isquémicas del corazón	9.65 %	244,039
2	Enfermedades cerebrovasculares	7.35%	185,896
3	Diabetes mellitus	6.92%	174,921
4	Influenza y neumonía	5.09%	128,639
5	Agresiones y homicidios	3.66%	92,512

Cuadro. 1. Porcentaje de mortalidad en América.

(Modificado de PAHO 2012)

En México, la diabetes es la causa principal de miles de defunciones al año, convirtiéndose así en la enfermedad con más gastos en salud pública. En un estudio realizado por la organización panamericana de la salud durante el año 2012, indicó que la DM fue la principal causa de muerte en México durante ese año (Cuadro No. 2).

Causas principales de mortalidad en México durante el año 2012			
	Causas principales	% de defunciones	Número de defunciones
1	Diabetes mellitus	14.99%	83,381
2	Enfermedades isquémicas del corazón	12.96%	72,049
3	Cirrosis	5.82%	32,389
4	Enfermedades cerebrovasculares	5.56%	30,934
5	Agresiones-homicidios	4.18%	23,223

Cuadro. 2. Causas principales de mortalidad en México durante el 2012.

(Modificado de PAHO 2012)

2.1 Fisiopatología de la DM

La unidad anátomo-funcional del páncreas son los islotes de Langerhans (Fig. 1). En ellos se sintetizan la insulina (células β), el glucagón (células α) y la somatostatina (células δ).

La DM comprende un grupo heterogéneo de enfermedades sistemáticas crónicas, la mayoría asociadas a las células pancreáticas ya descritas, de causa desconocida con grados variables de predisposición hereditaria y la participación de diversos factores ambientales, que afectan al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia, después de cargas estándar de glucosa e incluso en ayuno conforme existe mayor descomposición de la secreción de la insulina (NOM-015 SSA, 1994; Razgado, 2010).

La fisiopatología de la diabetes difiere según el tipo de síndrome que se presente, para el caso de DM tipo I, la enfermedad se desarrolla a partir de la presencia de anticuerpos como los anti-células β de los islotes de Langerhans (ICA), anticuerpos anti-insulina (IAA), autoanticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GAD_{65}) (Razgado, 2010), que actúan directamente contra los islotes de Langerhans, con destrucción selectiva de las células β que producen y liberan insulina, hormona que regula el nivel de glucosa en la sangre (Díaz, 2008).

ISLOTES DE LANGERHANS

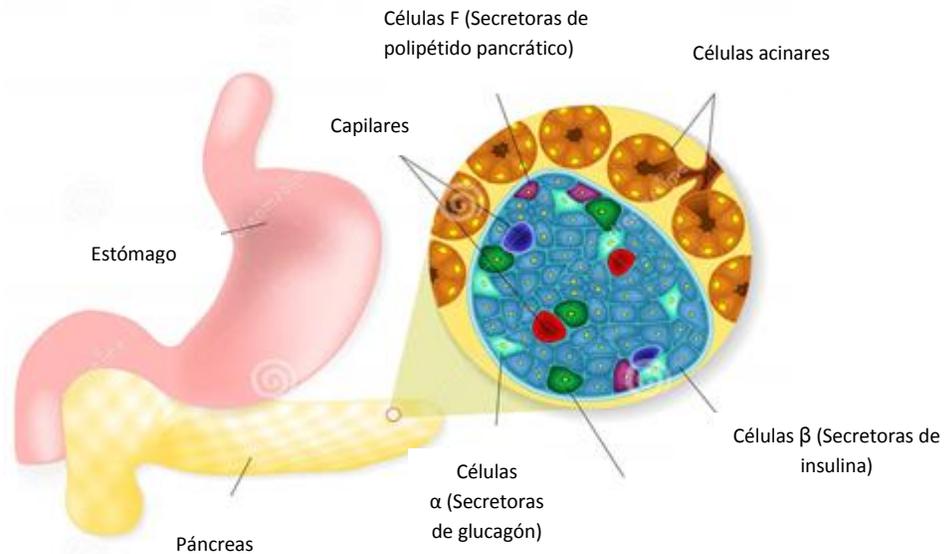


Fig. 1. Representación esquemática de la composición de los Islotes de Langerhans.

(Modificado de Hall, 2011).

Por otra parte, la DM tipo II está relacionada con la resistencia a la insulina que adicionalmente genera un deterioro en la función de las células β . Al comienzo de la resistencia a la insulina, los islotes de Langerhans aceleran la producción de masa celular de las células β , incrementando la obtención de insulina. Esta reacción del organismo sirve para controlar los niveles de glucosa en la sangre, sin embargo, con el paso del tiempo las células β comienzan a degenerarse, presentándose hiperglucemias (Castillo, 2009).

2.2 Mecanismos de secreción de la insulina

La insulina es una hormona polipeptídica que es secretada en el retículo endoplasmático rugoso de las células β de los islotes pancreáticos, la insulina tiene como principales efectores al hígado, tejido graso y músculo estriado (Esquivel *et al.*, 2010).

La formación de la insulina comienza a partir de la síntesis de una pre-hormona más grande, que es la pre-insulina. Ésta proteína se encierra en micro vesículas ubicadas en las cisternas del retículo endoplásmico, donde se llevan a cabo modificaciones dando lugar a la proteína proinsulina, la cual se transporta hacia el aparato de Golgi en el cual se empaqueta en gránulos de secreción; la insulina se genera a partir de la exocitosis de estos gránulos. La insulina viaja por el torrente sanguíneo hasta sus tejidos blancos, donde se une a la membrana celular por interacción con su receptor específico. La secreción basal de los valores de la insulina depende de la concentración de glucosa en la sangre, la glucemia elevada favorece a la liberación de insulina, mientras que la glucemia normal o sus valores debajo de lo normal disminuyen la liberación de insulina desencadenando la liberación de glucagón (Esquivel *et al.*, 2010).

La insulina es secretada cuando la glucosa entra a la célula mediante un transportador específico (Fig. 2). Una vez que la glucosa ha entrado en el interior de la célula, es convertida en glucosa-6-fosfato por acción de la enzima glucocinasa. Tras esta primera transformación, las mitocondrias alteran las proporciones de moléculas energéticas que hay dentro de ella, lo que conduce al cierre y apertura de distintos canales iónicos en la pared de la célula que llevan a la secreción de la insulina almacenada en su interior (Nelson y Cox, 2011).

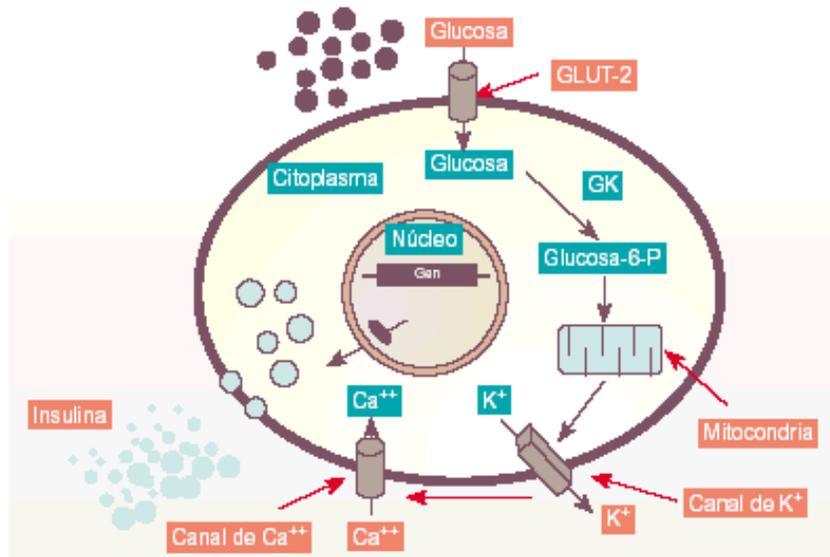


Fig. 2. Mecanismos de secreción de insulina en las células β

(Torrades, 2003)

2.3 Clasificación de la diabetes

Como ya se mencionó, la DM es en realidad un grupo de desórdenes clínicos y etiológicos heterogéneos que tienen como característica común la hiperglucemia.

Con el avance del conocimiento de la diabetes, la clasificación ha tenido que ir cambiando y siendo revisada, actualmente incluye de manera general los siguientes tipos:

- Diabetes tipo I. Se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas, que habitualmente causa una deficiencia de insulina, este tipo de diabetes a su vez se clasifica en 2: auto-inmunitaria e idiopática.
- Diabetes tipo II. Esta forma de diabetes es sin duda la más común entre todas las categorías, la padecen entre el 90 y 95% de las personas

diabéticas; se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina y a una relativa insuficiencia de la misma.

- Diabetes gestacional. Se presenta cuando ocurre algún rechazo/intolerancia a la glucosa durante el embarazo.
- Otros tipos específicos.
 - i. Defectos genéticos de las células β
 - ii. Defectos genéticos a la acción de la insulina
 - iii. Enfermedades del páncreas exocrino
 - iv. Endocrinopatías
 - v. Inducida por fármacos o sustancias químicas
 - vi. Infecciones (principalmente virales)
 - vii. Formas frecuentes de la función inmunitaria
 - viii. Otros síndromes genéticos que en ocasiones se asocian a causar Diabetes (ADA, 2008)

2.4 Complicaciones de la diabetes

A pesar de que la diabetes está catalogada como una enfermedad de origen endocrino, actualmente se puede observar que tiene manifestaciones y consecuencias vasculares, las cuales se dividen en dos grandes grupos: micro vasculares y macro vasculares. Las primeras causan diversas complicaciones entre las que destacan: nefropatía, que conduce a falla renal; retinopatía diabética, conduce a la pérdida de la visión y la neuropatía, con daños al sistema nervioso. Además, la neuropatía causa síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como problemas a en la función sexual. Por otro lado, las

macrovasculares, provocan aterosclerosis, infarto al miocardio accidentes vasculares encefálicos y lesiones de los vasos de los miembros inferiores (Camacho, 2010).

2.5 Reproducción

La reproducción es un procesos biológico que todos los seres vivos llevamos a cabo, en los mamíferos el tipo de reproducción es sexual, esto indica que se requiere la participación de dos gametos, óvulos y espermatozoides (Curtis *et al.*, 2011). La DM puede afectar a ambos tipos de células germinales. El presente trabajo se centra sobre los gametos masculinos, por lo que a continuación solo se describe el proceso de formación de los espermatozoides.

2.5.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo de proliferación y diferenciación celular que se lleva a cabo en los testículos y es esencial para todas las especies con reproducción sexual, cuyo resultado es la formación de los espermatozoides (Geisinger, 2003). Los testículos son estructuras lobulares o tubulares, según la especie, conformadas por tres tipos de células: las células de Leydig ubicadas en la periferia de los túbulos, las células de Sertoli ubicadas dentro de los tubos seminíferos (Fig. 3) y las células germinales, que darán origen a los espermatozoides (Grier y Lo Nostro, 2000).

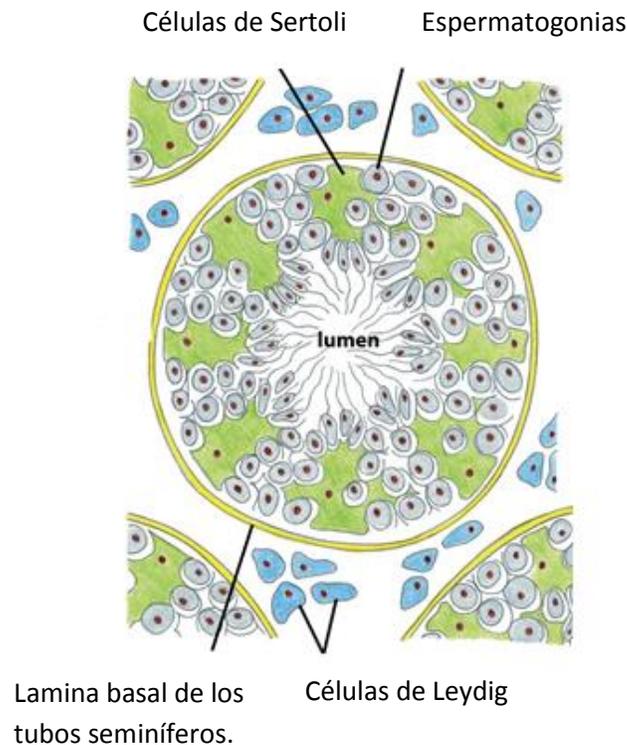


Fig. 3. Estructura de los tubos seminíferos que conforman al testículo.

(Modificado de Cheng y Mruck, 2010)

La espermatogénesis en los mamíferos (Fig. 4), comienza con el crecimiento y diferenciación de las espermatogonias para dar origen a los espermatocitos primarios, que son células diploides grandes, luego, los espermatocitos primarios pasan por la meiosis I, al final de este proceso los espermatocitos primarios darán origen a dos espermatocitos secundarios haploides, cada espermatocito secundario se divide nuevamente, durante la meiosis II, para producir dos espermátidas cada uno, las cuales se diferencian en espermatozoides. Las células de Sertoli regulan el proceso de espermatogénesis y nutren a los espermatozoides en desarrollo. Las espermatogonias, espermatocitos y espermátidas están embebidas en los pliegues de las células de Sertoli (Audesirik *et al.*, 2003).

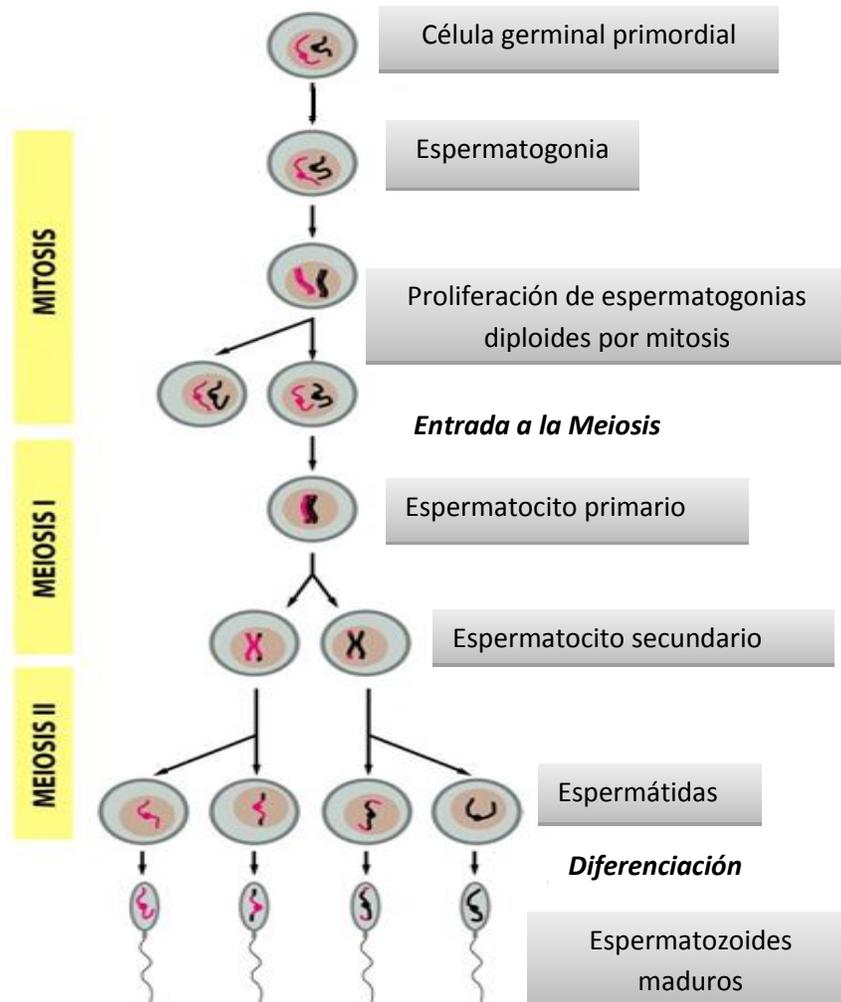


Fig. 4. Esquema general de la espermatogénesis.

(Modificado de Cheng y Mruck, 2010)

2.5.2 Morfología del espermatozoide

El espermatozoide, producto final de la espermatogénesis, es una célula altamente especializada con una serie de estructuras y características funcionales que lo dotan de una capacidad singular. El flagelo de los espermatozoides de mamíferos consiste en cuatro diferentes segmentos: la pieza conectora, la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Las principales estructuras componentes del flagelo son: el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la

vaina de fibras. El axonema está compuesto por complejos de microtúbulos 9+2 que se extienden a lo largo del flagelo (Fig. 5). Las fibras densas externas están adjuntas al axonema y extendidas de la parte conectora a la porción posterior de la parte principal del flagelo (Eddy, 2006). La región del flagelo entre el cuello y el anillo es la pieza media, el centro de la pieza media junto con toda la longitud de la cola forma el axonema, que es el responsable del movimiento, y ahí se encuentran las mitocondrias (Castillo, 2006).

La cabeza del espermatozoide cuenta con un citoesqueleto, que tiene como elemento principal a la teca perinuclear (TP), que es una cápsula rígida que cubre al núcleo del espermatozoide de mamíferos y tiene como función la unión de las membranas espermáticas y la preservación de su integridad (Arenas *et al.*, 2010).

La membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica y proteínas. La bicapa lipídica constituye la estructura básica y actúa como una barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Las proteínas están constituidas en la bicapa lipídica y realizan funciones como el transporte de moléculas específicas hacia el interior o exterior de la célula; éstas actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la traducción de señales (Eddy, 2006).

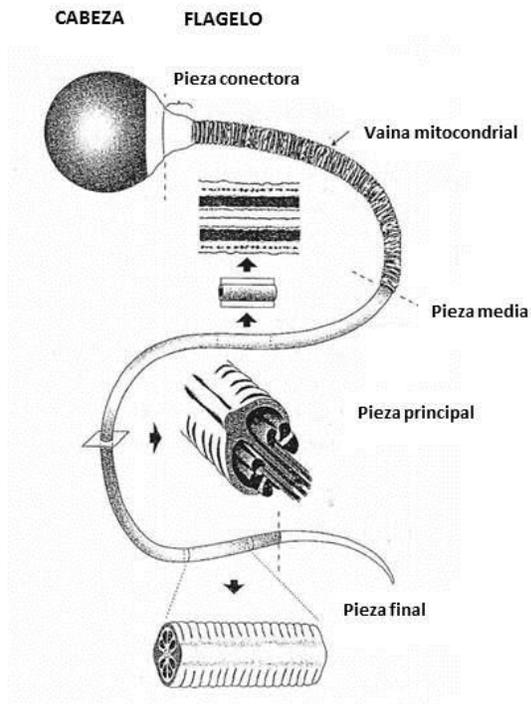
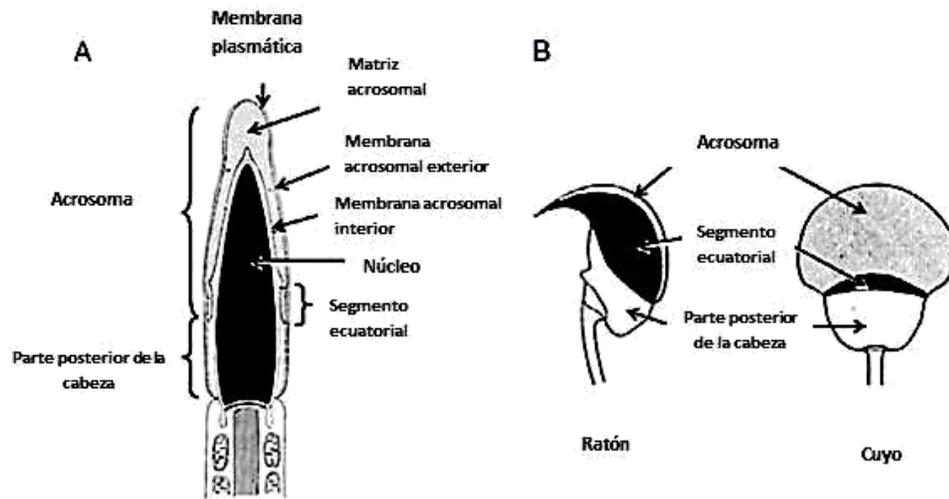


Fig. 5. Esquema general de las partes que componen al espermatozoide

(Modificado de Neill, 2006)

Las principales regiones de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de la mayoría de mamíferos son: la región acrosomal, la región ecuatorial y la región post acrosomal (Fig. 6).



(Modificado de Neill, 2006)

Fig. 6. Organización de la cabeza del espermatozoide. A) se puede observar la membrana plasmática, el núcleo y las mitocondrias en la parte conectora. B) se muestran las regiones de la cabeza de espermatozoides del ratón y del conejo.

El tamaño y la forma de estos dominios varían entre las especies. El anillo posterior se encuentra en la unión entre la cabeza y la pieza de conexión, se cree que forma un sello hermético entre los componentes citoplasmáticos de las dos porciones principales del espermatozoide. La membrana plasmática del flagelo se divide en el dominio de la pieza media, la pieza principal y la final (Eddy, 2006).

2.5.3 Fisiología del espermatozoide

Una vez formadas las células espermáticas dentro de los tubos seminíferos, el espermatozoide debe pasar por tres procesos importantes para poder llevar a cabo una fecundación exitosa los cuales son: la maduración, la capacitación y la reacción acrosomal.

2.5.3.1 Maduración de los espermatozoides

En los mamíferos como en otros organismos, los espermatozoides formados en el testículo están altamente diferenciados en el momento que abandonan las gónadas; sin embargo, son inmaduros e inmóviles, por lo tanto son incapaces de fecundar al óvulo. Los espermatozoides necesitan pasar por el epidídimo para adquirir dichas propiedades, ya que es ahí donde sufren cambios morfológicos y fisiológicos que los preparan para la fecundación (Martínez-Loredo, 2011).

La maduración del espermatozoide puede ser llevada a cabo en distintas regiones según la especie, por ejemplo, en el verraco (*Sus scrofa domestica*), los espermatozoides maduros se localizan a nivel de la cabeza del epidídimo; mientras que en otros, como ratas, ratones, hámster y el humano, se encuentran en el segmento distal del epidídimo (Martínez-Loredo, 2011).

A pesar de que la maduración puede darse antes, el sitio donde la mayor parte de los espermatozoides ha adquirido su potencial para fertilizar al óvulo es la cola del epidídimo, que además tiene la característica de ser el sitio principal de almacenamiento de los espermatozoides (Martínez-Loredo, 2011).

La maduración espermática depende de las secreciones del epidídimo, así como también del tiempo de tránsito a través del mismo. Durante la maduración, la membrana plasmática sufre cambios en la composición y organización de sus componentes. Se favorece la actividad flagelar, así como una distribución de las glicoproteínas y un aumento en la capacidad de ácido sálico. Adquiriendo así un mayor movimiento, siendo esta la modificación más importante, ya que le permitirá moverse mejor dentro del tracto femenino, donde se llevará a cabo el proceso de capacitación (Florman y Ducibella, 2006).

Los mecanismos y sustancias que parecen contribuir al desarrollo de la capacidad de movimiento durante la maduración son: la transferencia de varias moléculas, tales como el glicerol-3-fosforicolina, una proteína clave para la motilidad, alteración de la proteína Quinasa dependiente de AMPc y el desarrollo de los mecanismos intracelulares de baja captura de los iones de Calcio (Ca^{2+}) (Okabe y Cummins, 2007).

2.5.3.2 Capacitación de los espermatozoides

Después de madurar en el epidídimo, los espermatozoides pasan a la siguiente etapa que es la capacitación, la cual consiste en una serie de modificaciones bioquímicas que ocurren en el espermatozoide durante su paso por el tracto femenino (Martínez-Loredo, 2011).

Los cambios ocurridos durante la capacitación incluyen: cambios en las propiedades de la superficie, tales como, la composición de las proteínas de la membrana plasmática, la localización de antígenos y la carga superficial; las propiedades de la membrana plasmática, como, el cambio en el potencial de membrana, la alteración en la composición de lípidos y fosfolípidos, la modificación en el pH, así como la variación en los niveles iónicos de calcio (Florman y Ducibella, 2006). Todos estos cambios ocurren desde la cabeza a la cola del espermatozoide. La capacitación no es un proceso unitario, al contrario, es la suma de reacciones múltiples a nivel individual. Las reacciones que atraviesan las células espermáticas ocurren en diferente tiempo. El curso de tiempo para las reacciones que componen a la capacitación, así como para la realización del proceso difiere ampliamente entre especies de mamíferos. Se ha

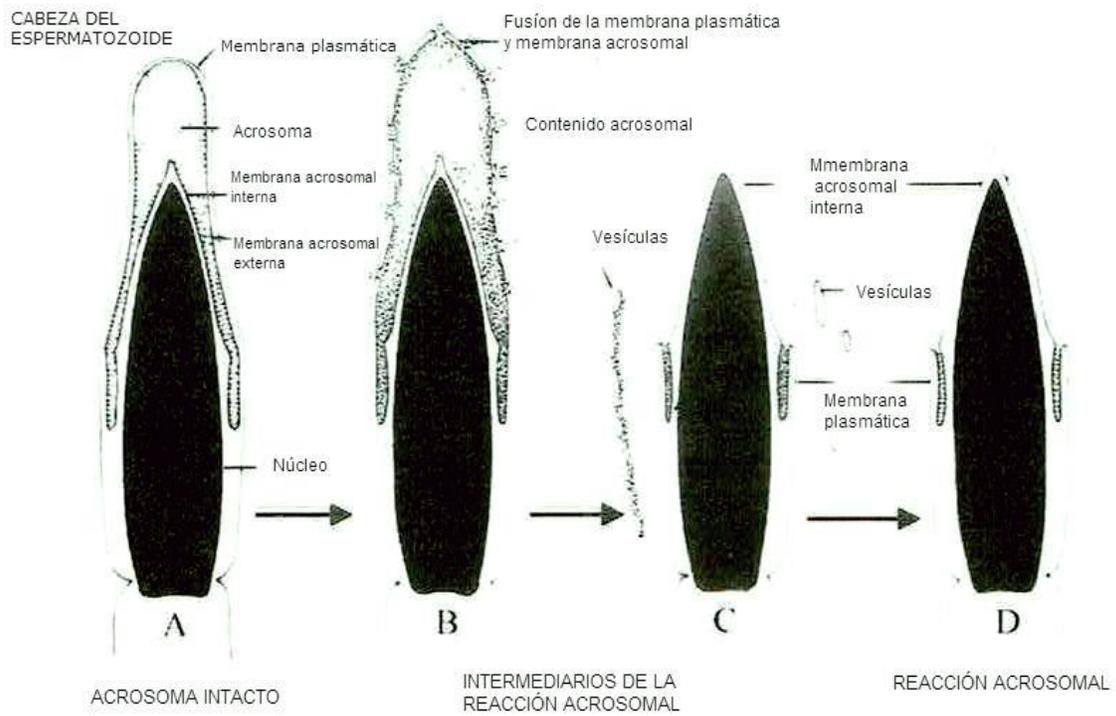
sugerido que estas diferencias pueden estar relacionadas con la disponibilidad de óvulos en el tracto reproductor femenino.

La capacitación también puede inducirse *in vitro* y puede ser mediante la incubación en fluidos biológicos (fluido del oviducto, fluido folicular o suero sanguíneo), también se usan medios químicos suplementados con fuentes energéticas (glucosa, lactato, piruvato y albúmina) (Martínez-Loredo, 2011).

El proceso de capacitación tiene como resultado la activación del espermatozoide para responder adecuadamente al reconocimiento del ovocito y poder realizar la fecundación (Florman y Ducibella, 2006).

2.5.3.3 Reacción acrosomal

Como resultado de la capacitación, el espermatozoide está preparado bioquímica y morfológicamente para sufrir un fenómeno de exocitosis dependiente de calcio denominado reacción acrosomal (Fig.7), que se inicia cuando el espermatozoide tiene contacto con la zona pelúcida del óvulo. Durante este proceso ocurre una fusión progresiva entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, con la consecuente formación de vesículas que liberan enzimas acrosomales encargadas de facilitar el paso del espermatozoide a través del cumulus oophorus, la corona radiada y la zona pelúcida del ovocito.



(Modificado de Neill, 2006)

Fig 7. Representación de los eventos de la reacción acrosomal en espermatozoides de mamíferos.

3. ATENCEDENTES

3.1 *Diabetes experimental*

La inducción experimental de esta enfermedad en modelos de animales es esencial para el avance de nuestro conocimiento y comprensión de los diversos aspectos de su patogenia y en última instancia, la búsqueda de nuevos tratamientos.

Al ser la DM una patología de importancia desde el punto de vista clínico y de investigación básica, se han desarrollado diversos modelos experimentales para poder estudiar los eventos involucrados en esta. En 1889, Von Mering y Minkowski produjeron DM en perros (*Canis lupus familiaris*), mediante la remoción quirúrgica del páncreas. Desde entonces se usa la pancreatectomía con el propósito de crear modelos experimentales (citado en Ramos y Domingo, 1994). La inducción experimental también puede darse a través de la ministración en exceso de epinefrina y glucagón, produciendo hiperglucemia e hiperplasia de las células β del páncreas. Otro medio de inducción se debe a la administración de agentes químicos, como el uso de la estreptozotocina (STZ) que es un antibiótico extraído de *Streptomyces achromogenes* y que posee propiedades antitumorales y oncogénicas (Ramos y Domingo, 1994). La STZ es el principal agente químico que se ocupa para la inducción de DM en animales debido a que imita muchas de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes humana y dada las similitudes establecidas de algunas de las anomalías estructurales, funcionales y bioquímicas por lo cual es un modelo adecuado para evaluar el mecanismo de la diabetes. La inducción de la diabetes experimental mediante STZ ocasiona la

degeneración de los islotes de Langerhans de las células β del páncreas (Mahmound *et al.*, 2009), clínicamente los síntomas en ratas y ratones son vistos dentro de los 1 y 4 días después de la inyección (Flores *et al.*, 2006).

3.2 Mecanismo de acción de STZ

La toxicidad de la STZ es selectiva sobre las células β , y actúa dañando directamente a las mismas. Provoca un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ya que puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis. La STZ altera primero la oxidación de la glucosa para ser captada por las células, para después disminuir la biosíntesis y secreción de insulina. Las células β del páncreas captan la STZ a través del transportador GLUT2, por lo que cuando se reduce la expresión de este transportador, se previene la acción diabetogénica de la STZ. Este fármaco ocasiona cambios intracelulares en las células beta, fragmentación y alcalinización e inhibe el ciclo de Krebs y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria, provocando disminución de la producción del ATP. El daño al DNA por STZ induce la activación de la poli-ADP-ribosilación en las células (Szkudelski, 2001; Plascencia, 2006; Olazo, 2010).

3.3 Inducción de DM por STZ en animales

La STZ induce la diabetes en ratas, ratones, monos, hámster, conejos y conejillos de indias (Elsner *et al.*, 2000). La cantidad de STZ requerida para la inducción de la diabetes depende de la especie animal, la edad del mismo, la vía de administración, el peso del organismo, su estado nutricional y diferentes respuestas a xenobióticos. Para la inyección en animales de experimentación y

obtener resultados óptimos, lo mejor es administrar en ayuno y recién preparada (Elezau *et al.*, 2013).

La dosis de diabetogénicos a aplicar varía con todos los atributos antes mencionados. Se han reportado diferentes dosis para producir las condiciones máximas de diabetes en diversas especies: ratas (50 a 75 mg/kg intraperitoneal (I.P), ratones (175 a 200 mg/kg) I.P o intravenosa (I.V); perros (15 mg/kg durante 3 días I.V). En dosis más bajas, diabetes inducida por STZ no es estable, ya que se produce la recuperación espontánea (Elezau *et al.*, 2013). Sin embargo, en diversos trabajos se ha inducido una DM estable utilizando dosis más bajas de STZ (150 mg/kg) (Shrilatha y Muralidhara, 2007); 137.5 mg/kg (Salinas, 2009); 150 mg/kg (Arora *et al.*, 2009); 150 mg/kg (Ventura, *et al.*, 2011); 137 mg/kg (Ventura, 2013). Por lo cual en este trabajo se utilizó una dosis de STZ de 150 mg/kg de peso.

3.4 Animales de experimentación (Ratón cepa CD1⁺)

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar, comprender, diagnosticar y tratar las enfermedades que afecten tanto a animales como a humanos. En la actualidad el animal de laboratorio goza de auténtica prioridad en el campo de la experimentación (Pereira y González, 2002), siendo las especies de roedores uno de los grupos más importantes de este conjunto (Havenaar *et al.*, 2003). Los roedores que se emplean en experimentación son pequeños mamíferos entre los que se encuentran el cobaya, conejo, jerbo, hámster, rata y ratón, siendo estos dos últimos los más utilizados en la investigación (Hernández, 2006).

Los ratones de la cepa CD1⁺ pertenece a la especie *Mus musculus*, y son animales “estandarizados o definidos”. Son animales con alta heterogeneidad sanguínea, estos organismos son los que mejor representan la variabilidad genética de una población humana gracias a su reproducción no consanguínea, por eso son muy usados en estudios de Toxicología y Farmacología. Hay que destacar que estos animales no son definidos genéticamente, tienen un corto tiempo generacional, alta eficacia reproductiva y son de fácil mantenimiento (Hernández, 2006).

3.5 Estudios previos

Un estudio realizado por Palomino y cols., (1998) en ratas, mostró que en los machos, la diabetes trae como consecuencias una menor producción de espermatozoides y la disminución de su movilidad; en el caso de las hembras se ha demostrado que presentan atrofia ovárica, insuficiencia del cuerpo lúteo, involución uterina y problemas asociados con el mantenimiento de la gestación.

Las principales alteraciones reproductoras que se han encontrado en ratones con diabetes inducida han sido a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, tanto por la disminución de secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), como por una secreción deficiente de la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la prolactina, así como la alteración a nivel gonadal y la producción de hormonas esteroideas (testosterona, estrógenos y progesterona). La disfunción sexual es frecuentemente asociada con la diabetes en humanos y en animales de experimentación; muchos de los problemas resultado de la inducción de la diabetes ocasiona cambios vasculares y cambios en el sistema

nervioso periférico (SNP), alterando también la función endocrina (Scarano *et al.*, 2005). Está bien establecido que la DM genera problemas a nivel reproductivo, tales como disfunción eréctil y eyaculación retrograda (Palomino *et al.*, 1998). Mangoli *et al.*, 2013, mostraron que las ratas diabéticas administradas con STZ presentan diferencias significativas en los parámetros de la calidad espermática respecto al control, generando cambios hormonales, incidencia de neuropatía y un aumento en los niveles de estrés oxidativo.

La evidencia creciente indica que el estrés oxidativo se incrementa en la diabetes debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y a la disminución de la eficiencia de las defensas antioxidantes. Durante el desarrollo de la diabetes, la oxidación de los lípidos y las proteínas aumenta con la progresión de la enfermedad (Amaral *et al.*, 2008). Los espermatozoides son particularmente vulnerables al estrés oxidativo ya que contienen una gran cantidad de ácidos grasos que desencadenan la generación de las EROS por las mitocondrias espermáticas e inducen a la peroxidación lipídica (Aitken, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

La DM es una enfermedad con una de las mayores prevalencias en el mundo y se prevé que esta prevalencia aumente en los próximos años. Se han descrito diversas complicaciones provocadas por la DM y entre ellas se encuentran los efectos sobre el sistema reproductor, las cuales afectan la cantidad y la calidad espermática y por lo tanto la capacidad reproductiva de los machos. Sin embargo, existen pocas evidencias del efecto que tiene la DM sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide y nula evidencia sobre el efecto que tiene esta enfermedad sobre los procesos que dependen de la integridad de la membrana plasmática como la capacitación y la reacción acrosomal, proceso que se encuentra involucrado de manera directa en la capacidad de reproducción del espermatozoide.

Debido a lo anterior en este trabajo se pretende investigar el efecto que tiene la DM sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide y sobre la presencia de la reacción acrosomal.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

- Evaluar los efectos de la diabetes inducida con STZ a nivel reproductivo en espermatozoides de ratón CD1+ mediante las pruebas de motilidad, viabilidad, concentración espermática, integridad de la membrana y reacción acrosomal, para confirmar que la diabetes mellitus puede ser una importante causa de infertilidad.

5.2 *Objetivos particulares*

- Analizar los efectos de la diabetes inducida sobre la concentración espermática.
- Examinar el efecto ocasionado por la diabetes inducida sobre la calidad espermática (motilidad y viabilidad).
- Determinar el daño que ocasiona la diabetes inducida sobre la integridad de la membrana de los espermatozoides.
- Investigar el efecto que ocasiona la diabetes sobre la reacción acrosomal evaluando la pérdida del acrosoma de los espermatozoides.

6. HIPÓTESIS

La diabetes es una enfermedad crónico degenerativa que afecta paulatinamente a todos los sistemas del cuerpo, incluyendo el sistema reproductor, por lo cual, se espera que la dicha enfermedad afecte la calidad y la funcionalidad de los espermatozoides de los ratones diabéticos inducidos con STZ, con respecto al grupo control.

7. MATERIAL

7.1 *Material biológico*

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1⁺ de 8 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos y mantenidos en el Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo condiciones estándar de fotoperiodo (12h/12h luz/oscuridad), a una temperatura ambiente de 22±1 °C con agua y comida *ad libitum* (Fuentes *et al.*, 2008). Los ratones se dividieron de manera aleatoria en dos grupos de 6 animales cada uno, un grupo control y un grupo diabético (tratado con STZ). Se realizaron por lo menos 3 experimentos independientes por duplicado para su análisis.

7.2 *Reactivos*

El Cloruro de sodio (NaCl), Citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇), fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de magnesio (MgSO₄), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), fueron de JT Baker (Xalostoc, México). La Glucosa (C₆H₁₂O₆), piruvato de sodio, etanol, ácido láctico, azul de tripán (0.4 %), tritón X-100, eosina amarillenta 1%, estreptozotocina, formaldehido (5%), Fructuosa (C₆H₁₂O₆), fueron de SIGMA (San Luis Mo, EUA).

8. MÉTODOS

8.1 Inducción de la diabetes

Los ratones fueron administrados con una dosis de 150 mg/kg, de STZ vía intraperitoneal. Después de 8 días de la administración se midieron los niveles de glucosa mediante un glucómetro (Accu-Chek Performa); durante este procedimiento se realizó una pequeña incisión en la punta de la cola de los ratones para extraer una gota de sangre, la cual se colocó en una tira reactiva del glucómetro. Solamente los ratones con niveles de glucosa mayores a 250 mg/dl fueron incluidos en el estudio, ya que presentan una diabetes total y no hay recuperación de las células β del páncreas (Shrilatha y Muralidhara, 2007).

8.2 Obtención de los espermatozoides

Después de transcurridos 60 días de la confirmación de los niveles altos de glucosa, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical (control y diabéticos) e inmediatamente se extrajeron los testículos y los conductos deferentes, los cuales se limpiaron de grasa e irrigaciones venosas. Posteriormente se realizó la extracción de los espermatozoides, los cuales fueron colocados en microtubos de 1.5 ml con 500 μ l de medio capacitante M-16 (cuadro 3) (Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2008) y se mantuvieron a 37 °C en baño María hasta que se utilizaron en las diferentes técnicas.

Sustancia	Concentración (mM)
NaCl	100
NaHCO ₃	25
CaCl ₂	2.6
KCl	1.8
MgSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	1.56
Piruvato de sodio	0.5
Ácido láctico	20

Cuadro. 3. Composición del medio capacitante M-16

(Martínez-Loredo, 2011)

8.3 Calidad espermática

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010), la calidad espermática se debe valorar mediante la motilidad y viabilidad de la muestra de semen; la motilidad debe evaluar casi inmediatamente después de la extracción seminal. En cuanto a la viabilidad debe superar el 58 % de espermatozoides vivos.

8.3.1 Análisis de motilidad espermática

Los espermatozoides recién obtenidos se colocaron en el medio M-16, se tomó una alícuota de la suspensión celular la cual se observó al microscopio óptico (400x) y se determinó el porcentaje de células móviles, en promedio se analizaron 100 células por cada muestra por duplicado.

8.3.2 Evaluación de la viabilidad espermática

La evaluación de la viabilidad se logra a través de la obtención del porcentaje de espermatozoides vivos, los cuales según la OMS, pueden ser fácilmente cuantificados mediante técnicas de exclusión con ayuda de colorantes, en este trabajo se determinó mediante ensayo de exclusión del azul tripán. Se mezclaron 25 μ l de muestra de cada suspensión espermática con 5 μ l de azul de tripán, subsecuentemente se colocaron en un portaobjetos y las laminillas fueron analizadas en un microscopio óptico (400x).

8.4 Evaluación de la concentración espermática

La concentración espermática se evaluó tomando una alícuota de 25 μ l de la suspensión celular de cada una de las muestras espermáticas y se colocó en 500 μ l de Tritón X-100 al 0.5%, posteriormente, las muestras fueron mezcladas en un agitador durante aproximadamente 1 minuto, inmediatamente después se colocaron 15 μ l de la muestra en una cámara de Neubauer para el conteo de los espermatozoides.

8.5 Valoración de la integridad de la membrana espermática

La prueba de Hos-Test, es una prueba de rutina empleada para evaluar la integridad de la membrana plasmática funcional y posee alta relevancia en la tecnología de reproducción asistida (WHO, 2010).

Cuando la membrana está funcionalmente activa no permite la salida de sustancias osmóticamente activas y compensa el desequilibrio osmótico captando agua, por lo que la membrana del espermatozoide se hincha y el flagelo se riza.

Se considera pues que un espermatozoide con la membrana hinchada es un espermatozoide funcionalmente activo y por tanto vivo (Fig 8) (López, 2012).

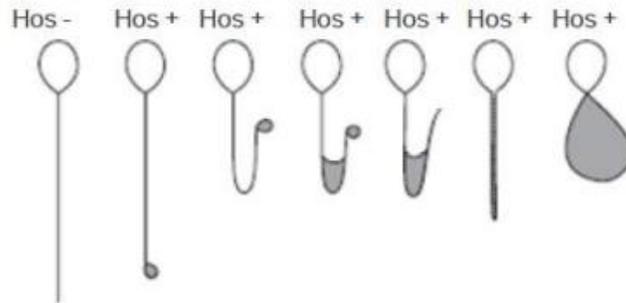


Fig. 8. Ejemplo del Host-Test. Hos (-), célula muerta. Hos (+), flagelo con distinto grado de hinchamiento, células vivas.

(López, 2012)

Para realizar la valoración de la integridad de la membrana se tomó una alícuota de 20 μ l de la suspensión celular de cada muestra y se agregaron 90 μ l de solución hipo-osmótica (citrato de sodio 3.67g, fructuosa 0.675g, equivalente a 18:1 v/v), se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Al finalizar la incubación se procedió a la realización de la tinción (1:1) con eosina amarillenta a 1% (Ducci *et al.*, 2002), y se evaluó el estado anátomo-funcional de la membrana plasmática de 200 células por laminilla mediante la observación al microscopio óptico (400x). La integridad y buen funcionamiento de la membrana plasmática es fundamental para el metabolismo espermático y para todas las etapas involucradas en el proceso de fertilización.

8.6 Reacción acrosomal

La importancia de la reacción acrosomal podría ser la liberación de las enzimas hidrolíticas que son requeridas para que el espermatozoide pueda penetrar la

zona pelúcida, además de la expresión de moléculas que actúan como receptores para que el espermatozoide pueda ingresar al ovocito y ocurra la fusión entre los gametos, la reacción acrosomal puede ser determinada por varias técnicas: la tinción con azul de coomassie, mediante microscopia electrónica o mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD46 (Cardona *et al.*, 2006).

El azul de coomassie tiene afinidad por las glicoproteínas presentes en la membrana plasmática del dominio acrosomal de la cabeza del espermatozoide, por lo tanto, la tinción de color azul de la región acrosomal indica una membrana acrosomal intacta; mientras que la región acrosomal pálida (sin tinción), es indicativa de la pérdida del acrosoma (López *et al.*, 2001; Cardona *et al.*, 2006).

La valoración de la reacción acrosomal se llevó a cabo en tres tiempos distintos, de acuerdo al período de incubación con medio M16 a 37°C. Tiempo cero (T0), que se valoró en los espermatozoides recién obtenidos, tiempo uno (T1), en células que se incubaron durante una hora y tiempo dos (T2), en los espermatozoides que se incubaron durante dos horas.

Para la valoración, se fijaron 500 µl de suspensión celular de los diferentes tiempos de incubación (T0, T1 y T2) en formaldehído al 5%, posteriormente se retiró el fijador mediante centrifugación a 5000 rpm durante 8 minutos y se obtuvo una pastilla, la cual se re-suspendió en 300 µl de buffer fosfato salino (PBS), se tomaron pequeñas alícuotas de la suspensión, se prepararon laminillas de cada una de las muestras y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, las laminillas fueron teñidas con 20 µl de azul de coomassie y se cubrieron con

parafilm durante 3 minutos, a continuación se lavaron con agua destilada tres veces con un intervalo de 1 minuto, posteriormente se montaron con glicerol al 50% y se evaluó la pérdida del acrosoma en 200 células con ayuda de un Microscopio óptico (400x).

8.7 Pruebas estadísticas

Para calcular la normalidad de los datos obtenidos se usó la prueba de Shapiro Wilk. Los resultados fueron descritos como la media más menos la desviación estándar ($X \pm DE$) y se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. La comparación de dos grupos se realizó mediante la prueba t de student. Para la comparación de más de dos grupos se usó un análisis de varianza (ANOVA) y la significancia estadística se determinó con la prueba de Tukey. Los análisis y la graficación se realizaron con el programa Graph Pad Prism versión 5 y SPSS versión 15.0.

9. RESULTADOS

9.1 Concentración espermática

En la figura 9 se puede observar que la concentración espermática presentó una disminución significativa ($t_{(0.05, 2)}=5.282$, $p=0.0045\leq 0.05$) en el número de células espermáticas de los ratones diabéticos ($\bar{x}=19.5 \pm 1.71$) comparados con los animales control ($\bar{x}=24 \pm 5.83$).

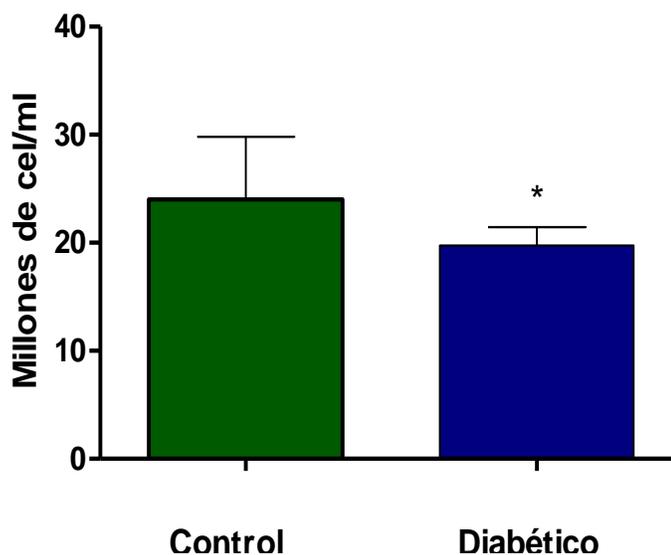


Fig. 9.-Análisis de la concentración espermática. Los resultados fueron descritos como la media más menos de la desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$).

*Se consideró un valor $p < 0.05$ como significativo (t de student) vs el control.

9.2 Motilidad espermática.

En la figura 10 se muestran los resultados de la motilidad espermática. Se puede observar que los espermatozoides obtenidos de los animales diabéticos presentaron una motilidad ($\bar{x} = 36.5 \pm 20$) significativamente más baja ($t_{(0.05, 2)} = 4.258$, $p = 0.0038 < 0.05$) con respecto a los espermatozoides obtenidos de los animales control ($\bar{x} = 75 \pm 12$).

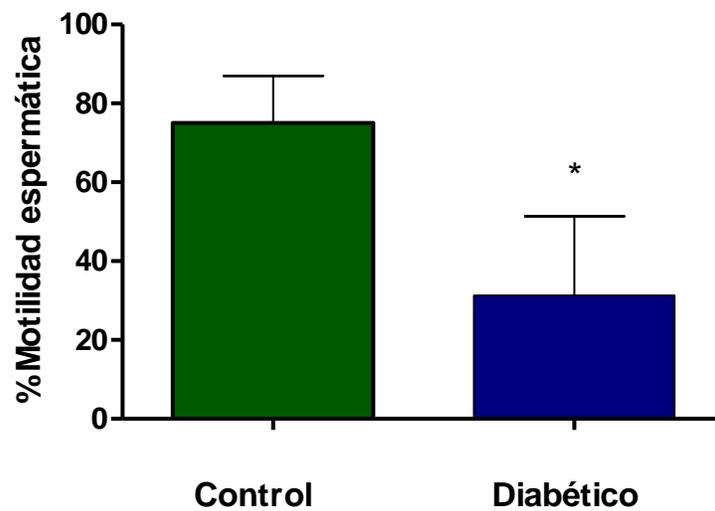


Fig. 10. Motilidad espermática. Los resultados fueron descritos como la media más menos de la desviación estándar ($X \pm DE$)

*Se consideró un valor $p < 0.05$ como significativo (t de student) vs el control.

9.3 Viabilidad espermática

El análisis de la viabilidad espermática mostró una disminución significativa ($t_{(0.05, 2)} = 6.653$, $p = 0.0003 < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides viables obtenidos de los animales diabéticos ($\bar{x} = 43.8 \pm 6.74$) al compararlos con los espermatozoides de los animales control ($\bar{x} = 78.7 \pm 10.26$), (Fig. 11).

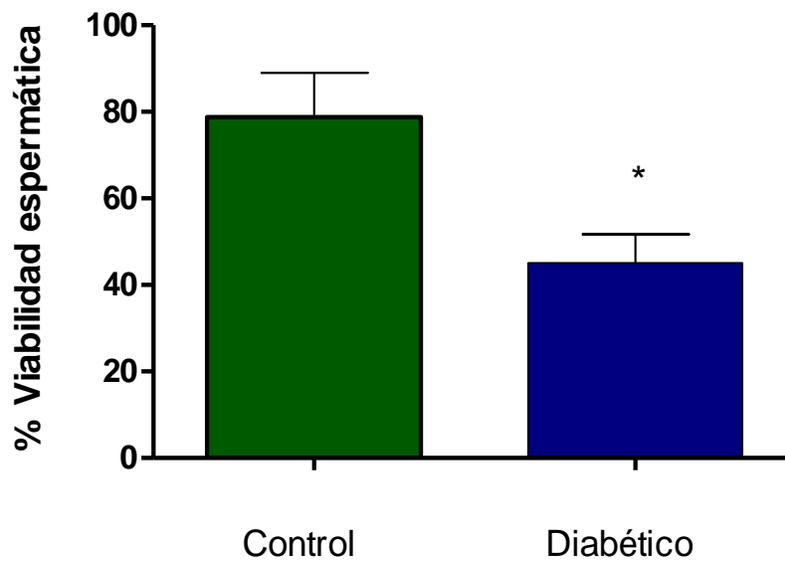


Fig. 11. Viabilidad espermática. Los resultados fueron descritos como la media más menos de la desviación estándar ($X \pm DE$)

*Se consideró un valor $p < 0.05$ como significativo (t de student) vs el grupo control.

9.4 Integridad de la membrana espermática

Los resultados obtenidos del análisis de la integridad de la membrana espermática, muestran una disminución significativa ($F_{(40,12)}=51.72$, $p=0.001<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada en ratones diabéticos ($\bar{x} = 53.6 \pm 3.4$) en comparación con las células provenientes de animales control ($\bar{x} = 31.7 \pm 4.65$).

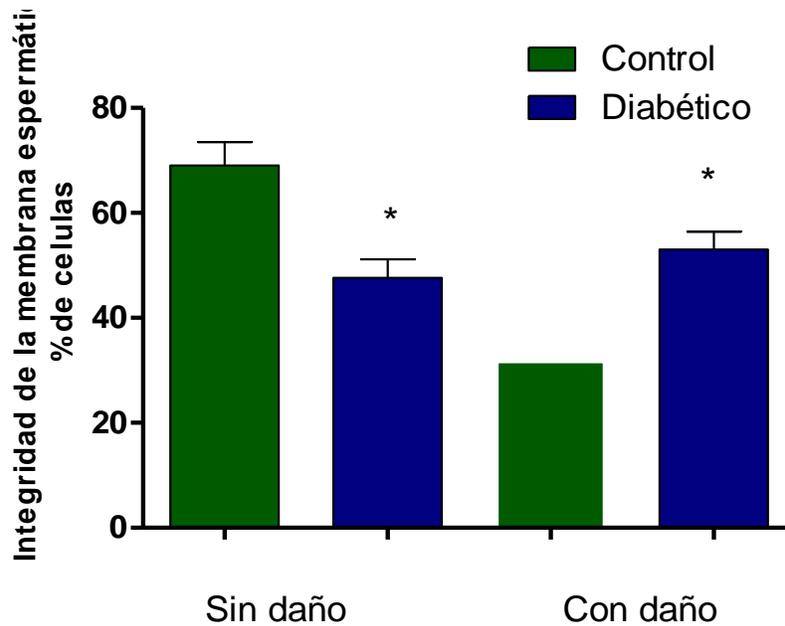


Fig. 12. Integridad de la membrana espermática. Los resultados fueron descritos como la media más menos de la desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$)

*Se consideró un valor $p < 0.05$ como significativo (ANOVA y Tukey) vs el grupo control.

9.5 Reacción acrosomal espontánea

El análisis del porcentaje de la pérdida de acrosoma mostró que al tiempo 0, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los espermatozoides de los animales control ($\bar{x} = 15.45 \pm 3.17$) y diabéticos ($\bar{x} = 19.72 \pm 3.16$), mientras que después de 1 hora y de 2 horas de incubación, se observó un porcentaje significativamente ($F_{(5,11)} = 128.4$ $p=0.0001 < 0.05$) mayor de pérdida de acrosoma en los espermatozoides de los animales diabéticos (1 hora: $\bar{x} = 40.63 \pm 6.74$; 2 horas: $\bar{x} = 67.3 \pm 6.57$) al compararlos con los espermatozoides de los animales control (1 hora: $\bar{x} = 24.63 \pm 4.29$; 2 horas: $\bar{x} = 30.45 \pm 6.02$).

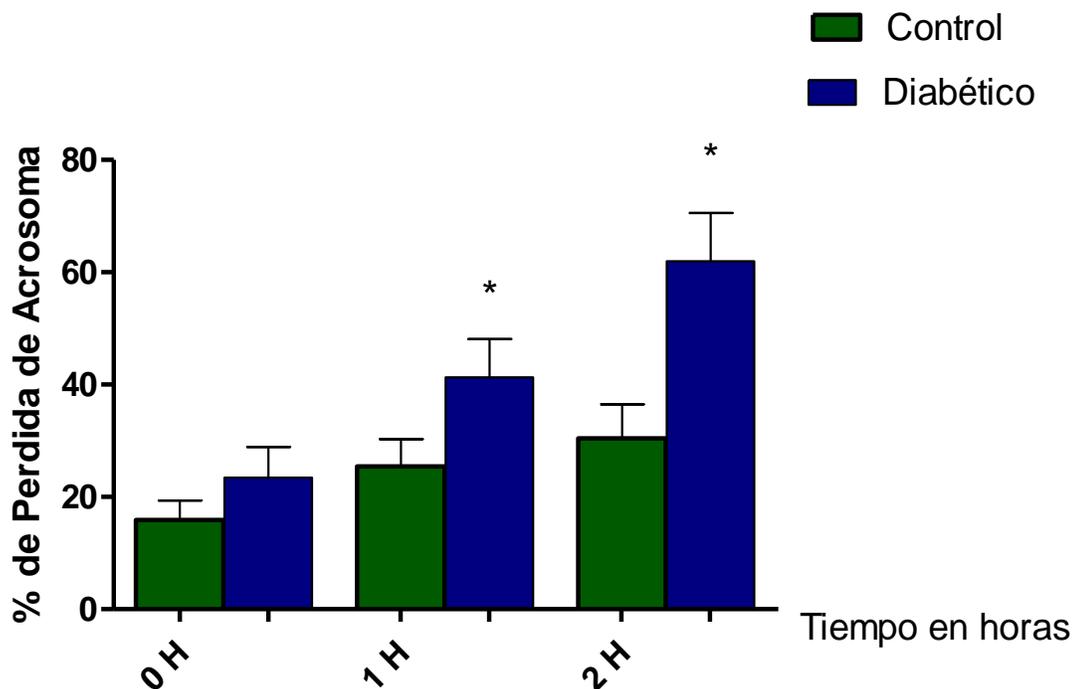


Fig. 13. Pérdida de acrosoma. Los resultados fueron descritos como la media más menos de la desviación estándar ($X \pm DE$) y se consideró un valor $p < 0.05$ como significativo (ANOVA y Tukey).

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el daño que ocasiona la diabetes inducida con STZ en ratones macho de la cepa CD1+ a nivel reproductivo. Para tal fin, se evaluaron diversos parámetros de la calidad espermática como fueron la concentración, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides. Además, se analizó el efecto que ocasiona la DM sobre la integridad de la membrana mediante el Host test y la reacción acrosomal.

Al evaluar la calidad espermática, se observó que la DM ocasiona una disminución significativa de la concentración espermática en comparación con el grupo control. Efectos similares fueron observados en la motilidad, donde se obtuvo un porcentaje de motilidad espermática significativamente más bajo en los animales diabéticos respecto al control. En cuanto a la viabilidad de los espermatozoides, también se observó una disminución significativa en las células obtenidas de los animales diabéticos con respecto a los espermatozoides obtenidos de los animales control.

En estudios similares con espermatozoides de distintas especies de mamíferos, incluyendo los espermatozoides de humanos, se han encontrado daños ocasionados por la DM a nivel reproductivo. Agbaje y cols., (2007) realizaron un trabajo con humanos diabéticos y encontraron que a pesar de que el volumen de semen en hombres diabéticos fue significativamente menor que los controles (2.6 vs 3.3 ml), no hubo diferencias significativas en la concentración ni en la morfología espermática o en su capacidad para moverse. Por otra parte, Arikawe y

cols., (2006), mostraron que en ratas con diabetes inducida por Alozano, parámetros del análisis espermático, como la motilidad y la concentración espermática fueron significativamente diferentes en comparación a los controles, siendo los parámetros de los animales diabéticos más bajos en motilidad y concentración espermática, resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Adicionalmente, Shrilatha y Muralidhara (2007), analizaron los efectos de la diabetes en los testículos y espermatozoides de ratones, utilizando STZ (150 mg/kg) como medio inductor y observaron una disminución en la motilidad y viabilidad espermática en los animales diabéticos en comparación al grupo control, de igual manera que en los resultados obtenidos en este trabajo.

Se ha descrito que en los animales diabéticos ocurren anomalías en la función testicular y en la espermatogénesis, reduciéndose la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ ATPasa y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en el epidídimo y en los espermatozoides, provocando así una alteración en las condiciones esenciales que el espermatozoide necesita para adquirir la motilidad y la capacitación (Scarano *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Mangoli y cols., (2013), donde se trataron ratones macho adultos con 250 mg/kg de STZ para inducir diabetes, se encontró una disminución significativa en los parámetros de motilidad, viabilidad y una alteración de la morfología de los espermatozoides de los ratones diabéticos respecto al grupo control, generando cambios en la regulación de la función de las células de Leydig, afectándose la producción de las gonadotropinas LH y FSH, por lo cual se presenta una menor producción de testosterona. Adicionalmente, se ha observado que la diabetes inducida por STZ

causa cambios importantes en las células de Leydig (Alves *et al.*, 2013, Bestetti *et al.*, 1985). Estas alteraciones tienen un efecto directo sobre el funcionamiento testicular en general, sobre todo en la espermatogénesis (Ballester *et al.*, 2004; Chiodini *et al.*, 2006).

En este trabajo también se evaluó el daño ocasionado por la diabetes a la integridad de la membrana plasmática espermática, mediante la exposición de las células a condiciones hipo-osmóticas; los resultados mostraron un porcentaje significativamente más alto de espermatozoides con la membrana dañada en los ratones diabéticos en comparación a las células provenientes de los animales control. Se ha postulado que el daño a la membrana de los espermatozoides de los animales diabéticos es causado por el estrés oxidativo. (Giribabu *et al.*, 2014).

Del mismo modo se evaluó la presencia de la reacción acrosomal espontánea a tres tiempos diferentes (0, 1 y 2 horas). Después de 1 hora y de 2 horas de incubación, se observó un porcentaje significativamente mayor de pérdida del acrosoma en los espermatozoides de los animales diabéticos al compararlos con los espermatozoides de los animales control.

Ya se ha postulado que una consecuencia importante de la DM es la generación de estrés oxidativo el cual ocasiona una disminución en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (La Vignera *et al.*, 2012). Los resultados de la prueba hipo-osmótica y de la pérdida del acrosoma nos indican que la diabetes tiene un efecto directo sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y este efecto puede estar mediado por el daño oxidativo causado por las EROS que se generan de

manera excesiva por la diabetes. En algunos estudios se indica que las células espermáticas de los ratones se ven afectadas directamente por la DM que ocasiona un daño a nivel celular mediante el estrés oxidativo, afectando diferentes procesos celulares como la capacitación, la motilidad y la reacción acrosomal (Roessner *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2012). Adicionalmente, un estudio realizado en hombres en edad reproductiva reportó que el estrés oxidativo afecta negativamente la capacidad de fecundar de los espermatozoides, por lo que los espermatozoides de hombres con niveles más altos de EROS presentan daño en la membrana celular y problemas en la motilidad (Morielli y O'Flaherty, 2015).

Se ha comprobado que la DM inducida por STZ provoca la peroxidación de lípidos, la cual es considerada como la principal manifestación de daño oxidativo, el cual puede provocar la pérdida total de la fluidez e integridad de la membrana celular del espermatozoide induciendo una disminución de la motilidad, alteración de la morfología y la baja capacidad de fecundación, provocando así un deterioro e ineficiencia en su potencial de acción evitando que el espermatozoide lleve a cabo adecuadamente los procesos metabólicos, induciendo a los espermatozoides a un daño celular irreversible, que los conduce a la apoptosis (Baumber *et al.*, 2003; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2008; Martínez-Loredo 2011; Aitken 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la DM inducida por STZ ocasiona daños en la calidad del espermatozoide alterando de manera negativa su movilidad y viabilidad y ocasionando daños a su membrana celular a través de la generación de EROS y estrés oxidativo, lo cual altera principalmente la reacción acrosomal, disminuyendo así su capacidad para fertilizar al óvulo.

11. CONCLUSIONES

- La diabetes inducida con STZ afecta significativamente la concentración espermática.
- En ratones con diabetes inducida se ve afectada significativamente la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides.
- La diabetes inducida con STZ provoca daño a nivel de la membrana plasmática de los espermatozoides.
- La diabetes inducida afecta significativamente la presencia de la reacción acrosomal.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agbaje, M., D. A. Rogers., C. M. McVica., N. McClure., A. B. Atkinson., C. Mallidis y S. E. Lewis. 2007. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function, *Human Reproductive* 22: 1871-1877.
- Aitken, R., T. B. Smith., M. S. Jobking., M. A. Baker y G. de Ilulis. 2014. Oxidative stress and male reproductive health, *Asian Journal of andrology* 16: 31-38.
- Alves, M. G., A. D. Martins., J. E. Cavaco., S. Socorro y P. F. Oliveira. 2013. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function, *Tissue Barriers* 1: 1–10.
- Amaral, .S., P.J Oliveira y J. Ramalho. 2008. Diabetes and the imparment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *In: Current Diabetes*, Amaral, .S. (ed.). University of Coimbra, Coimbra, Portugal. p. 46-54.
- American Diabetes Association (ADA). 2008. Economic Cost of Diabetes in the EUA in 2007. American diabetes association, California, Alexandria, EUA. p. 150.
- Arenas, E., A. Cambrón., D. Ambríz., P. J. P. Zuñiga., A. Rodríguez y T. Rosado. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide, *Contactos* 78: 5-11.

- Arikawe, A. P., A. O. Daramola., A.O. Odofin y L. F. Obika. 2006. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats, *African Journal of reproductive health* 10: 106-113.
- Arora, S., K.O. Shfeesh y O. Vohora. 2009. Characterization of streptozotocin induced diabetes mellitus in Swiss albino mice, *Journal of pharmacology* 3: 81-84.
- Audesirik, T. G., B. Audesirik y J. Beyrs. 2003. *Biología: la vida en la tierra*. Pearson educación, México, D.F. 980 p.
- Ballester, J., M. C. Muñoz., J. Domínguez., T. Rigau., J. J. Ginovart y J. E. Rodríguez. 2004. Insulin dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH linked mechanism, *Journal of andrology* 25: 700-719.
- Baumber, J., A. Barr., J. J Linfor y S. A. Meyers. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa, *Journal of andrology* 2: 621–628.
- Bestetti, G., V. Locatelli., F. Tirone., G.L. Rossi y E. E. Muller. 1985. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamic-pituitary axis of male and female rats, *Endocrinology* 117: 208–216.
- Camacho, L. y M. Esteban. (2010). Diabetes y radicales libres. *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. García (eds.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. p. 105-121.

- Cardona, W. D., A. Olivera y A. P. Cadavid. 2006. Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide, *Andrología* 52: 501-510.
- Castillo, J. A. 2009. Fisiopatología de la diabetes mellitus. Fascículo de endocrinología para médicos. Asociación Colombiana de endocrinología 3: 18-21.
- Castillo, J. M. 2006. Efecto del malati6n en la capacitaci6n y reacci6n acrosomal de espermatozoides de cerdo. Tesis de Licenciatura. Universidad Aut6noma Metropolitana, M6xico D.F, 70 p.
- Cheng, C. Y. y D. D. Mruck. 2010. The biology of spermatogenesis: the past, present and future, *Philosophical transactions of the royal society* 365: 1459-1463.
- Chiodini, I. D., S. V. Lembo., P. Morelli., F. Epaminonda., B. Coletti., A. Masserini., M. Scillitani y G. Adda. 2006. Hypotalamic-pituitary-adrenal activity in type 2 diabetes mellitus: role of autonomic imbalance, *Metabism clinical of experimental* 55: 1135-1140.
- Curtis, H., P. Bolaños., J. Ar6oz y V. Behrns. 2011. *Biología*. Editorial medica panamericana. S.L, Madrid Espa±a. p. 1160.
- D6az, M. C. 2008. P6ncreas: Anatomía e histología. *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. Garc3a (eds.) Universidad Aut6noma del Estado de Hidalgo, M6xico. p. 23-28.

- Ducci, M., A. Gazzano., C. Villani.; V Cela., P. G. Artini., F. Martelliy y A. R. Genazzani. 2002. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 102: 53-56.
- Eddy, E. 2006. The Spermatozoon. *In Physiology of Reproduction*, Neill, J.M. (ed.), Elsevier, Birmingham, Alabama. p. 3-38.
- Eleazu, C. O., K. U. Eleazu., S. Chukwuma y U. N. Essein. 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans, *Journal of diabetes and metabolic disorders* 12: 2-7.
- Elsner, M., B. Guldbakke., M. Tiedge y S. Lenzen. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta cell toxicity of streptozotocin, *Diabetología* 43: 1528-1533.
- Esquivel, C. J., J. Esquivel., A. M. Fernández., A. Tellez y J. A. Morales 2010. Páncreas: Fisiología *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. García (eds.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. p. 29-42
- Flores, C., Y. Marquez., O. López., C. Mendoza., V. Colmenarez y Y. Salas. 2006. Caracterización de la Diabetes mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones *nmri*, *Gaceta de ciencias veterinarias* 12: 13-18.
- Florman, H. M. y T. Ducibella 2006. Fertilization in Mammals. *In Physiology of Reproduction*, Neill, J.M. (ed.), Elsevier, Birmingham, Alabama. p. 55-94

- Fuentes, M. F., R. A. Mendoza., A. L. Rosales y R. A. Cisneros. 2008. Guía y manejo de animales de laboratorio: ratón. Instituto nacional de salud, Lima, Perú. 58p.
- Geisinger, A. 2003. Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis en rata. Tesis de Doctorado. Universidad de la Republica, Uruguay. 75 p.
- Gil, L. E., M. J. Sil., L. Aguilar., S. Echeverria., F. Michaus y L. P. Torres. 2013. Perspectivas de la diabetes mellitus tipo 2 en el Instituto Mexicano del Seguro Social, Revista médica del IMSS 5: 58-63.
- Giribabu, N. K., S. Kumar., S. Rekha., R. Muniandy y N. Salleh. 2014. *Chlorophytum borivillianum* (Safed Musli) root extract prevents impairment in characteristics and elevation of oxidative stress in sperm of streptozotocin-induced adult male diabetic Wistar rats, BMC Complementary and alternative medicine 14: 291-302.
- Grier, H., F. lo Nostro. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: The unifying concept. 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway, University of Bergen 53: 538-550.
- Hall, J. E. (2011). Tratado de fisiología médica. Madrid, España, Elsevier. 75 p.
- Havenaar, R., U. C. Meijer., D. B. Morton., J. Retskes-Hortinga y P. Swarti. 2003. Biología y manejo de los animales de laboratorio. *In*: Principios de ciencia animal en laboratorio, Zúñiga, M.J. (ed.). Elsevier, Granada, España. p. 21-82.

- Hernández, S. 2006. El modelo animal en las investigaciones biomédicas, *Biomedicina 2*: 252-256.
- La Vignera, S., R. Condorelli., E. Vicari., R. D'agata y A. Calogero. 2012. Diabetes mellitus and sperm parameters, *Journal of andrology 33*: 145-153.
- López, E., B. Stone., C. M Navarro y R. P. Marrs. 2001. Impacto del ácido ascórbico y su correlación con la reacción acrosomal, movilidad espermática, acridina naranja y prueba de penetrancia de huevo de hámster, *Anales Médicos 6*: 76-82.
- López, M.A., A. Urbano y M. Cárdenas. 2012. Manual de laboratorio para el análisis de semen. Onniascience, Andalucía, España. 116 p
- Mahmoud, A., B. Zuhair., R. Khaaled y S. Halaweh. 2009. La inducción de la diabetes mellitus en ratas utilizando estreptozotocina intraperitoneal: Una comparación entre dos cepas de ratas, *Revista Europea de Investigación Científica 32*: 398-402.
- Mangoli, E., A. Reza., M. Anvari y M. Pouretezari. 2013. Effects of experimentally-induced diabetes sperm parameters and chromatin quality in mice, *Iranian Journal of Reproductive medicine 11*: 53-60.
- Martínez-Loredo, E. 2011. Efecto de la afinina obtenida de las raíces de *heliopsis longipes* (a. gray) s.f. blake sobre la calidad y la integridad de la membrana en espermatozoides de ratón cd1+ *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 60p

- Morielli, T. C y T. O'Flaherty. 2015. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa, *The Journal of society for reproduction and fertility* 149: 113-123.
- Nava, M. y M. Veras. 2010. Epidemiología de la Diabetes *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. García (eds.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. p. 57-64.
- Neill, J. M. 2006. *Physiology of Reproduction*. Elseiver, Birmingham, Alabama. 1251 p.
- Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2011. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. Omega, San Luis, EUA. 1269 p.
- Nieto, J. J. 2010. Diabetes en el tiempo. *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. García (eds.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. p. 47-56
- Norma Oficial Mexicana, NOM-015-SSA2-1994. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria.
- Okabe, M. y J. M. Cummins. 2007. Mechanism of sperm-eggs interactions emerging from gene manipulated animals. *Celluar and molecular life Sciences* 64: 1945-1958.
- Olazo, A. 2010. Efecto de la obesidad y la inducción de diabetes sobre valores de glucosa, colesterol y triglicéridos en modelo de rata. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana, México. 112 p.

- Organización Panamericana de la salud (PAHO). (2012). Consultado 04-06-2014 en <http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?lang=es>
- Palomino, M. A., C. Revilla., A. Cárdenas., A. C. Polanco y S. Islas. 1998. Effect of induced diabetes on reproduction and development, *Revista Mexicana de Ginecología y Obstetricia* 66: 403-406
- Pereira, J. L. y A. González. 2002. Principios generales de anestesia. *In Farmacología y terapeuta veterinaria*, Landoni. L. T. Martín (eds). McGraw-Hill, Interamericana. Madrid, España. p. 137-147.
- Plascencia, E. S. S. R. 2006. Regulación de la COX-2 por el NaCl en la macula densa durante la diabetes mellitus inducida en ratas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 72 p.
- Ramos, H.G y J. Domingo. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Clínica veterinaria* 6: 347-377.
- Razgado, P. 2010. Diabetes: Definición, diagnóstico y clasificación. *In Diabetes*, Morales, J.A y B.A. García (eds.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. p. 83-103.
- Roessner. C., U. Poaxn., J. Kratzsch,. H. J. Glander y S. Grunewald. 2012. Sperm apoptosis signaling in the diabetic men. *Reproductive biomedicine* 25: 292-294.
- Roy, S., N. Rahaman., F. Ahmed., S. Metya y S. Sannigrahi. 2012. Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative

stress in streptozotocin induced diabetic rats: naringenin prevents diabetic rat testicular damage. *Journal of applied biomedicine* 11: 193-208.

- Salinas, N. 2009. Efecto de la glicina y *Curbita ficifolia bouché* sobre la glucificación de proteínas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 100 p.
- Sánchez-Gutiérrez, M., E. A. García, J. A. Izquierdo y L. M. del Razo. 2008. Effect of dietary selenium deficiency on the *in vitro* fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biology and Toxicology* 24: 321-329.
- Scarano, W. R., A. G. Messias., S. U. Oliva., G. R. Klinefelter y G. Kempinas. 2005. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *International Journal of Andrology* 29: 482-488.
- Shrilatha, B. y V. Muralidhara. 2007. Early oxidative stress in testis and epididimal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology* 23: 578-587.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat páncreas. *Physiological research* 50: 536-546.
- Torrades, S. 2003. Terapia génica para curar la diabetes. *Offarm* 22: 116-121.
- Ventura, J. 2013. Elaboración de una jalea adicionada con fotoquímicos de cáscara de *Purica gratium* L. con posible utilidad contra la diabetes mellitus. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 114 p.

- Ventura, J., V.D. Boone., C.N. Aguilar., R. Ramos., E. Vega., E. Campos y F. Alarcón. 2011. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice, *Pharmacology society* 54: 5-9.
- World Health Organization (WHO). 2010. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge University. 135 p.