



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

La eplerona eplerona revierte la inflamación testicular mejorando la calidad espermática epididimal inducida por estrés crónico variable en ratas jóvenes adultas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez

Directora académica

Dra. Leticia Nicolás Toledo



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

La eplerona eplerona revierte la inflamación testicular mejorando la calidad espermática epididimal inducida por estrés crónico variable en ratas jóvenes adultas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez

Comité Tutorial

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Dra. Marcela Arteaga Silva

Dra. Yeimy Mar De León Ramírez

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre 2024

FINANCIAMIENTO

Este proyecto de investigación fue realizado en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) con número de referencia **001869** del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT). A su vez, el proyecto fue financiado por CONAHCYT con una donación otorgada a la Dra. Leticia Nicolás Toledo (**No. 287762**), y una beca de estudios de posgrado con clave **1232927** dirigida a Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez.

OFICIO DE AUTORIZACIÓN



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC)
Maestría en Ciencias Biológicas
Proceso: Posgrado CTBC
Registro: Carta Autorización de Impresión de Tesis

Código: 503-RGE-26

Revisión: 03

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“La eplerona revierte la inflamación testicular mejorando la calidad espermática epididimal inducido por estrés crónico variable en ratas jóvenes adultas”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., A 22 DE OCTUBRE DEL 2024


DRA. ROSAMÓNICA LUCIO LUCIO


DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO


DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA


DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA


DR. ELIUT PÉREZ SÁNCHEZ

OFICIO DE INFORME DE SIMILITUD

COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez titulada “La eplerona previene la inflamación testicular y la baja calidad espermática epididimal inducida por aldosteronismo en ratas jóvenes adultas estresadas” para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de octubre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (8%). Los textos detectados con similitud están marcados en palabras técnicas comúnmente utilizadas, redacción de resultados y metodología, correspondiendo a lenguaje común, por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 8 de octubre de 2024



Dra. Leticia Nicolás Toledo
Directora de tesis

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitirme formar parte de la comunidad estudiantil de la Maestría en Ciencias Biológicas, así como permitir el desarrollo del presente proyecto en sus instalaciones.

A CONAHCYT por el otorgamiento de la beca **1232927**, permitiendo solventar gastos personales y académicos en el periodo 2022-2024.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo, investigadora perteneciente al cuerpo académico del posgrado, por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en su grupo de investigación para el desarrollo este proyecto. Reconozco el gran ejemplo que usted ha sido para mí en muchos aspectos, así como el apoyo y conocimientos brindados durante estos dos años de formación, que son de gran aporte para mi crecimiento académico y personal. Mucha gratitud, cariño y admiración para usted Dra. Lety.

A mi comité tutorial, Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dra. Marcela Arteaga Silva y la Dra. Yeimy Mar De León Ramírez, que, con su amplio conocimiento y experiencia, permitieron enriquecer este trabajo de investigación, así como mi formación académica durante la maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, que son mi mayor sostén emocional.

Agradezco principalmente a Andrea, Alonso, Kaphi, Carmen, Pancho, Marthita, Aminotep, Fidel y Coco, que estuvieron siempre apoyándome incondicionalmente en el cuidado y crianza de mi pequeña Naho. Sin todos ustedes no hubiera logrado llegar hasta aquí, y no me alcanzaría la vida para compensar todo su cariño y lo que han hecho por nosotras. Gracias por permitirme avanzar.

Al grupo de trabajo y compañeros de laboratorio:

Dr. Eliut Pérez Sánchez, agradezco infinitamente su apoyo en el ámbito académico y personal. Es un gran ejemplo a seguir como investigador y persona, extendiendo la mano siempre sin ver a quién y con gran empatía. Admiración, estima y gratitud total a su persona.

Julio, Adri Méndez, Jhonny, Brayan y Jafette, que hicieron de mi estancia en CTBC una experiencia agradable. La confianza y amistad que creamos es tremenda, si algo he de admirar y recalcar de ustedes es que son un equipazo. Los estimo demasiado.

A mi mejor amiga Genesis Rubi Castillo Perez. Gracias por apoyarme y animarme a avanzar desde mis inicios en la maestría. Fue muy emocionante y gratificante para mí volverte a encontrar en el posgrado, eres una persona grandiosa, tan noble, fuerte, amable y centrada. Que dicha la mía de seguir creando recuerdos muy lindos y divertidos contigo, ¿quién creería todo lo que hemos recorrido desde adolescentes, y ver que cursamos ahora un posgrado? Inmenso orgullo y cariño hacia tu persona siempre Boni, te quiero mucha amiga.

DEDICATORIA

A Dios, por siempre acompañarme, protegerme, sanarme y acomodar todo a su manera, permitiéndome avanzar y culminar este ciclo.

A mi princesa Gianna Nahomi. Tú eres el motor de cada meta lograda, y culminar este trabajo de investigación no es la excepción. No cabe duda que el tiempo es sabio, y en este momento puedo entender que no te apresuraste en llegar a mi vida, fue justo a tiempo para mostrarme la capacidad que tengo para enfrentar cada obstáculo, para levantarme en cada caída, y la fortaleza que tenemos juntas, pues en mis momentos más vulnerables estás tú, sonriéndome de oreja a oreja sin entender que pasa por mi cabeza, abrazándome y acariciando mis mejillas con tus manitas tan inocentes e indefensas, dándome una recarga de esperanza, amor y ánimo para seguir.

He puesto de lado nuestro tiempo juntas, sin embargo, me sorprende y al mismo tiempo se me apachurra el corazón al darme cuenta que tan chiquitita tuviste que entender que, aunque éramos inseparables, era necesaria mi ausencia por muchas horas. Eso te ha hecho tan independiente, lista y muy valiente porque no podías despegarte de mamá ni un segundo, y a pesar de todo lo vivido, tu amor por mí sigue siendo inmenso. Quiero que esto te motive a avanzar y nunca rendirte, que alcances tus objetivos siendo consciente de que estaré en cada paso para brindarte la mano cuando lo requieras. Eres lo más valioso en mi vida, agradezco y celebro la tuya siempre. Te amo con todo mi ser.

A Tita, papá Andrés y Bray, mi mayor ejemplo de superación y fortaleza. Hasta el cielo, con mucho cariño para ustedes.

RESUMEN

La infertilidad es la incapacidad de procrear cuando una pareja se somete a actividad sexual constante sin el uso de anticonceptivos, y sin el éxito reproductivo. Los casos de infertilidad masculina abarcan hasta el 50% de los casos totales en la actualidad, inducida por diversas etiologías, entre ellas el estrés. El estrés crónico propicia la activación prolongada del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) para la síntesis de la hormona del estrés como el cortisol en humanos y corticosterona en roedores. En nuestro grupo de trabajo observamos que en la rata macho Wistar en etapa juvenil, el modelo de estrés crónico por restricción de movimiento y un modelo de estrés crónico variable (ECV), aumenta los niveles de aldosterona sin afectar los niveles de corticosterona. Sin embargo, este generó alteraciones sobre el arreglo histológico renal y hepático, así como inflamación y fibrosis. Así mismo, mostramos que el hiperaldosteronismo inducido por el ECV disminuye la movilidad, viabilidad, concentración y morfología normal, incrementando defectos de cabeza y flagelos de espermatozoides obtenidos de la cauda epididimaria, genera inflamación testicular y estrés oxidativo espermático. Por lo que el objetivo de este trabajo es determinar si la eplerona, antagonista de los receptores de mineralocorticoides previene la inflamación testicular y estrés oxidativo espermático mejorando la calidad espermática epididimal inducido por ECV en ratas jóvenes adultas.

Se utilizaron 12 ratas macho Wistar de 51 días de edad, las cuales se distribuyeron en dos grupos experimentales: Control más administración de vehículo (1mL de agua purificada) (C+Ve, n=6) y estrés crónico variable más eplerona (ECV+Ep, n=6), fármaco antagonista de la actividad mineralocorticoide, en dosis de 100 mg/Kg de peso corporal; tanto eplerona como el vehículo se administraron mediante una sonda orogástrica de 5 FR de diámetro. Así mismo, se aplicó un factor estresor por día (reducción de espacio en caja limpia y en caja sucia durante 5 horas, nado forzado en agua fría a 18°C y en agua caliente a 28°C por 10 minutos y restricción de movimiento durante 3 horas) Cada uno se efectuó en horarios distintos, de lunes a viernes, durante 4 semanas y 1.5 horas después de la administración de eplerona.

Al finalizar el experimento en el día 81 de edad postnatal, se realizó la eutanasia de los dos grupos, y se extrajeron ambos testículos y epidídimos. De la cauda epididimaria izquierda se obtuvo la muestra de espermatozoides para analizar la calidad espermática (movilidad,

viabilidad, concentración y morfología), así como la determinación de estrés oxidativo, actividad antioxidante y apoptosis celular. El testículo derecho fue utilizado para analizar el arreglo histológico, utilizando cortes en parafina de 5 μm de espesor y teñidos con hematoxilina y eosina. Se analizó el número de túbulos entre ambos grupos, también el área tubular, del epitelio germinativo, del lumen y del espacio intersticial. Así mismo, se examinó la expresión de TNF- α en cortes testiculares.

Los resultados de la calidad espermática muestran que la eplerona administrada en el grupo ECV + EP disminuye los parámetros de viabilidad y concentración de los espermatozoides. Sin embargo, se produjo elevada peroxidación lipídica, sobreactividad de las enzimas antioxidantes y apoptosis celular sin efectos sobre la histología testicular al evaluar el número de túbulos, área tubular, del lumen e intersticial, ni en la expresión de TNF- α testicular. Estos hallazgos dan indicio de que la dosis elevada de eplerona administrada en el grupo ECV+Ep generó efectos citotóxicos sobre los espermatozoides epididimarios, incrementando estrés oxidativo y muerte espermática, por lo que la concentración y viabilidad fue menor en dicho grupo experimental. Al no hallar alteraciones sobre la histología del testículo, es importante analizar histología epididimaria, considerando que los efectos que estén alterando a los espermatozoides son generadas por disrupción en el funcionamiento correcto del epidídimo tras el bloqueo de la actividad mineralocorticoide a través de su receptor. Dicha actividad es indispensable para la maduración y almacenamiento de los gametos masculinos. Así mismo, las altas dosis de eplerona podrían actuar tóxicamente sobre los receptores androgénicos la fisiología epididimal, inhibiendo probablemente vías indispensables para la maduración espermática.

Palabras clave: Calidad espermática, eplerona, estrés, hiperaldosteronismo.

GLOSARIO

3 β -HSD: Enzima 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa

17 β -HSD3: Enzima 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3

AC: Adenilatociclasa

ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

AT1: Receptor de angiotensina tipo 1

ATP: Adenosín trifosfato

CAD: DNasa activada por caspasa

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico

CAT: Catalasa

CAS 3: Caspasa 3

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

ECV: Estrés crónico variable

ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2

FRP: Potencial reductor férrico

FSH: Hormona folículo estimulante

GC: Glucocorticoides

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HPA: Eje Hipotálamo- Pituitaria- Adrenal

HPG: Eje Hipotálamo- Pituitaria- Gónadas

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LH: Hormona luteinizante

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MC: Mineralocorticoides

MDA: Malondialdehído

NF- κ B: Factor nuclear kappa beta

NPV: Núcleo paraventricular hipotalámico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PKA: Proteína quinasa A

POMC: Proopiomelanocortina

PRL: Hormona Prolactina

SOD: Superóxido dismutasa

RAAS: Sistema renina angiotensina aldosterona

REL: Retículo endoplasmático liso

RM: Receptor de mineralocorticoides

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Sry: Factor de la región de determinación sexual del cromosoma Y

STAR: Proteína reguladora aguda esteroideogénica

TLR 3 y 4: Receptor tipo Toll tipo 3 y 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR1: Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1

TSPO: Proteína translocadora

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
<i>1.1 Morfología testicular</i>	17
<i>1.2 Morfología espermática</i>	20
<i>1.3 Espermatogénesis</i>	23
<i>1.4 Esteroidogénesis</i>	25
<i>1.5 Desarrollo gonadal prenatal y postnatal</i>	27
<i>1.6 Modelo de estrés crónico variable</i>	27
<i>1.7 Inflamación y apoptosis</i>	30
<i>1.8 Influencia del estrés crónico sobre la calidad espermática</i>	33
<i>1.9 Estrés, eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA)</i>	33
<i>1.10 Generalidades de la aldosterona y receptores de mineralocorticoides en testículo y epidídimo</i>	38
<i>1.11 Eplerona</i>	42
2. ANTECEDENTES	44
<i>2.1 Estrés, aldosterona y calidad espermática</i>	44
3. JUSTIFICACIÓN	45
4. HIPÓTESIS	46
5. OBJETIVOS	46
<i>5.1 General</i>	46
<i>5.2 Específicos</i>	46
6. METODOLOGÍA	47
<i>6.1 Diseño experimental</i>	47
<i>6.2 Estímulo de ECV</i>	48

6.3 Administración de eplerona	49
6.4 Obtención de los testículos	50
6.5 Calidad espermática epididimaria	50
6.5.1 Movilidad.....	50
6.5.2 Viabilidad	50
6.5.3 Concentración espermática	51
6.5.4 Morfología espermática	51
6.6 Análisis histológico del testículo	51
6.7 Técnica de Inmunohistoquímica sobre expresión de TNF-α	53
6.8 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	53
6.9 Actividad de superóxido dismutasa	54
6.10 Actividad de catalasa	54
6.11 Actividad potencial reductor férrico (FRP)	54
6.12 Análisis estadístico	55
7. RESULTADOS	55
7.1 Índices de crecimiento	55
7.2 Calidad espermática	56
7.3 Estrés oxidativo	59
7.4 Inmunohistoquímica	60
7.5. Histología testicular	61
8. DISCUSIÓN	64
9. CONCLUSIÓN	69
10. PERPECTIVAS	69
11. REFERENCIAS	69
12. PUBLICACIONES	83

13. ANEXOS.....	91
------------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, ha incrementado la infertilidad, afectando a más de 70 millones de personas en la población mundial. En particular al sector masculino con un 20% de casos como causa única, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que la prevalencia de infertilidad masculina ha aumentado al 50% de los casos (Fainberg y cols. 2019). La infertilidad se puede definir como la incapacidad de procrear dentro de un lapso de 12 meses, durante los cuales una pareja se somete a relaciones sexuales sin uso de preservativos (Choy y Eisenberg 2018). Una causa poco estudiada, que participa en el proceso de la infertilidad es la exposición constante al estrés, que actualmente se presenta por diversos factores como el desarrollo económico, social y laboral. El estrés propicia la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), ejerciendo una inhibición sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) que afecta la esteroidogénesis y suprime la espermatogénesis, debido a los bajos niveles de testosterona, generando alteraciones morfológicas y funcionales sobre las células de Sertoli y la barrera hematotesticular (Durairajanayagam 2018). Estudios realizados en hombres jóvenes han mostrado que el estrés disminuye significativamente la concentración espermática y movilidad, contribuyendo a la infertilidad (Nordkap y cols. 2020).

1.1 Morfología testicular

Los testículos son órganos que conforman el aparato reproductor masculino. En están ubicados en la bolsa escrotal, son estructuras ovoides con un tamaño aproximado de 2.5 cm de diámetro y 5 cm de longitud en edad adulta con peso aproximado de 15-20 g. Se encuentran debajo de la raíz del pene, externos a la cavidad abdominal, siendo la temperatura de los testículos más baja que la temperatura corporal favoreciendo así a la integridad espermática. El testículo derecho se ubica más arriba que el izquierdo y están suspendidos mediante el cordón espermático, y de fácil movimiento dentro de la bolsa escrotal (Tresguerres y cols. 2005). Son considerados como glándulas mixtas secretoras internas y/o externas. Cuando se habla de secreción interna, se refiere a que el testículo es capaz de secretar testosterona. En la secreción externa, se producen los gametos masculinos (Shalet 2009).

Los testículos se encuentran rodeados por dos capas serosas que conforman la túnica vaginal, y por una capa de tejido conectivo denominada túnica albugínea, que se extiende al interior de

éstos, convergiendo en el mediastino y que logra dividir a los testículos en pequeños lóbulos. La parte interna de dichos lóbulos se encuentra constituida por los túbulos seminíferos y epitelio germinal, donde se lleva a cabo la espermatogénesis, y únicamente entre el 10-15% de su composición está conformado por el intersticio, lugar donde se sintetiza la testosterona (Tresguerres y cols. 2005). Los túbulos seminíferos poseen una estructura hueca, cuyo centro denominado luz, está constituido por líquido testicular y espermatozoides. Sus paredes epiteliales están compuestas por células de Sertoli cuya función es favorecer a las células germinales en su desarrollo, y por su distribución en el epitelio germinativo permiten identificar dos compartimentos, basal y adluminal a partir de la barrera hematotesticular formada por las uniones adyacentes de las células de Sertoli. En el espacio intersticial, ubicado externamente a dichos túbulos y que separa a cada uno de ellos, se encuentran las células de Leydig, macrófagos, fibras nerviosas, fibroblastos vasos sanguíneos y linfáticos (Tresguerres y cols. 2005). Las células de Sertoli son las primeras en lograr una diferenciación notoria en la gónada fetal indiferenciada, lo que atribuye la formación de los cordones seminíferos, posteriormente de los túbulos, así como la diferenciación y función de las células de Leydig (Tresguerres y cols. 2005; Mäkelä y cols. 2019). Cabe mencionar que es la cantidad de células de Sertoli presente en cada testículo, la determinante del tamaño y del número de células germinales que pueden ser mantenidas durante la espermatogénesis y la producción de células germinales, que están organizadas en 14 etapas (I-XIV) a lo largo de los túbulos, cada una compuestas de 4 y 5 generaciones celulares que darán lugar a la siguiente etapa. En ratas este ciclo del túbulo seminífero es de 13 días aproximadamente, por lo que se requieren alrededor de cinco ciclos del túbulo seminífero para completar la espermatogénesis (Rosiepen y cols. 1994).

La estructura de los túbulos seminíferos se extiende por los conductos eferentes y la red testicular hasta la cabeza del epidídimo. El epidídimo es un órgano de forma tubular que se conforma por tres secciones: cabeza, ubicada en la parte superior del testículo, cuerpo y cola, extendidos a lo largo del borde posterior testicular, uniéndose al conducto deferente (Tresguerres y cols. 2005). El conducto deferente asciende por el canal inguinal hasta la cavidad abdominal, rodeando a la vejiga, hasta conectarse con los conductos eyaculadores, que convergen en la uretra (Tresguerres y cols. 2005).

En la parte inferior de la vejiga se pueden localizar las vesículas seminales; es un pequeño órgano en forma de bolsa que se conecta con los conductos eyaculadores, capaces de liberar una secreción viscosa y alcalina, constituida por fructosa, que brinda energía a los espermatozoides, prostaglandinas benéficas para la movilidad y viabilidad espermática, y fibrinógeno al que se le atribuye la capacidad coagulante del semen tras el eyaculado (Figura 1).

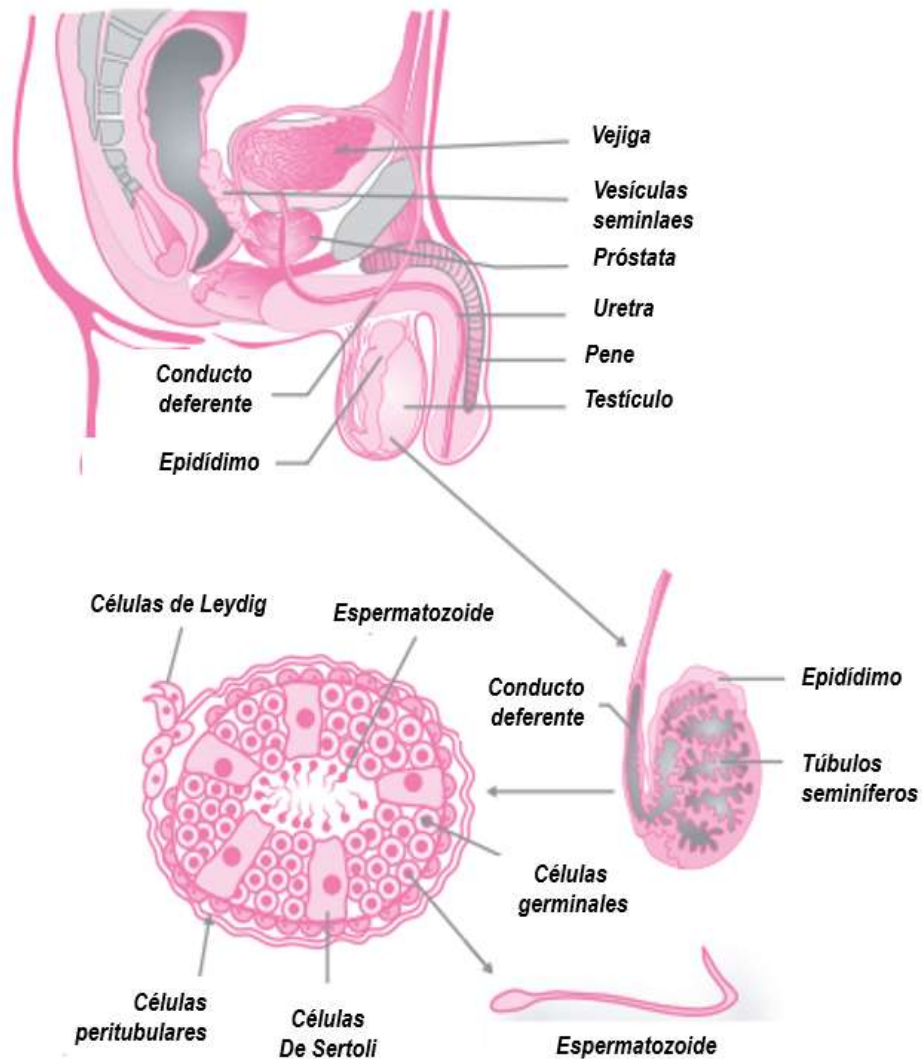


Figura 1. Arreglo testicular (modificado de Tresguerres y cols. 2005).

1.2 Morfología espermática

En humanos, el espermatozoide es una célula germinal móvil y de aproximadamente 60 μm de longitud, proveniente del epidídimo, consta de tres secciones morfológicas: cabeza, pieza media y flagelo. La cabeza del espermatozoide en humanos, es una estructura anisotrópica de longitud 3-5 μm , en forma de pera y posee un núcleo condensado, y el acrosoma situado en la parte superior de la cabeza, abarcando entre el 40-60% de su tamaño (Auger 2010).

La pieza media del espermatozoide se constituye por estructuras periaxonémicas como vainas mitocondriales y fibras densas externas. Las vainas mitocondriales se encuentran ordenadas en 10-12 patrones helicoidales (también conocidos como giros). Las fibras densas son estructuras constituidas por nueve columnas que se extienden desde la unión de la pieza media con la cabeza, hacia lo largo del flagelo. Estas son gruesas al inicio de su extensión y más estrechas al final, contribuyendo a la protección al espermatozoide frente al movimiento generado por su transporte en el epidídimo y la eyaculación, (Kumal y Singh 2021). El flagelo del espermatozoide es una estructura dividida en dos partes: inicial y parte final. La sección inicial del flagelo se constituye en toda su longitud por axonema y por estructuras periaxonémicas. El axonema es una estructura de nueve microtúbulos dobles externos, y un doblete central unidos por brazos de dineína, responsables del movimiento flagelar; la parte final únicamente posee axonema (Kumal y Singh 2021). La pieza principal del flagelo está conformada por una vaina fibrosa de dos columnas longitudinales que varían de tamaño y forma según la membrana plasmática (Figura 2; Kumal y Singh 2021).

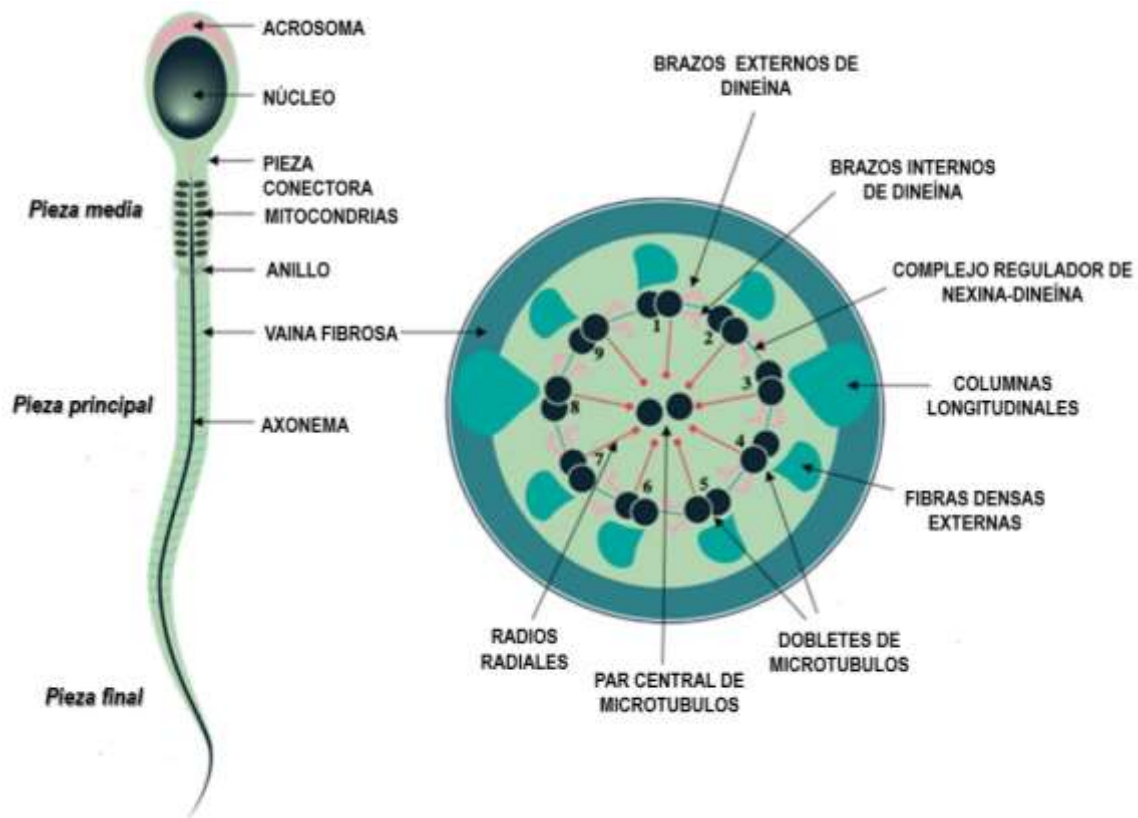


Figura 2. Estructura morfológica del espermatozoide en humanos (modificado de Touré 2019).

En ratas macho, el espermatozoide tiene una longitud entre 90 y 190 μm según la especie (Roldan y cols. 1992). La cabeza del espermatozoide es caracterizada por tener forma de gancho denominada perforatorio perteneciente a la teca perinuclear (Figura 3), generada durante la fase de elongación en la espermiogénesis (Protopapas y cols. 2019). Así mismo, está constituida por una estructura denominada manchete, la cual permite la formación correcta de la cabeza (Yogo 2022).

En la cabeza, se encuentra el ADN espermático compacto, cubierto de membrana nuclear, la teca perinuclear y el material acrosómico en la superficie nuclear formado por la fusión de vesículas proacrosómicas secretadas por aparato de Golgi (Yogo 2022).

La pieza media o cuello del espermatozoide es la estructura central entre la cabeza y el flagelo (Figura 4). En ésta se pueden encontrar los centriolos, entre la pieza de unión a la cabeza y los microtubulos flagelares. Dichos microtubulos están rodeados por una monocapa ordenada de

mitocondrias las cuales están separadas de la membrana citoplasmática por una escasa cantidad de citoplasma, denominada vaina mitocondrial que rodea a las fibras densas externas del flagelo (Yogo 2022).

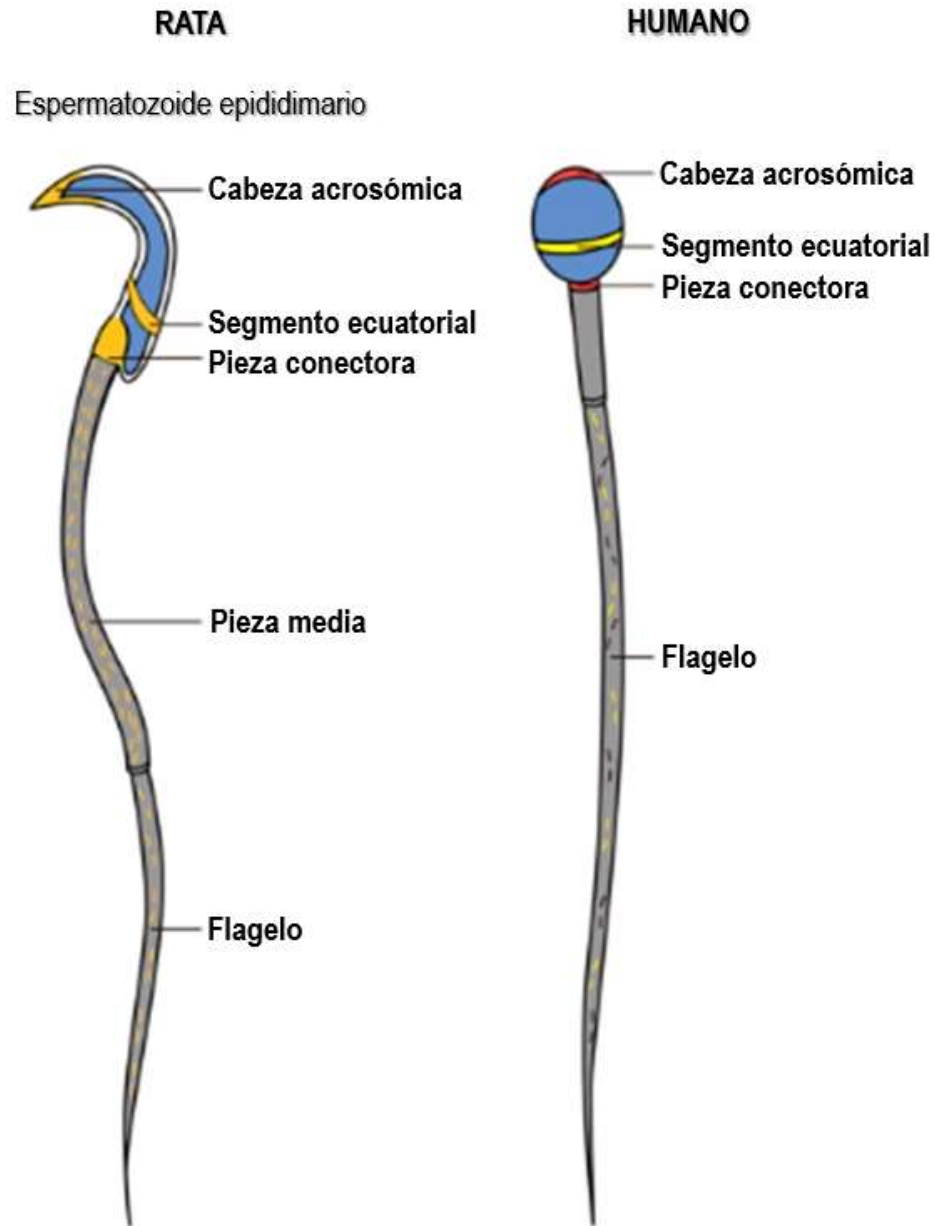


Figura 3. Morfología de espermatozoides de rata (lado izquierdo) y humano (lado derecho) (modificado de Makeyeva y cols. 2020).

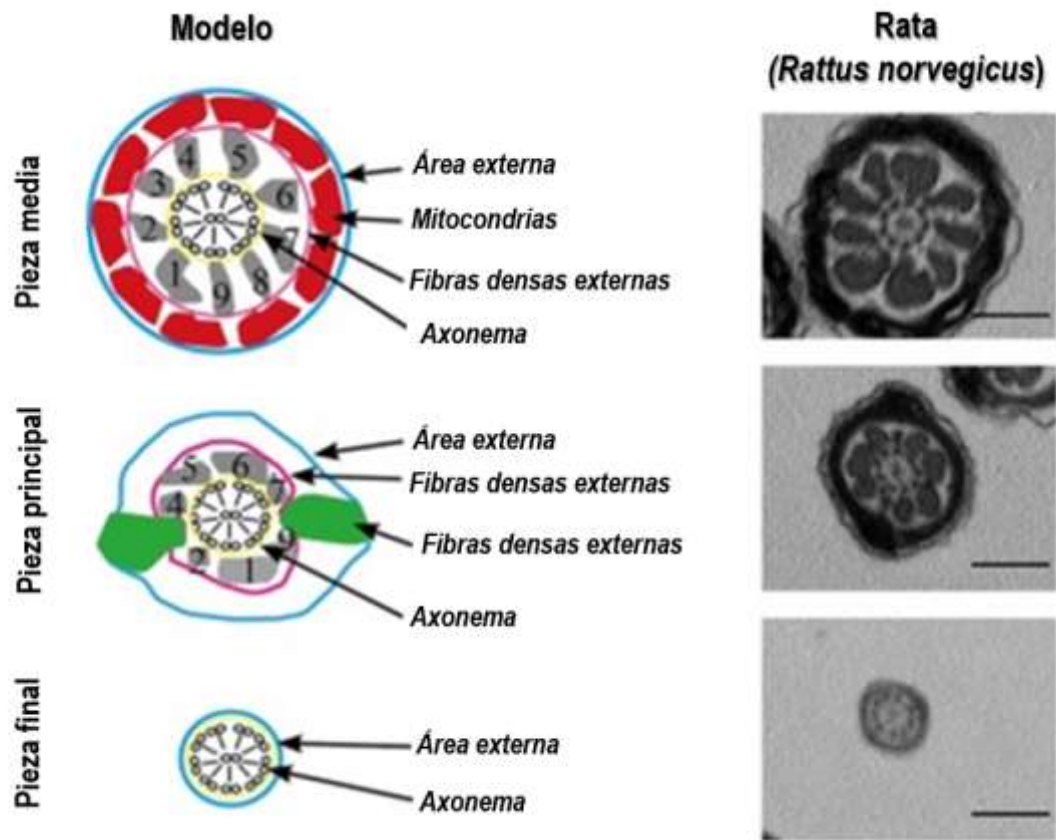


Figura 4. Componentes de la pieza media y flagelo del espermatozoide en *Rattus norvegicus*. Las barras de escala son de 400 nm (modificado de Gu y cols. 2019).

1.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular continuo cuyo objetivo es la formación de células germinales masculinas. La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos presentes en los testículos, dirigida principalmente por actividad de las células de Sertoli, dando lugar a los espermatozoides a partir de las espermatogonias, en un lapso de 65-72 días en la especie humana y de 54 días en ratas macho (Hess y De Franca 2008).

La espermatogénesis en la rata inicia en el quinto día posnatal y consta de tres fases: proliferativa, meiótica y espermiogénesis. En la primera fase, las espermatogonias de tipo A indiferenciadas se dividen por mitosis, originando a más espermatogonias indiferenciadas y

también diferenciadas; estas últimas originan un linaje celular diferenciado en diversos subtipos A1, A2, A3, y A4. La espermatogonia A4 se divide y dan lugar a espermatogonias A subtipo intermedia (AIn). Por mitosis AIn genera espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B forman a los espermatocitos preleptotenos a partir de mitosis (Tresguerres y cols. 2005).

Son los espermatocitos primarios los que inician la segunda fase de la espermatogénesis, efectuando la primera fase de la meiosis, dando lugar a dos espermatocitos secundarios, los cuales realizan la segunda fase división meiótica, formando dos espermátidas redondas y haploides cada una. En la fase de espermiogénesis, cada espermátida redonda tiene cambios morfológicos sin división celular hasta convertirse en espermátidas alargadas, para dar origen al espermatozoide. Estos maduran en el epidídimo, y se almacenándose en la cauda epididimaria (Clermont 1972).

Se señala que la espermatogénesis es mediada por actividad del eje HPG, para la síntesis de esteroides que favorezcan a la gametogénesis masculina. El hipotálamo se encarga de la síntesis y segregación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimulará a las células gonadotropas presentes en la parte anterior de la hipófisis. A su vez, estas células son capaces de sintetizar hormonas gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), que ejercerán actividad sobre las células gonadales (Jin y Yang 2014). La LH actúa en conjunto con la prolactina (PRL) estimulan a las células de Leydig, para la síntesis y segregación de testosterona (McNeilly y cols. 1979), que se dirige hacia los túbulos seminíferos y se adhiere a las proteínas transportadoras de andrógenos citosólicas presentes en las células de Sertoli, por lo que aumenta la concentración androgénica intracelular. Las altas concentraciones de andrógenos activan receptores nucleares de andrógenos y permite que las células de Sertoli se activen para ejercer sus múltiples funciones sobre la espermatogénesis. La actividad de la FSH también se ejerce sobre estas células, favoreciendo la expresión de proteínas transportadoras de andrógenos para su captación e incremento en las concentraciones intracelulares antes mencionadas (Jin y Yang 2014).

1.4 Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es un proceso biológico que da origen a hormonas de tipo esteroide (sexuales, glucocorticoides y mineralocorticoides) a partir del colesterol, llevada a cabo en tejidos esteroidogénicos regulados, generando estímulos agudos o crónicos sobre la regulación homeostática y otras funciones como la reproducción (Gu y cols. 2022). Las células de Leydig son las principales células esteroidogénicas a nivel testicular donde se lleva a cabo la síntesis de testosterona. En el varón, la producción de testosterona se efectúa en dos períodos, fetal y etapa puberal hasta la adultez (Zirkin y Papadopoulos 2018). Las células de Leydig fetales logran producir gran cantidad de testosterona sin depender de la hormona luteinizante (LH), contribuyendo a la diferenciación de las gónadas masculinas y al descenso de los testículos. En el periodo posnatal, la concentración de testosterona disminuye debido a la reducción de células de Leydig fetales, y conforme se desarrollan células de Leydig desde la etapa puberal provenientes de precursores indiferenciados presentes en los testículos neonatales, los niveles de testosterona aumentan (Zirkin y Papadopoulos 2018). Algunos de estos precursores logran diferenciarse entre el día 14 y 28 posnatal en células de Leydig inmaduras mediante LH, para posteriormente dividirse y dar origen a la población completa de células de Leydig (25 millones de células de Leydig maduras por cada testículo) en el día 56. Las células maduras se vuelven completamente esteroidogénicas en la pubertad, logrando un aumento gradual en los niveles de testosterona (Zirkin y cols. 1997). Este proceso es mediado por LH, secretada por la glándula pituitaria, a partir de la activación del eje HPG (Kyrou y Tsigos 2008).

Las células peptidérgicas presentes en el hipotálamo generan una liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GNRH), la cual estimula a las células gonadotropas de la adenohipófisis para la liberación de gonadotropinas como la LH y la FSH (Shalet 2009). El papel de la LH en la esteroidogénesis consiste en el mantenimiento de niveles óptimos de enzimas esteroidogénicas, movilización y transporte de colesterol obtenido de lipoproteínas circulantes (HDL o LDL), almacenado en gotitas lipídicas o síntesis a partir de acetato o hidrólisis de éster colesterol, hacia la membrana interna de la mitocondria. Para esto, la LH se une a receptores de alta afinidad acoplados a la proteína G, presentes en la membrana plasmática de las células de Leydig (Zirkin y cols. 1997). La unión del receptor de LH/proteína G induce la activación de adenilato ciclasa, para catalizar la formación de cAMP intracelular a partir de

ATP, la fosforilación de proteínas dependiente de cAMP a través de la proteína quinasa A (PKA) (Wang y cols. 2017). La estimulación aguda de las células de Leydig por la LH da como resultado la transferencia de colesterol libre intracelular a la mitocondria, a través de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (STAR), la proteína translocadora (TSPO) y más proteínas del transduceosoma (Midzak y cols. 2011). Posteriormente, se lleva a cabo la conversión del colesterol a pregnenolona por actividad enzimática del citocromo P450_{sc}/Cyp11A1, ubicado en la membrana interna mitocondrial. En el retículo endoplasmático liso, a pregnenolona es biotransformada a testosterona por acción de la 17 α -hidroxilasa, que da origen a 17-hidroxi-pregnenolona; así mismo la acción de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) genera la conversión a androstenediona, para que finalmente la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD3) transforme la androstenedion en testosterona (Figura 5; Aghazadeh y cols. 2015).

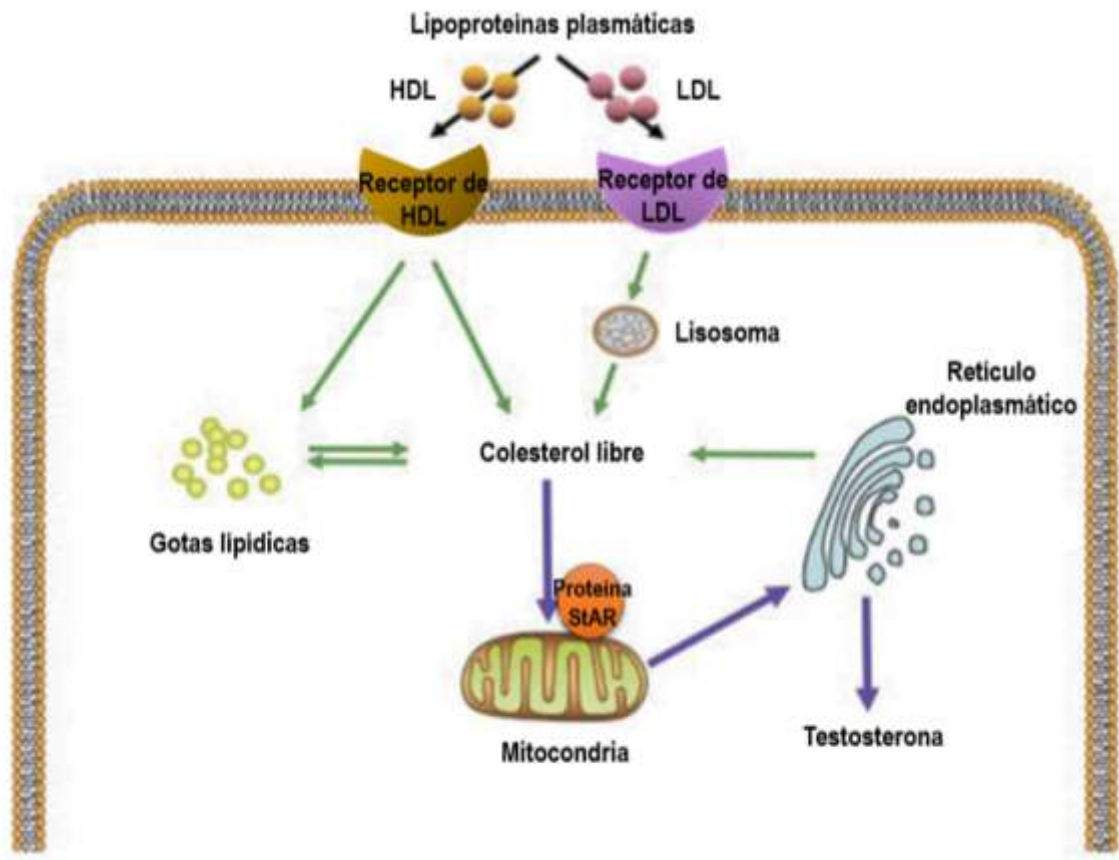


Figura 5. Síntesis de testosterona en células de Leydig (modificado de Zhu y cols. 2019). La estimulación de la hormona Luteinizante sobre células de Leydig permite la captación de colesterol libre a partir de receptores de HDL y LDL, y de gotas lipídicas intracelulares; el colesterol es transportado a la membrana mitocondrial por acción de proteínas StAR para la formación de pregnenolona. Esta última es biotransformada en el retículo endoplasmático liso a testosterona.

1.5 Desarrollo gonadal prenatal y postnatal

Las gónadas primitivas surgen de la cresta genital (Ganong 2005) situada en la cara medial del mesonefros, están estructuradas por una corteza y una médula cuya diferenciación morfológica tanto femenina como masculina, se logra observar entre la quinta (Moore 1979) y séptima semana de gestación humana (Ganong 2005), desarrollándose a partir del epitelio celómico, mesénquima y células primordiales germinativas (Moore 1979). Es en la cuarta semana de gestación, cuando las células primordiales presentes en la pared del saco vitelino, se incorporan al embrión tras su encorvamiento, las células primordiales migran hacia los pliegues gonadales, que, tras su formación, se induce el crecimiento de los cordones sexuales primitivos primarios durante la sexta semana. En esta etapa aún de indiferenciación, las gónadas constan

de corteza externa que presenta regresión, y de médula que dará origen a los testículos. Posteriormente, las células primordiales se incorporan a los cordones, que muestran condensación, y consecutivamente su extensión a la médula gonadal, dando lugar a los túbulos seminíferos y la rete testis. Así mismo, inicia el desarrollo de la túnica albugínea y conforme crecen las gónadas, existe una separación del mesonefros (Moore 1979).

En el caso del varón, los conductos de Wolff logran formar el epidídimo, vesículas seminales y el conducto deferente al diferenciarse por acción de andrógenos (Ganong 2005). Los conductos de Müller son suprimidos por la hormona anti-Mülleriana. Esta diferenciación fenotípica es influenciada por la existencia del gen *Sry* en el cromosoma Y, dando origen a las gónadas masculinas, a partir de un incremento en la expresión del gen *Sox9*. La expresión de *Sry* es llevada a cabo en precursoras de células de soporte, y una vez que los productos proteicos alcanzan la concentración máxima en la célula, induce sobreexpresión de *Sox9*; este último es capaz de regular dicho mecanismo tras la inhibición de *Sry* y aumentar la proliferación de precursoras de células de Sertoli provenientes de la cresta genital e iniciar de nuevo el proceso, logrando la maduración de estas células, así como la formación de células endoteliales y mioideas peritubulares (Sekido y cols. 2004).

En la rata macho, la madurez sexual se alcanza entre las 9-10 semanas de edad, y con ello, un completo desarrollo de las gónadas. Se identifican diferencias morfológicas de acuerdo con sus periodos de crecimiento. Se considera una rata macho en periodo neonatal cuando tiene una edad de 0 a 7 días. En esta etapa se observa una gran cubierta en la membrana basal constituida por células de Sertoli en proliferación, en el centro de los túbulos están situados gonocitos sin división, cuyo núcleo tiene un nucleolo prominente y cromatina dispersa. También se observan células de Leydig fetales con mitosis inactiva. En el periodo infante temprano de 8 a 14 días disminuye el número de gonocitos fetales, se observa una distribución rápida de las células de Sertoli, así como espermatogonias del tipo A, intermedias y B en mitosis; en el intersticio se reemplazan de células de Leydig fetales por progenitoras con división mitótica activa. La presencia de estas poblaciones celulares, comienza a generar la estructura característica tubular estratificada (Picut y cols. 2015). Se plantea que dicha proliferación celular y transformación a

espermatogonias de los gonocitos es generado por los altos niveles de FSH sanguíneo que estimula a las células de Sertoli (Rossi y Dolci 2013).

Durante la etapa infantil tardía, entre los días 15 y 20 postnatal se alcanza la tasa de división celular máxima tubular debido a la proliferación, disminuida en comparación con el periodo anterior, pero existente de espermatogonias tipo A con poca proporción de citoplasma, y de tipo B, más pequeña con citoplasma abundante y núcleo esféricos ((Picut y cols. 2015).

Durante la etapa infantil tardía, entre los días 15 y 20 postnatal se alcanza la tasa de división celular máxima en los túbulos seminíferos, existente de espermatogonias tipo y B, formando una capa pseudoestratificada conformada también por las células de Sertoli. Las espermatogonias inician su proceso mitótico, dando lugar a espermátocitos preleptotenos situados en el compartimento basal, y leptotenos y zigotenos en el compartimento adluminal. A partir del día 18 postnatal se perciben espermátocitos paquíteno cerca de la luz tubular, y células de Leydig progenitoras en el espacio intersticial con bajo conteo de células de Leydig inmaduras (Picut y cols. 2015). Sin embargo, las células de Sertoli la que dejan de multiplicarse en mayor proporción. De igual forma, se desarrolla la barrera hematotesticular y el lumen tubular, sin presencia de espermatozoides (Abd EL-Meseeh y cols. 2016).

Durante los días 21 y 31 de edad, pertenecientes al periodo juvenil, crece el diámetro de los túbulos. En el epitelio germinativo están presentes espermatogonias tipo A, B y gran número de espermátocitos en paquíteno (Picut y cols. 2015). Así mismo, se origina la génesis de espermátocitos secundarios y espermátidas redondas en los túbulos y la maduración de células de Leydig en el espacio intersticial, dando lugar a células maduras (Abd EL-Meseeh y cols. 2016). En la etapa prepuberal, del día 33 a 55 de edad, el diámetro tubular sigue creciendo y se encuentran todas las etapas celulares de la espermatogénesis, incluyendo espermatozoides en gran cantidad de túbulos, añadiendo que la morfología aún puede variar con respecto a ratas adultas y sexualmente maduras. Las células de Sertoli pueden extenderse desde la membrana basal hasta el lumen permitiendo la adhesión de las células espermatogénicas y los espermatozoides (Picut y cols. 2015; Abd EL-Meseeh y cols. 2016).

En el día 90 postnatal se observan túbulos seminíferos de mayor tamaño, con gran población celular espermatogénica. Las células de Sertoli disponen de citoplasma más extendido y en el

área intersticial existe mayor población de células de Leydig maduras (Abd EL-Meseeh y cols. 2016).

1.6 Modelo de estrés crónico variable

El estrés se define como un proceso desencadenante de cambios fisiológicos, que al ser prolongado genera efectos negativos tisulares y moleculares. Por ejemplo, en ratas incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en el testículo, y, por lo tanto, la peroxidación lipídica. También, reduce los niveles de testosterona sérica, afectando la movilidad, viabilidad, concentración y morfología de los espermatozoides (García y cols. 2015).

El modelo de estrés difiere entre estrés agudo y estrés crónico. El modelo agudo ocurre cuando es único y el tiempo de exposición es corto. Si es crónico se tiene una continua exposición al mismo (Koolhaas y cols. 2011; Pacak y cols. 1998). El estrés crónico se caracteriza por generar la adaptación de los mecanismos neurofisiológicos del individuo relacionadas con diversas enfermedades crónico-degenerativas debido a la activación prolongada del eje HPA (Kim y cols. 2018). La activación crónica del eje HPA se ha asociado sistemáticamente con la pérdida neuronal, disminución de la neurogénesis y alteración de la conectividad neuronal. El modelo de estrés crónico variable (ECV) consiste en la exposición a diversos factores estresantes leves, aplicados de manera impredecible durante un período prolongado de tiempo. Así, han mostrado que dicho modelo desencadena alteraciones fisiológicas y conductuales relacionados con la hiperactivación del eje HPA en roedores (Borrow y cols. 2019). Así mismo, el ECV genera alteraciones a largo plazo, causando estados de ansiedad continuos y afectando la conducta normal de los animales, aun cuando estos no reciben estímulos estresores (Matisz y cols. 2020).

1.7 Inflamación y apoptosis

En los últimos años se ha mostrado la participación de las células inmunológicas y la expresión de citocinas en la regulación de la función testicular en condiciones fisiológicas normales, actuando como factores de crecimiento y diferenciación celular, así como su expresión en estados fisiopatológicos como el estrés (Hales y cols. 1999). Frente a los eventos estresantes, el organismo se adapta a los cambios fisiológicos originados por el estresor a partir de la hiperactividad del eje HPA. De este modo, se inicia una respuesta inmunológica que desencadena actividades proinflamatorias patológicas local o sistémico, alterando la producción

local de citocinas y el número de células inmunitarias reguladoras y efectoras que conducen a la infertilidad (Theas 2018).

El sistema inmunitario testicular lleva a cabo respuestas de inmunorregulación mediadas por inmunosupresores y factores reguladores provenientes de la barrera hematotesticular y las células inmunitarias como macrófagos, linfocitos, células dendríticas y mastocitos (Yu y cols. 2013). Los macrófagos testiculares originan una respuesta inmune inflamatoria que, frente a eventos reguladores negativos secretan gran cantidad de citoquinas de tipo inflamatorio (Xue y cols. 2014). Cabe mencionar que algunos autores refieren que las células de Leydig y de Sertoli también son capaces de producir algunos tipos de citoquinas inflamatorias que comparten actividad con TNF- α , aunque no en gran cantidad como los macrófagos (Cudicini y cols. 1997; Maegawa y cols. 2002). La respuesta proinflamatoria de los macrófagos consiste en una elevada expresión de citoquinas como TNF- α , entre otras (Zhao y cols. 2019), las cuales se regulan a partir del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, mediante la unión a elementos κ B (secuencia de ADN) para regular la transcripción de más genes implicados en la inflamación y apoptosis (Gupta y cols. 2010).

Se considera que el sistema inmunológico innato del testículo se encuentra mediado por receptores TLR3, altamente expresados en las células de Leydig, que activan al factor de transcripción NF- κ B para producir citocinas. Esta respuesta inmunológica se desencadena evitando que el daño no sea mayor y pueda restaurarse la función celular., Sin embargo, dicha respuesta puede efectuar daños significativos sobre el testículo y sobre la producción normal espermática, alterando la fertilidad masculina, al originarse una sobreexpresión de interleucinas en procesos inflamatorios que están directamente relacionadas con estrés oxidativo (Azenabor y cols. 2015), el cual conduce a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como es el caso de TNF- α , que , aumenta niveles de ROS y la peroxidación lipídica sobre la membrana celular de los espermatozoides, principalmente en condiciones de inflamación e infección sobre órganos reproductores masculinos (Martínez y cols. 2007). Generalmente, el sistema antioxidante endógeno en condiciones fisiológicas normales suprime el exceso de ROS y mantiene el equilibrio redox en el semen. Tal actividad no ocurre en procesos inflamatorios, donde los niveles de radicales libres superan la capacidad antioxidante (Dutta y cols. 2021)

Estos radicales libres son moléculas que se derivan del metabolismo altamente reactivas debido a sus electrones desapareados, que alteran las biomoléculas mediante oxidación, originando daño celular. En el espermatozoide se alteran los componentes intracelulares como el ADN, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico a partir de su peroxidación (Alahmar y cols. 2021; Dutta y cols. 2021).

El proceso de peroxidación de lípidos inicia con la extracción de átomos de hidrógeno, provenientes de los dobles enlaces de carbono-carbono de los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana celular y formar los radicales lipídicos. Éstos interactúan con el oxígeno formando radicales peroxilo, capaces de reaccionar en presencia de metales, robando átomos de hidrógeno de los ácidos grasos, formando peróxido de hidrógeno lipídico (Tavilani y cols. 2008). Finalmente, estos radicales reaccionan con más lípidos produciendo moléculas nocivas como malondialdehído, 4-hidroxi-nonenal y acroleína (Jones y cols. 1979).

Por otro lado, los linfocitos testiculares que se encargan del reconocimiento inmunitario se pueden diferenciar en linfocitos T y B. Sin embargo, son los linfocitos T de tipo T CD8⁺ los predominantes en el espacio intersticial del testículo, en ratas (Hedger y Meinhardt 2000). Las células dendríticas generalmente se encuentran inmaduras en el espacio intersticial, pero al generarse un proceso inflamatorio, su población aumenta y llevan a cabo la expresión de marcadores de maduración (Rival y cols. 2006). De igual manera, los mastocitos se diferencian durante la inflamación y su población en estado fisiológico normal es baja, por lo que gran cantidad de ellos se relaciona con una espermatogénesis anormal (Hussein y cols. 2005).

El mecanismo de muerte celular apoptótica consta de una vía extrínseca que desencadena la activación de receptores de muerte como TNFR1 conteniendo un dominio de muerte (Vandenabeele y cols. 2010), que al unirse con su propio ligando (TNF- α), activa al complejo enzimático iniciador de apoptosis conformado por las caspasas 8 y 10, que, a su vez, activan a las procaspasas 3,6 y 7, convirtiéndose en caspasas efectoras para inducir la muerte celular. Y una vía es intrínseca o mitocondrial, basada en la liberación de citocromo C, que activa a las procaspasas 9 en el complejo del apoptosoma y por consiguiente la activación de caspasas efectoras (Elmore 2007). Ambas vías inciden en la fase final de la apoptosis, la fase de ejecución que se inicia a partir de la activación de las caspasas 3 de ejecución, que liberan a las

endonucleasas CAD y proteasas citoplasmáticas para la degradación del material genético y condensación de la cromatina. Así mismo CAD forma los cuerpos apoptóticos para finalmente ser fagocitadas debido a la presencia de fosfatidilserina en su superficie (Sakahira y cols. 1998).

1.8 Influencia del estrés crónico sobre la calidad espermática

Los hombres con en condición de estrés psicológico presentan alteraciones en el semen, principalmente en la movilidad progresiva y en la calidad del eyaculado (Collodel y cols. 2008) A su vez, se atribuye a eventos asociados al estrés, la baja concentración espermática (Gollenberg y cols. 2010), daño al ADN de los espermatozoides y alteraciones en su morfología (Jurewicz y cols. 2014).

No existen reacciones específicas de un individuo al someterse a un estímulo estresante. Las reacciones dependerán de varios factores, como la intensidad del estímulo, control y duración, así como su predicción (Tresguerres y cols. 2005). El estrés crónico altera, de manera prolongada, la función gonadal mediante la activación crónica del eje HPA (Kyrou y Tsigos, 2008). En la activación del eje HPG, el hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula a la hipófisis para sintetizar hormonas como LH y FSH. Sin embargo, el hipotálamo también sintetiza CRH, que estimula a la hipófisis para sintetizar ACTH, dicho estímulo induce la secreción de aldosterona. Se sugiere que el estrés físico o psicológico persistente induce la síntesis de aldosterona mediada por la ACTH, angiotensina II u otros estímulos de la zona glomerulosa de la corteza adrenal. La explicación que encuentran para los hallazgos antes descritos es que las células glomerulosas es estimulada por la secreción de ACTH inducida por estrés provocando sensibilidad elevada para la síntesis de aldosterona frente a los niveles de ACTH (Markou y cols.2015). Ha sido evidenciado que la aldosterona regula el equilibrio de líquidos y electrolitos en el epidídimo (Roy y cols. 2013). Sin embargo, se desconoce la participación de la aldosterona sobre la calidad espermática.

1.9 Estrés, eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA)

El eje HPA es el principal mediador de respuesta hormonal e inmunológica al estrés en el sistema nervioso central, cuando algún factor estresante perturba la homeostasis normal del organismo. La activación del eje HPA de manera prolongada y repetitiva genera la inhibición de diversos procesos fisiológicos, entre ellos, la reproducción (Joseph y Whirledge 2017). Dicha

activación inicia en las estructuras límbicas como el núcleo del lecho de la estría terminal o el núcleo central de la amígdala a partir de información percibida sobre el desequilibrio homeostático nervioso o humoral que genera algún estresor (Myers y cols. 2018). Así mismo, dichas estructuras límbicas proyectan señales hacia el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) (Tafet y Nemeroff 2015); este último se encuentra en la zona supraóptica/anterior del hipotálamo, ubicada por encima del quiasma óptico, donde podemos encontrar neuronas hipofisiotrópicas de tres tipos, neuroendocrinos, magnocelulares, parvocelulares y de proyección larga que logran la regulación neuroendocrina del organismo (Biag y col. 2012).

Tras la percepción de un estímulo estresante, las neuronas parvocelulares del NPV que sintetizan y liberan del neuropéptido CRH en los vasos portales de la eminencia media hipotalámica, para transportarse hacia el lóbulo anterior de la glándula pituitaria (adenohipófisis) (Gjerstad y cols. 2018), ubicada en la parte interior del cuerpo esfenoideal situado en la base craneal, conocida como la silla turca. Posteriormente, las células corticotropas hipofisarias son estimuladas por la CRH, actuando a partir de su unión a receptores 7TM acoplados a proteínas G (Grammatopoulos y Chrousos 2022), los receptores 1 y 2 de CRH (CRHR1 y CRHR2), quienes se encuentran distribuidos en diferentes secciones cerebrales, siendo el CRHR1 el de mayor expresión en los núcleos hipotalámicos, adenohipófisis, áreas neocorticales, núcleos amigdalámicos, entre otras regiones, y por quien mayor afinidad tiene la CRH (Figura 6; Bonfiglio y cols. 2011).

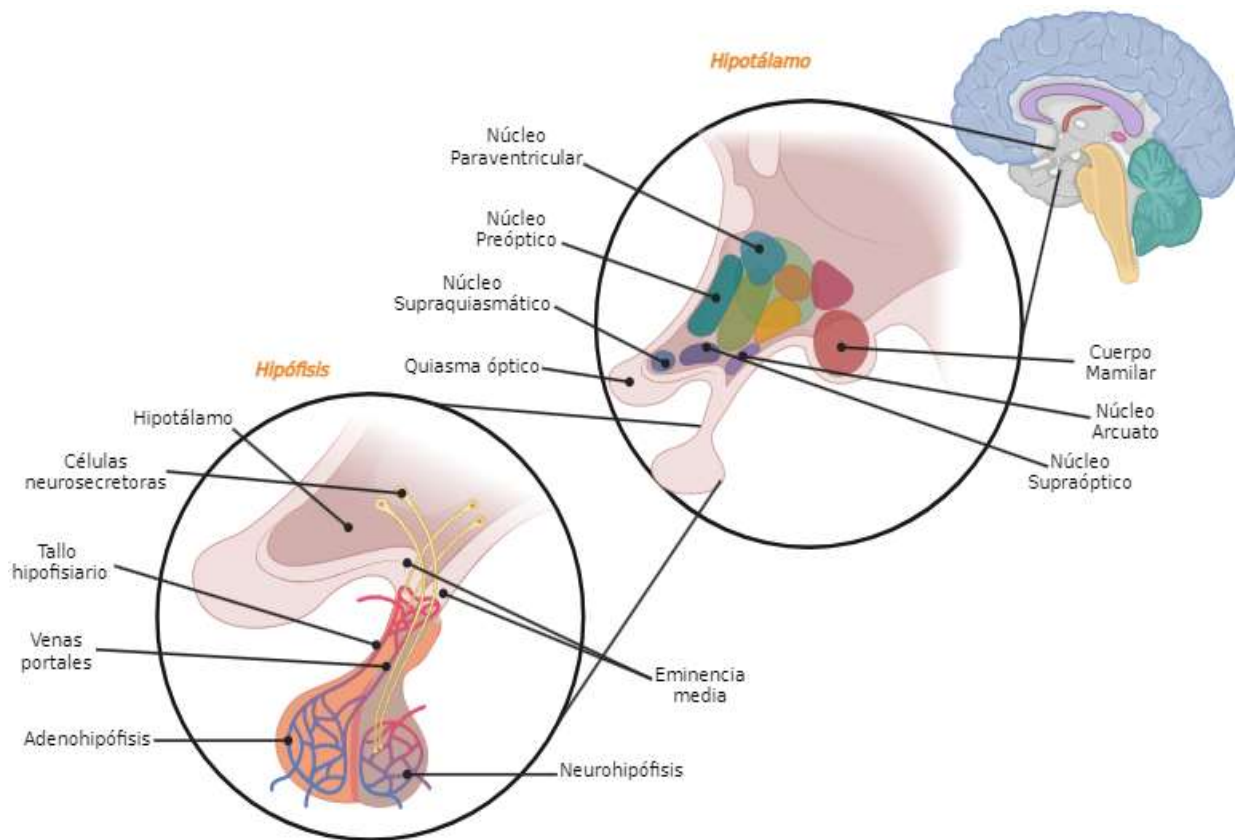


Figura 6. Anatomía del hipotálamo y glándula pituitaria (realizada en BioRender).

Los receptores de CRH tipo 1α (CRH-R 1α) son proteínas de 415 aminoácidos que contiene siete hélices α hidrofóbicas, forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G de clase II (Grammatopoulos y Chrousos 2022), que, al expresarse en los NPV y adenohipófisis, permiten la secreción de ACTH, sintetizada mediante procesos de regulación transcripcional de proopiomelanocortina (POMC), proteína precursora de ACTH (Leistner y Menke 2020). Tras la activación del receptor de CRHR1, inicia una vía de transducción de señales MAPK, regulada tras la activación de PKA mediante un segundo mensajero, adenosín monofosfato cíclico (cAMP) sintetizado a partir de ATP por actividad de la adenilato ciclasa tras su unión con la subunidad α de la proteína G para modular la transcripción de POMC (Bonfiglio y cols. 2011). La PKA desencadena dos vías transduccionales, una dependiente de calcio, modulada por canales de Ca^{+2} voltaje dependientes de tipo L, que interaccionan con la enzima calmodulina quinasa de tipo II, y otra independiente de este ion, ambas para la activación de proteínas como

Rap1, B-Raf quinasa y ERK1/2. Esta última para inducir la actividad transcripcional de los Nur (Maira y cols. 2003).

Por otro lado, la ACTH proporciona estímulos sobre las glándulas adrenales para la secreción de mineralocorticoides (MC) proveniente de la zona glomerular y glucocorticoides (GC) en la zona fascicular, ambas en la corteza adrenal (Mikulska y cols. 2021), a partir de la unión a receptores de melanocortina 2 (MC2R) pertenecientes a la familia de receptores 7TMS, acoplados a proteínas G (Yang y cols. 2017). El mecanismo de la ACTH tras la unión a su receptor implica la participación de la adenilatociclasa que incrementa los niveles de cAMP y así mismo, la activación de la PKA para inducir la transcripción de genes que codifican enzimas esteroidogénicas y por consiguiente la biosíntesis de colesterol para la formación de corticoides (Enyeart 2005).

El eje HPA posee un sistema de retroalimentación negativo para inhibirse, y es mediado por los niveles hormonales de mineralocorticoides y glucocorticoides presentes en el organismo tras su activación, a partir de la síntesis y liberación hormonal con ritmo pulsátil, patrones circadianos y ultradianos (Gjerstad y cols. 2018). Esto para limitar la secreción hormonal transitoriamente en procesos estresantes agudos y no prolongados, y así mantener la homeostasis del organismo en condiciones normales (Myers y cols. 2018). Cabe mencionar que cuando el estresor estimula la activación del eje HPA de manera crónica, esta retroalimentación negativa puede alterarse, y, por consiguiente, modifica el equilibrio homeostático (Tafet y Nemeroff 2015).

La retroalimentación negativa puede originarse mediante dos mecanismos inhibitorios: mecanismo rápido que no involucra procesos transcripcionales genómicos, en tiempos muy cortos y generalmente frente a estrés agudo y el mecanismo retardado, cuando el tiempo de actividad es prolongado e involucra procesos transcripcionales involucrando a receptores citosólicos de mineralocorticoides y glucocorticoides presentes en núcleo paraventricular y la hipófisis (Tafet y Nemeroff 2015; Myers y cols. 2018). El mecanismo rápido inhibitorio es proporcionalmente directo al aumento de corticoides (Duval y cols. 2010) e inicia cuando éstos interactúan con receptores membranales en el NPV, y no a receptores citosólicos comunes que se encuentran en las glándulas adrenales. Por lo tanto, las neuronas que lo conforman ya no son

capaces de recibir señales simpáticas excitatorias, y la secreción de CRH no se efectúa; este mecanismo es denominado supresión de la excitación inducida por glucocorticoides (GSE).

Se sugiere que este mecanismo es originado tras la activación de una vía de señalización que involucra receptores postsinápticos acoplados a proteínas G, AMPc y PKA (Malcher y cols. 2006), inducen la liberación de moléculas mensajeras retrógradas capaces de inhibir la liberación presináptica de glutamato, un neurotransmisor excitatorio de células neuroendocrinas (Tasker y Herman 2011; Myers y cols. 2018). Aunado a esto, los mensajeros retrógrados inhibitorios de GSE que son cannabinoides endógenos, también podrían activar de manera inhibitoria la síntesis de ACTH dada la presencia de receptores CB1 (Pogotto y cols. 2001). Así mismo, se ha planteado que el CRHR1 límbico puede estar involucrado en la regulación tardía del eje HPA, dado que GR inhibe la liberación de ACTH tras la disminución en las concentraciones de ARN mensajero (ARNm) ACTH codificantes, así como inhibición transcripcional de POMC, esta última involucrando mecanismos inhibitorios factores GR y Nur (Figura 7; Bonfiglio y cols. 2011).

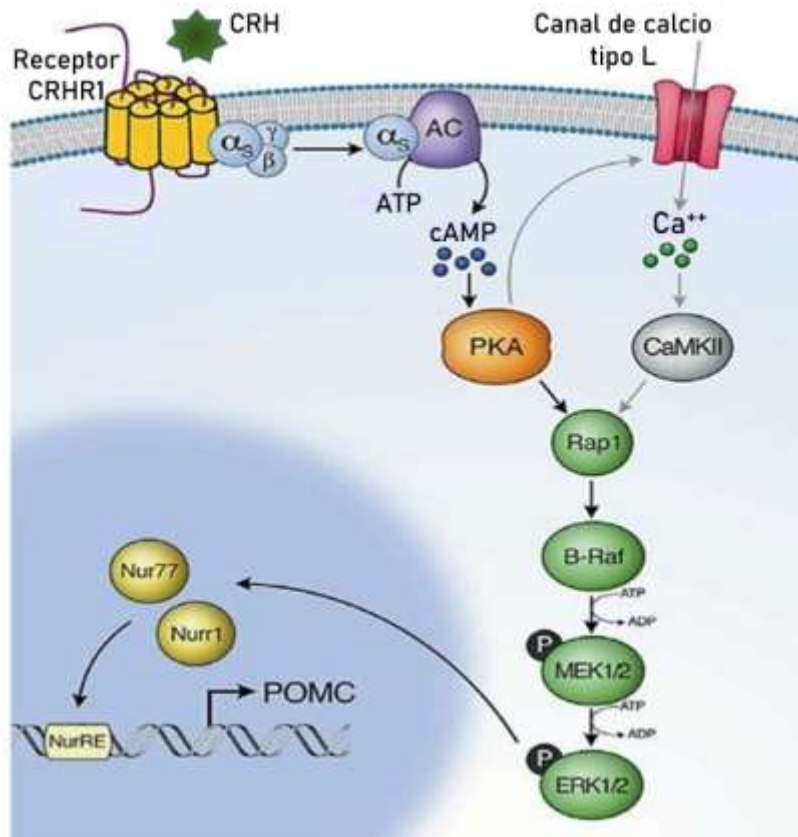


Figura 7. Vías de señalización de CRH en células corticotropas de la adenohipófisis (modificado de Bonfiglio y cols. 2011). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) se une al receptor CRHR presente en la adenohipófisis, desencadenando dos vías de señalización mediadas por la proteína quinasa A (PKA), para la activación de Rap 1, B-Raf, MEK ½ y ERK ½. Esta última regula la actividad de factores transcripcionales Nur 77 y Nur, que participan en la síntesis de POMC

1.10 Generalidades de la aldosterona y receptores de mineralocorticoides en testículo y epidídimo

La aldosterona es una hormona de tipo esteroidea, perteneciente a la familia de los mineralocorticoides, que estructuralmente se compone por 21 moléculas de carbono, y en el carbono 17 posee una cadena lateral de dos carbonos (Ganong 2005); es sintetizada en la zona glomerulosa (ZG) de la corteza adrenal, mediada por actividad de la angiotensina II tras la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS) (Gao y cols. 2021). Las hormonas provenientes de dicha corteza se derivan del colesterol (Figura 8), que es transportado a las células a través de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de alta densidad (HDL). La

corteza adrenal posee receptores específicos a lipoproteínas. Una vez unidas las lipoproteínas a sus receptores, ingresan a la célula mediante endocitosis, donde toma una estructura esférica, y es aglomerado en gránulos lipídicos debido a la actividad de la enzima hidrolasa de éster de colesterol (Ganong 2005). Dichos gránulos son transportados a las mitocondrias donde, por catálisis enzimática de la desmolasa de colesterol perteneciente al citocromo P450, se transforma en pregnenolona. Esta última se moviliza hacia el retículo endoplasmático liso (REL), donde sufre un proceso de deshidrogenación por la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa transformándose en progesterona, la progesterona es hidroxilada por la 21β -hidroxilasa en el retículo endoplásmico liso, transformándose en 11-desoxicorticosterona (Ganong 2005). La enzima sintasa de aldosterona presente en la zona glomerular de la corteza suprarrenal es la encargada de formar corticosterona a partir de 11-desoxicorticosterona, y de 18-hidroxicorticosterona a partir de la corticosterona con participación de la angiotensina II. Por último, la 18-hidroxicorticosterona es transformada en aldosterona por esa misma enzima (Ganong 2005).

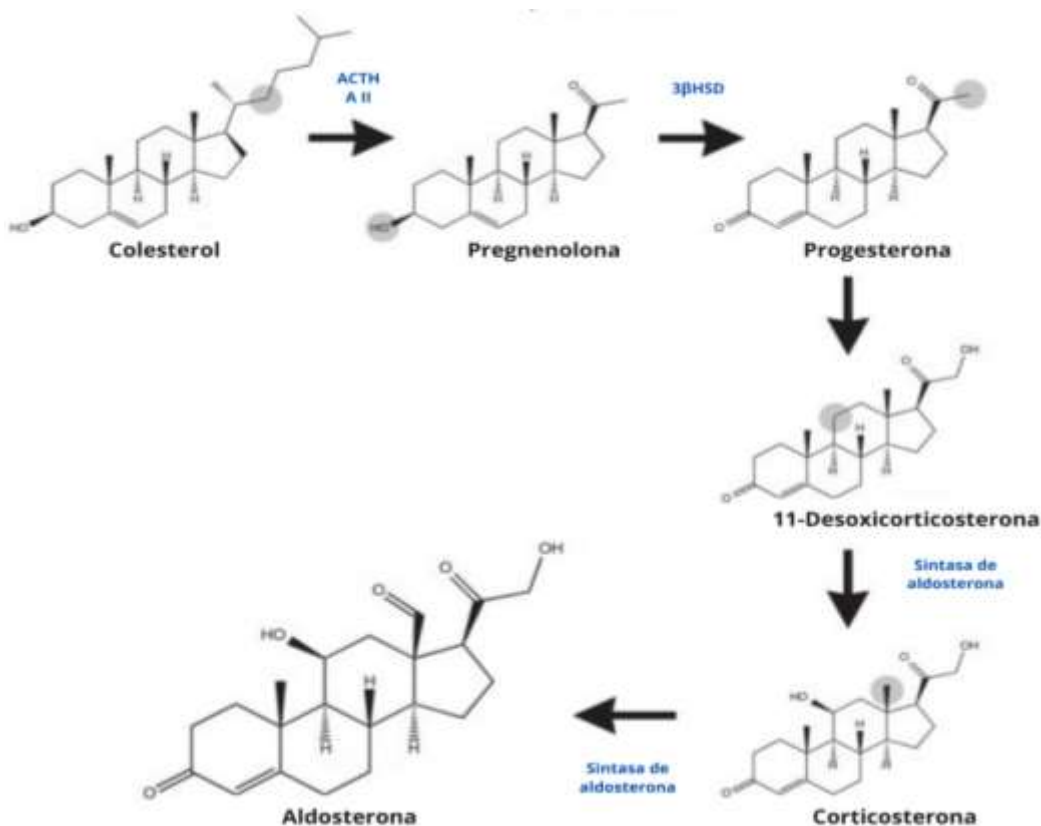


Figura 8. Biosíntesis de aldosterona (modificado de Bollag 2014). El precursor de las hormonas esteroideas es el colesterol. En su forma libre es transportado a la membrana mitocondrial para generar pregnenolona, esta última, después de una serie de reacciones enzimáticas llevadas a cabo en el retículo endoplasmático, da lugar a la 11-desoxicorticosterona, que, a su vez es transformada en corticosterona y posteriormente en aldosterona por la enzima sintasa de aldosterona.

Así mismo, la aldosterona al preceder del colesterol se considera de naturaleza liposoluble, favoreciendo a su difusión a través de la membrana plasmática celular. Su mecanismo de acción se encuentra mediado por receptores de mineralocorticoides (RM) presentes en riñón, colon, músculo cardíaco, glándulas salivales, testículo, entre otros órganos; y la participación de enzimas 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 y 2, las cuales favorecen competencia frente a glucocorticoides como cortisol en humanos y corticosterona en ratas, por los RM (Gao y cols. 2021; Ge y cols. 2005).

Los receptores de mineralocorticoides forman parte de una superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción dependientes de ligandos encontrados en el citoplasma celular, que

en ausencia de aldosterona se encuentran inactivos debido a los complejos proteicos que forman con proteínas chaperonas, también denominadas proteínas de choque térmico hsp90, hsp70 o inmunofilinas, que en presencia de mineralocorticoides, se desacoplan a los receptores, permitiendo la unión con aldosterona, y su acumulación en el núcleo de las células (Fejes y cols. 1998; Binart y cols. 1995).

Tras la unión de la aldosterona al RM citosólicos se liberan los complejos proteicos antes mencionados, y se genera una traslocación del complejo receptor-aldosterona hacia el núcleo celular (Figura 9). Dicho complejo interacciona con el locus genómico específico y otros reguladores de la transcripción, para la síntesis de proteínas efectoras encargadas de la regulación de sodio y potasio a través de células epiteliales tubulares presentes en el riñón. Este mecanismo genómico se puede clasificar en dos fases: una temprana, ejercida 30 minutos posteriores a la unión del RM a su ligando, que permite recuperar los niveles hemostáticos cuando ocurre el desbalance de agua y sodio, a partir de la activación e inhibición de genes moduladores de la actividad de transporte de sodio y potasio presentes en la célula (Kellner y cols. 2003). Y la fase tardía. 3 horas después de la unión, modulando la expresión de genes efectoras encargados del transporte de sodio y potasio (Verrey 1998).

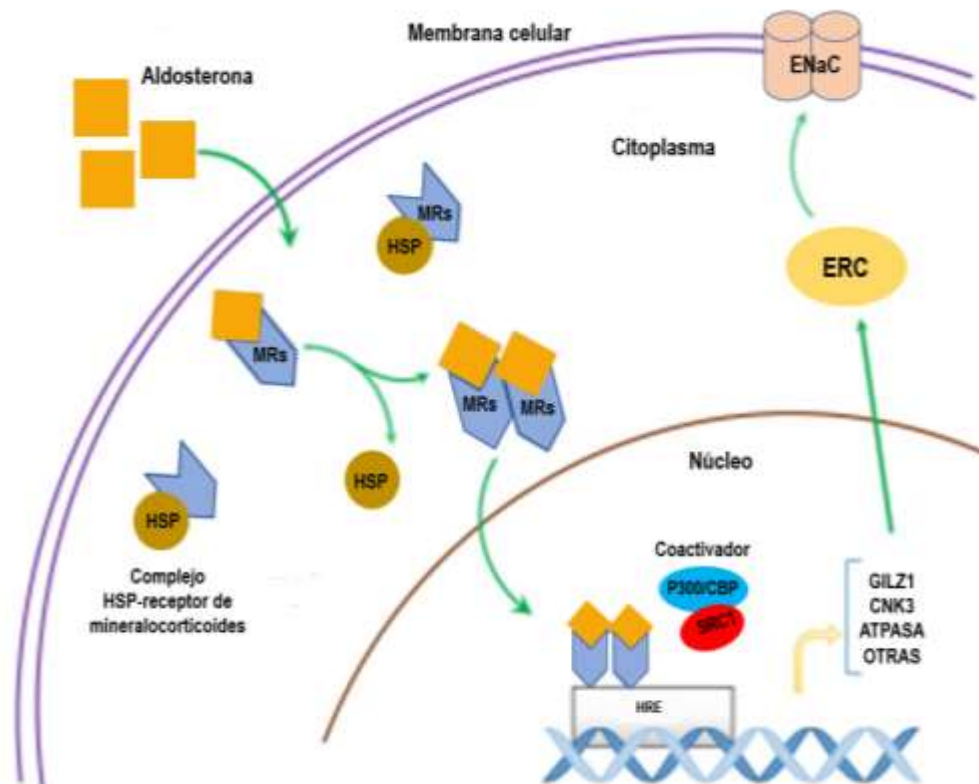


Figura 9. Mecanismo de acción de aldosterona mediante la vía de señalización genómica (modificado de Wu y cols. 2018). Aldosterona atraviesa la membrana plasmática celular para unirse al receptor de mineralocorticoides citosólico, que está de forma inactiva unido a proteínas de choque térmico (HSP). En presencia de aldosterona, el complejo receptor-HSP se rompe para lograr la unión del receptor con la hormona mineralocorticoide, se transloca al núcleo permitiendo la transcripción proteínas ENaC, ATPasas, entre otras.

Existen receptores de mineralocorticoides (NR3C2) en las células de Leydig, que al encontrarse frente a dosis dependientes de aldosterona genera efectos benéficos sobre la síntesis de testosterona (Ge y cols. 2005). Sin embargo, se ha mostrado que la aldosterona es capaz también de inhibir el desarrollo y diferenciación de las células madre de Leydig, efecto inducido por la unión al receptor NR3C2 (Zhang y cols. 2018).

1.11 Eplerona

La eplerona es un antagonista específico de la aldosterona derivado de la espironolactona y de origen esteroideo; tiene un efecto competitivo de bloqueo sobre el RM a partir de su unión selectiva (Tam y cols. 2017). Es usada como tratamiento para insuficiencia cardíaca crónica,

administrada oralmente, por lo que su absorción se lleva a cabo vía gastrointestinal, alcanzando su concentración máxima en plasma 2 horas después de su administración. Posteriormente, en el hígado es metabolizado por el complejo enzimático del citocromo P450 (CYP3A4 y CYP3A5), dando lugar a dos metabolitos: 6 β -hidroxieplerenona a través de la vía CYP3A4, y 21-hidroxieplerenona a partir de la contribución de ambas vías CYP3A4 y CYP3A5 (Figura 10; McGraw y cols. 2019), eliminados por la orina en un lapso máximo de 6 horas (Struthers y cols. 2008).

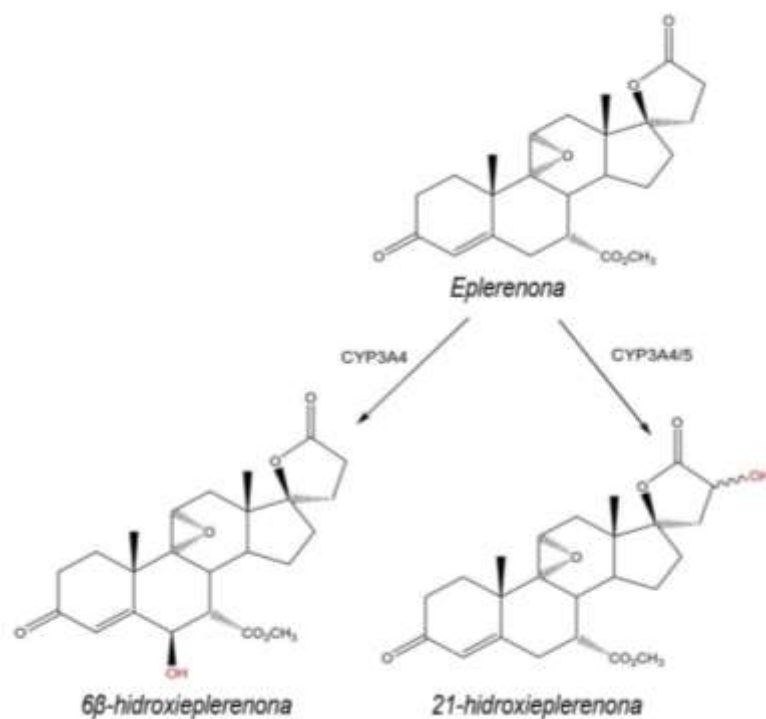


Figura 10. Metabolismo de la eplerenona mediado por el citocromo P450 (modificado de McGraw y cols. 2019). Eplerenona es metabolizada en el hígado a partir del complejo enzimático P450 mediante las vías CYP3A4 y CYP3A5, originando dos metabolitos más simples como 6 β -hidroxieplerenona y 21 β -hidroxieplerenona.

Cabe mencionar que la eplerenona inhibe el aumento de la reabsorción de sodio y agua producido por la aldosterona. Sin embargo, aumenta la excreción de potasio, induciendo el desarrollo de hiperpotasemia sérica grave (≥ 6 mEq/l) (Levy y cols. 2004). Algunos autores refieren que este aumento en los niveles de potasio es directamente proporcional a la dosis administrada de eplerenona (Levy y cols. 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Estrés, aldosterona y calidad espermática

El proceso apoptótico regulado por el receptor de glucocorticoides y la inhibición de la síntesis de testosterona en las células de Leydig, son mecanismos principales que afectan la espermatogénesis inducida por estrés (Zou y cols. 2019). El estímulo del estrés crónico mediante restricción de movimiento en ratas eleva considerablemente niveles de corticosterona, hormona del estrés en ratas, y disminuye la testosterona sanguínea (Murthy y cols. 1988). Así mismo, se confirma que el estrés crónico impredecible es capaz de ejercer alteraciones morfológicas, aumentado anomalías acrosomales y de movilidad progresiva sobre los espermatozoides, así como la inducción de estrés oxidativo. También es capaz de generar alteraciones sobre las células de Sertoli y su función en la barrera hematotesticular (Kolbasi y cols. 2021).

El estrés propicia la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal para la liberación de hormonas glucocorticoides y mineralocorticoides. Sin embargo, esta respuesta difiere dependiendo de la edad de las ratas. Corona y cols. (2015), mostraron que en ratas recién destetadas que el estímulo del estrés crónico por restricción de movimiento aplicado por cinco días consecutivos durante cuatro semanas en un mismo horario (11:00 am), aumentó los niveles de corticosterona e indujo esteatosis hepática. Cuando este mismo estímulo fue realizado en ratas jóvenes adultas incrementaron los niveles de aldosterona sin afectar los de corticosterona (Corona y cols. 2017). Los niveles altos de aldosterona afectan al riñón (Sánchez- Solís y cols. 2020). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que al aplicar un modelo de estrés crónico leve impredecible en ratas jóvenes adultas, que consta de cinco estresores distintos en horarios diferentes, también induce la elevación de los niveles de aldosterona, provocando inflamación y fibrosis renal y esteatosis hepática y cuando se aplica el antagonista del receptor mineralocorticoide (eplerona) se previene la inflamación y fibrosis renal y esteatosis hepática, lo que sugiere que la hormona mineralocorticoide ejerce su actividad mediante su receptor (Pérez y cols. 2024). Estudios realizados en modelos animales con fibrosis renal, han descrito que el uso de la eplerona bloquea la actividad de aldosterona vía RM, previniendo la fibrosis renal debido a sus efectos antiinflamatorios y antiproliferativos,

inhibiendo la infiltración de macrófagos y monocitos, así mismo redujo el estrés oxidativo. No se observó influencia negativa sobre la presión arterial con el uso de eplerona (Chen y cols. 2013).

En el testículo con esta misma condición de estrés hemos mostrado, estrés oxidativo espermático, inflamación testicular, disminución en los niveles de testosterona, viabilidad, movilidad y concentración espermática (Pérez-Sánchez y cols., enviado). Glasdton y cols. (2012), muestran la presencia del RM en las cuatro regiones del epidídimo de rata, segmento inicial, cabeza, cuerpo y cauda, donde la aldosterona actúa como regulador electrolítico intraluminal para la maduración, capacitación y almacenamiento espermático. Así mismo, la presencia del RM se ha observado en la cabeza y cuello del espermatozoide, favoreciendo su movilidad (Fiore y cols. 2006). Esto sugiere que el aumento de aldosterona pudiera estar afectando la calidad espermática epididimaria por la vía de su RM. Por ello, el presente estudio se diseñó para analizar la capacidad de la eplerona para prevenir la inflamación y calidad espermática inducida por el estrés crónico variable. Estos hallazgos nos indicarían que la aldosterona tiene una posible participación en la afectación espermática.

3. JUSTIFICACIÓN

La infertilidad es una condición que ha afectado a millones de individuos en los últimos años, considerando al varón como factor único de esta condición, asociado al sobrepeso, obesidad, estrés, entre otros, y cuya prevalencia ha aumentado del 20% al 50% (Fainberg y cols. 2019). El estrés activa el eje HPA, el cual estimula la hormona adrenocorticotrópica que incrementa la secreción de aldosterona (Markou y cols. 2015). En particular, el estrés psicológico prolongado en humanos afecta la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides (Janevic y cols. 2014; Kyrou y Tsigos 2008).

En la rata macho, las células de Leydig expresan el receptor a mineralocorticoides (Ge y cols. 2005) y son capaces de mediar la proliferación y maduración de dichas células, a partir de su interacción con aldosterona. No obstante, ambos procesos celulares pueden ser inhibidos por altas concentraciones de mineralocorticoides (Zhang y cols. 2018). Así, el aumento de aldosterona disminuye los niveles de testosterona e induce inflamación testicular y baja calidad espermática en ratas jóvenes (Pérez-Sánchez y cols., enviado).

La eplerona es un antagonista específico de aldosterona, que, tras el bloqueo del receptor de mineralocorticoides, previno el desarrollo de fibrosis renal contralateral de animales con obstrucción uretral unilateral, originada por aldosteronismo (Xiong y cols. 2021), inflamación y esteatosis hepática asociada al aumento de aldosterona inducida por estrés crónica variable (Pérez y cols. 2024). Por ello, el presente trabajo pretende bloquear la unión de aldosterona con su receptor, el cual vincula el estrés con los niveles elevados de aldosterona que puedan inducir baja calidad espermática.

4. HIPÓTESIS

La eplerona revierte la inflamación testicular mejorando la calidad espermática epididimaria inducida por estrés crónico variable en ratas jóvenes adultas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar si la eplerona revierte la inflamación testicular mejorando la calidad espermática epididimaria inducido por estrés crónico variable en ratas jóvenes adultas.

5.2 Específicos

- Evaluar la calidad espermática epididimaria mediante el análisis de la concentración, movilidad, morfología y viabilidad espermática.
- Analizar la presencia de estrés oxidativo, mediante la cuantificación de ROS y moléculas antioxidantes en espermatozoides.
- Determinar la presencia de inflamación testicular mediante la técnica de inmunohistoquímica, a partir de la expresión de TNF- α .
- Cuantificar el número de túbulos seminíferos y su circunferencia, así como el área del lumen y del epitelio germinativo mediante tinción de hematoxilina eosina sobre el arreglo histológico testicular.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 21 días de edad. Las ratas permanecieron en condiciones controladas de bioterio, en cajas individuales de acrílico (37 X 27 X 16 cm), con humedad relativa de $60 \pm 5\%$ y temperatura ambiental de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Estuvieron con ciclo invertido de luz/oscuridad (cada fase con duración de 12 h, encendido de luz a las 8 am). Fueron alimentadas únicamente en dieta Chow 5001 Purina y agua a libre acceso. Los animales fueron distribuidos en: el grupo control más vehículo (C + Ve; n=6) manipulado con una cánula para la administración oral de agua, y el grupo de estrés crónico variable, al cual se le administró eplerona (ECV + Ep; n=6).

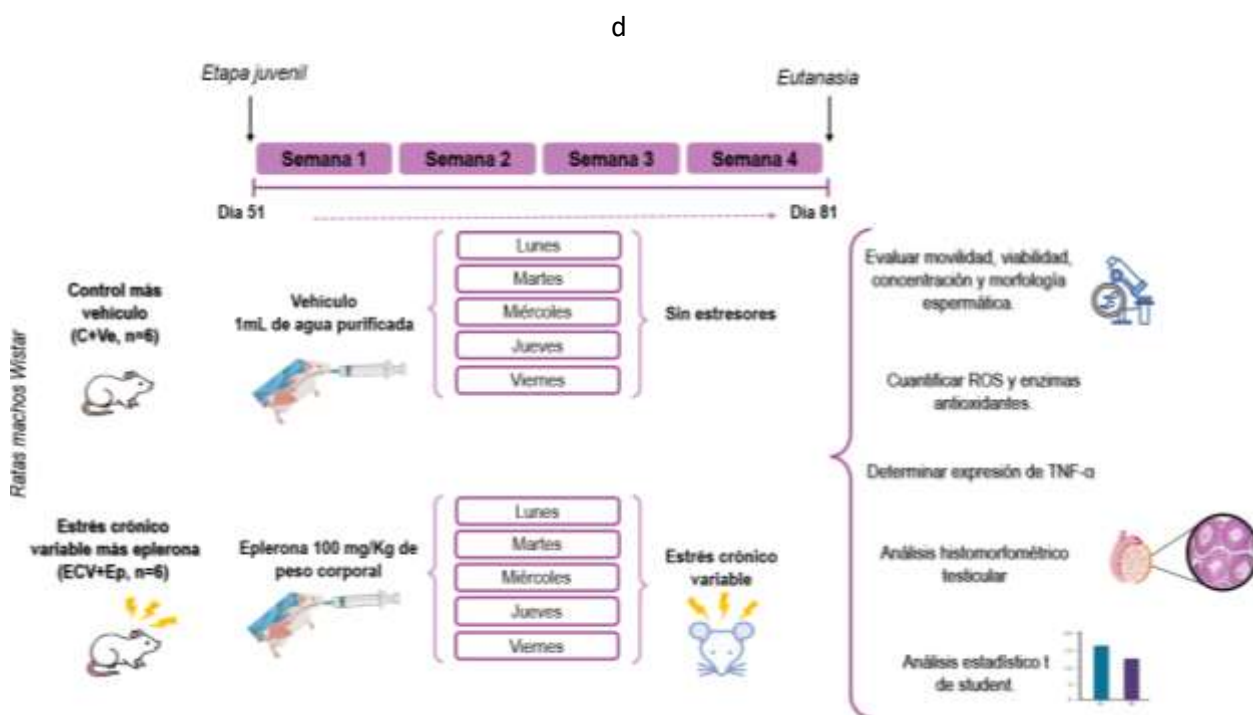


Figura 11. Modelo experimental. Doce ratas macho Wistar de 51 días de edad se distribuyeron en dos grupos experimentales C+Ve y ECV+Ep (n=8 cada uno). Al grupo C+Ve se le administró durante cuatro semanas 1 mL de agua purificada como vehículo. El grupo ECV+Ep fue expuesto a estrés crónico variable por cuatro semanas, empleando 5 tipos de estresores. Previo a la exposición estresante, se administró eplerona (100mg/Kg de peso corporal) mediante sonda orogástrica.

6.2 Estímulo de ECV

La exposición al estrés crónico variable inició en el día 51 de edad en el grupo ECV + Ep, y se realizó durante 4 semanas consecutivas (de lunes a viernes, en horarios distintos mostrados en la Tabla 1), sometiendo a las ratas a cinco tipos diferentes de estrés en el orden: reducción de espacio en caja limpia durante 5 h, donde se colocaron 6 ratas en una caja de acrílico con dimensiones 50 cm x 40 cm x 21 cm, nado forzado en agua caliente a 28°C durante 10 minutos, reducción de espacio en caja sucia donde se colocaron 6 ratas en una caja de acrílico con dimensiones 50 cm x 40 cm x 21 cm, nado forzado en agua fría a 18°C durante 10 minutos, y restricción del movimiento durante 3 horas mediante un tubo de 6 cm X 20 cm (Pérez y cols. 2024) como se muestra en la Figura 9. Se aplicó un tipo de estrés diariamente sin ser repetido en la misma semana para evitar adaptabilidad en las ratas. Ambos grupos fueron sacrificados en el día 81 de edad.

Tabla 1. Horarios de aplicación de estresores en modelo de ECV.

SEMANA	DÍA				
	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
1	Reducción de espacio en caja limpia (5h) (8:00 am-1:00 pm)	Restricción de movimiento (3h) (2:00 pm-5:00 pm)	Nado forzado en agua fría (18°C, 10 min) (1:00 pm-1:10 pm)	Nado forzado en agua caliente (28°C, 10 min) (3:00 pm-3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia (5h) (10:00 am-3:00 pm)
2	Nado forzado en agua caliente (28°C, 10 min) (3:00 pm-3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia (5h) (10:00 am-3:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia (5h) (8:00 am-1:00 pm)	Nado forzado en agua fría (18°C, 10 min) (1:00 pm-1:10 pm)	Restricción de movimiento (3h) (2:00 pm-5:00 pm)
3	Reducción de espacio en caja sucia (5h) (10:00 am-3:00 pm)	Nado forzado en agua fría (18°C, 10 min) (1:00 pm-1:10 pm)	Restricción de movimiento (3h) (2:00 pm-5:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia (5h) (8:00 am-1:00 pm)	Nado forzado en agua caliente (28°C, 10 min) (3:00 pm-3:10 pm)
4	Nado forzado en agua fría (18°C, 10 min) (1:00 pm-1:10 pm)	Nado forzado en agua caliente (28°C, 10 min) (3:00 pm-3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia (5h) (10:00 am-3:00 pm)	Restricción de movimiento (3h) (2:00 pm-5:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia (5h) (8:00 am-1:00 pm)



Figura 12. Estresores empleados en el modelo de estrés crónico variable (ECV). El modelo de estrés crónico variable se emplean cinco tipos de estresores; reducción de espacio en caja limpia y sucia, ambos aplicados durante cinco horas, nado forzado en agua fría y agua caliente durante diez minutos y restricción de movimiento tres horas.

6.3 Administración de eplerona

Al grupo ECV+Ep se le administró por vía oral eplerona como bloqueador del receptor de mineralocorticoides. Se empleó una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Se calculó la dosis de eplerona a cada rata según su peso corporal con la siguiente fórmula $mg \text{ de eplerona} = \frac{\text{Peso de la rata (g)} \times 100 \text{ mg}}{1000 \text{ g}}$. También se determinó la cantidad de fármaco a administrar. Se emplearon grageas de la marca Inspra IC® de 50 mg de eplerona, cada una, con peso de 180 mg. Por lo tanto, se empleó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de Insprac a administrar $mg \text{ de Inspra} = \frac{\text{Dosis calculada de eplerona en mg} \times 180 \text{ mg}}{50 \text{ mg}}$. La cantidad calculada de Insprac para cada rata se diluyó en 1 mL de agua. Dado que la eplerona alcanza su actividad máxima entre 1.5 a 2 horas después de la administración, fue administrada de 1.5 a 2 h antes de la exposición a estrés únicamente de lunes a viernes. La administración se efectuó mediante una sonda orogástrica de 5 FR de diámetro de grosor. El mismo procedimiento fue usado para la administración del vehículo (1mL de agua purificada) en el grupo C+Ve.

6.4 Obtención de los testículos

Finalizada la fase experimental en el día 81 de edad, ambos grupos de ratas fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y posteriormente decapitados. Inmediatamente las ratas se colocaron en posición supina y se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media abdominal. Se extrajeron ambos testículos, 1 fueron pesados en la balanza analítica y conservados en congelación para su posterior análisis.

6.5 Calidad espermática epididimaria

Se tomó una muestra de espermatozoides de la cauda del epidídimo, previamente cortada (300 mg, n=6/grupo), suspendida en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 mL de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), calentada y mantenida en baño maría a 37 ° C en un baño para flotación de tejidos (Premiere XH-1001), donde la cauda se maceró usando una hoja de bisturí (#20) para facilitar la difusión de los espermatozoides inmersa en la solución. Diez minutos después se realizaron alícuotas de 10 µL para evaluar la movilidad, viabilidad, concentración y morfología.

6.5.1 Movilidad

La evaluación de la movilidad se realizó mediante un microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E200LED MV R) utilizando 400 aumentos totales. Sobre un portaobjetos se colocó la muestra espermática y encima un cubreobjetos para realizar el análisis. Se contaron los espermatozoides en movimiento progresivo e inmóviles hasta obtener un total de 200 células; los resultados se expresaron en porcentaje de células móviles e inmóviles.

6.5.2 Viabilidad

La prueba de viabilidad se realizó mediante tinción con eosina-nigrosina (De León-Ramírez y cols. 2021), identificando a los espermatozoides vivos (incolores) y muertos (con color) presentes en el frotis espermático. Los valores de viabilidad se expresaron en porcentaje, para ello, se contaron 200 espermatozoides; se utilizó el objetivo de 40x del microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E200LED MV R).

6.5.3 Concentración espermática

Se utilizó la cámara de Neubauer-improved (Marienfeld Superior) para realizar el conteo celular. Inicialmente se preparó una solución de conteo con Azul de Tripán, bicarbonato de sodio y formaldehído (De León-Ramírez y cols. 2021), y se realizaron diluciones de muestra seminal-solución de conteo según el número de espermatozoides contados en 3 campos a 40x. Una vez hechas las diluciones, se tomaron alícuotas de 10 μ L y se vertieron en cada cámara de Neubauer (A y B), dejando reposar en medio húmedo. Se contaron las células del cuadro superior izquierdo y de acuerdo con el número de espermatozoides presentes, se determinó la cantidad de cuadros centrales a contar, aplicando la misma cantidad de recuadros contados para la cámara A y B (De León-Ramírez y cols. 2021). Ya hecho el conteo, se calculó la concentración espermática en cada muestra, expresando los resultados en millones de espermatozoides/ml de muestra.

6.5.4 Morfología espermática

La evaluación de la morfología espermática incluyó el frotis de la muestra y se secó a temperatura ambiente. Se añadió hematoxilina de Harris durante 10 min, pasado este tiempo se enjuaga en agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió eosina durante 5 minutos, se enjuagó con agua corriente y se dejó secar. Finalmente, se agregaron gotas de cyto seal al portaobjetos y se montó la muestra para ser observada al microscopio con objetivo de 40x. Se realizó el conteo de espermatozoides evaluando la morfología, usando una aplicación digital para contar células sanguíneas (WBC Counter), considerando defectos en cabeza, pieza media o flagelar, hasta contar 200 espermatozoides. Los resultados se representaron en porcentaje de espermatozoides para cada clasificación.

6.6 Análisis histológico del testículo

El análisis histológico fue para el testículo derecho. Inicialmente, se fijó durante 24 horas con solución de Buin. Seguido de esto, con la aplicación de alcohol etílico en concentraciones ascendentes de 50, 60, 70, 80, 96 y 100% se llevó a cabo la deshidratación del tejido. Se aclaró el tejido con xilol y alcohol xilol, y se incluyó en Paraplast Plus, con el uso de “L” y bases de metal. Los tiempos de tratamiento con cada solución se establecen en el anexo 1. Posterior a la inclusión, se realizaron cortes histológicos de 5 μ m de grosor en forma transversal utilizando un

micrótopo y un baño flotador de tejidos con gelatina a 35°C. Se colocaron 8 cortes de tejido por cada portaobjeto, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron con cytoseal 60. Las soluciones utilizadas para la tinción hematoxilina-eosina y su tiempo de aplicación se muestran en el anexo 2.

Se tomaron fotomicrografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 megapíxeles, colocada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 usando el objetivo de 10x para reconstruir el corte testicular con el programa Adobe Photoshop CS. Se hizo el muestreo aleatorio que nos indicó que campos serían contemplado para el análisis histológico. Posteriormente, se fotografiaron a 40x los túbulos presentes en los campos seleccionados, se evaluó el número total de túbulos, la circunferencia de cada uno de ellos, así como el diámetro del lumen y del epitelio germinativo de los mismos con el programa AxioVision REL 4.6 (Figura 13).

La medición del área intersticial se realizó sobre 10 campos del corte testicular completo previamente reconstruido, se tomaron fotomicrografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 megapíxeles colocada en un microscopio óptico Zeiss Zeiss Imager A.1, usando el objetivo de 10x. Posteriormente, mediante el programa Adobe Photoshop CS cada campo fue colocado en fondo blanco, contrastando con otro color cada túbulo presente, y cuantificar el área intersticial con el programa Image J, basándose en la diferencia de colores entre los túbulos y el intersticio.

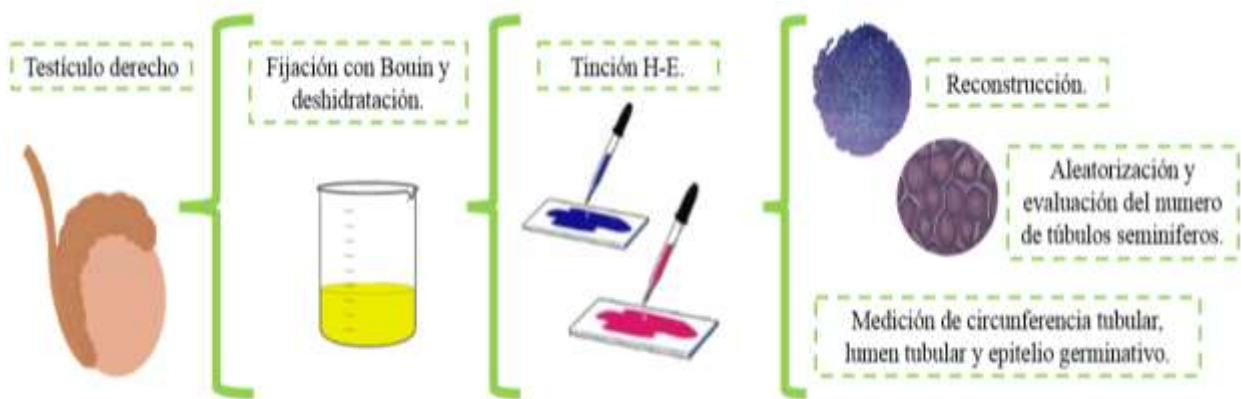


Figura 13. Análisis histológico del testículo.

6.7 Técnica de inmunohistoquímica sobre expresión de TNF- α .

Se utilizaron cortes histológicos del testículo de 5 μm de espesor previamente cortados con un microtomo y montados en laminillas con poli-L-lisina al 10%. Fueron colocados en una solución de citrato de sodio 10 mM con un pH 6 durante 3 noches, conservados a 4°C. Posteriormente, se incubaron en un horno de microondas por 10 minutos a potencia 10 y 1 minuto en potencia máxima para la recuperación de antígenos. Se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se aplicaron 3 lavados con PBS 1x a todas las laminillas por 10 minutos, para el posterior bloqueo de peroxidasas con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se aplicaron dos lavados a las muestras con solución PBS 1X, y posteriormente un solo lavado con solución de PBS Tritón (0.3% en 1X) durante 10 minutos cada uno. Se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas a partir del suero de cabra al 3%, gelatina bovina al 0.25 % y BSA al 4 % disueltos en una solución de fosfatos salina tritón X 100 (PBS-T) al 0.3 % durante 1 hora. Se incubaron con el anticuerpo primario (Policlonal de conejo anti-TNF-alfa, 1:250 ab9739 de abcam) a 4°C durante una noche. Posteriormente, se realizaron lavados nuevamente con solución PBS Tritón (0.3% en 1X), y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo de ratón, 1:250 de santa cruz biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizó el lavado del anticuerpo secundario con PBS Tritón, aplicación del complejo biotina-avidina (1:100) y el revelado mediante kit de sustrato de peroxidasa DAB (Vector Labs USA, No. cat. Sk-4100). Finalmente, las laminillas fueron lavadas y contra teñidas con hematoxilina de Mayer y montadas con resina de grado histológico.

6.8 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

La determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se suspendieron 20 μL de Tris 150 mM con pH 7.5, 90 μL de muestra espermática epididimaria y 300 μL de ácido tiobarbitúrico al 0.4% en un tubo con capacidad de 2 mL. Cada alícuota fue sometida a agitación en vortex e incubación a 100°C durante 45 minutos, y posteriormente a enfriamiento mediante hielo por 2 minutos. Se añadieron 200 μL de KCl al 1.2 % para posteriormente ser centrifugadas durante 3 minutos a 7000 rpm (De León-Ramírez y cols. 2021). Así mismo, se realizó una curva de calibración a partir de una solución stock de malondialdehído 30 μM diluida, en volúmenes ascendentes de 0, 90, 180 y 130 μL y un volumen final de 300 μL . Por último, 180 μL del

sobrenadante fueron colocados en una microplana para la lectura espectrofotométrica a 532 nm en lector de placa BioTec modelo ELx800.

6.9 Actividad de superóxido dismutasa

Se colocó en una microplaca 80 μ L de agua destilada, 20 μ L de muestra espermática epididimaria, 8 μ L de pirogalol 2 mM y 10 μ L de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT, 5 mg de MTT en 1 mL de PBS 1X). Posteriormente, fue incubada a temperatura ambiente y en agitación constante por 5 minutos, donde fue cubierta para evitar la exposición a la luz. Para culminar con el análisis se agregaron 100 μ L dimetilsulfóxido (De León-Ramírez y cols. 2021). Se realizó una curva de calibración a partir de diluciones de 0, 15.62, 31.2, 62.5, 125,250, 500 μ L de una solución stock en un volumen final de 1000 μ L, y se realizó la lectura a 550 nm en un lector de placa BioTec modelo ELx800 (De León-Ramírez y cols. 2021).

6.10 Actividad de catalasa

Se colocaron 5 μ g de proteína de los extractos espermáticos epididimarios en un volumen final de 250 μ L de agua miliQ en tubos de 2 mL y se ajustó el volumen de acuerdo con cada muestra analizada. Así mismo, en cada tubo se añadieron 50 μ L de Tris 25 Mm pH 7.5, 500 μ L de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) al 0.1 M, 250 μ L de H_2O_2 al 0.2 M y una solución de dicromato de potasio al 0.16 M y ácido acético glacial en una concentración de 1:3. Los tubos fueron incubados a 97°C, se colocaron a temperatura ambiente para su enfriamiento, y para su lectura en un lector de placa BioTec modelo ELx800 a 550 nm, se agregaron 200 μ L en una microplaca. La curva de calibración fue realizada con H_2O_2 en concentraciones ascendentes de 0, 10, 20, 40, 80 y 160 nM (De León-Ramírez y cols. 2021).

6.11 Actividad potencial reductor férrico (FRP)

Se utilizó un método colorimétrico donde añadieron 33 μ L de suero, agua destilada de blanco o estándar de ácido ascórbico a 1 mL de solución de potencial de reducción férrica; esta última consta de 25 mL de acetato de sodio 300 mMol/L a pH 3.6, 2.5 mL de hexahidrato de cloruro férrico 20 mMol/L y 2.5 mL de hexacianoferrato de potasio 50 mMol/L. La mezcla de soluciones fue incubada a 37°C por 3 minutos. La solución blanca se leyó a 593 nm a través de un lector de microplacas (Spectramax Plus; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Después, se

realizó una interpolación a partir de una curva de calibración con concentraciones conocidas de ácido ascórbico para cuantificar la capacidad antioxidante en la muestra (De León-Ramírez y cols. 2021).

6.12 Análisis estadístico

Todos los datos son mostrados como la media \pm SEM. Se rectificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, posteriormente la prueba t de Student o U Mann Whitney con el programa GraphPad Prism 5.01 (Graphpath Software, USA), y se determinaron las diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. En todos los casos $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Índices de crecimiento

La administración de eplerona disminuyó significativamente la ganancia de peso corporal en el grupo ECV + EP ($65.68 \text{ g} \pm 8.53$) comparado con el grupo C + VE ($131.3 \text{ g} \pm 7.64$). Así mismo, la ingesta de alimento fue menor en el grupo ECV + EP (8.28 ± 0.26) comparado con el grupo C + VE (9.24 ± 0.13). No se encontraron diferencias en el consumo de agua ni de peso testicular entre los grupos. Sin embargo, el índice de adiposidad disminuyó significativamente en el grupo ECV + EP (2.00 ± 0.33) comparado con el grupo C+Ve (3.13 ± 0.18) (Tabla 2).

Tabla 2. Ganancia de peso corporal (g), ingesta de alimento diario (g), ingesta de agua diaria (mL), peso testicular (g) e índice de adiposidad (g).

	C+Ve, (n=6)	ECV+Ep, (n=6)	Valor de p y estadístico
<i>Ganancia de peso corporal (g)</i>	131.3 ± 7.64	65.68 ± 8.53	t(1, 10) =5.727, p=0.0002
<i>Ingesta de alimento (g/día/100 g de peso corporal)</i>	9.24 ± 0.13	8.28 ± 0.26	t(1, 10) =3.256, p=0.0086
<i>Ingesta de agua (mL/día/100 g de peso corporal)</i>	16.48 ± 1.15	16.64 ± 0.64	t(1, 10) =0.1172, p=0.9090
<i>Peso del testículo de (g/100 g de peso corporal)</i>	0.72 ± 0.09	0.81 ± 0.08	t(1, 10) =0.7200, p=0.4626
<i>Índice de adiposidad (g/100 g de peso corporal)</i>	3.13 ± 0.18	2.00 ± 0.33	t(1, 10) =2.882, p=0.0163

7.2 Calidad espermática

La administración de eplerona previno el efecto del estrés sobre la movilidad, ya que no se hallaron diferencias entre el grupo C+Ve (50.96 ± 5.244) y el grupo ECV+Ep (38.92 ± 5.453) [t (1,10) = 1.592, P= 0.1426; Figura 14A]. Tampoco se presentaron diferencias en la morfología normal de los espermatozoides entre los grupos C+Ve (58.67 ± 8.032) y ECV+Ep (71 ± 4.015) [t (1,10) = 1.374, P= 0.1996; Figura 14B].

La eplerona no eludió el efecto del estrés sobre la viabilidad espermática; se observó una disminución de espermatozoides vivos en el grupo ECV+Ep (46.50 ± 2.872) comparado con el grupo C+Ve (66.17 ± 2.868) [t(1,10)=4.845, p=0.0007; Figura 14C]. Similares resultados encontramos en la concentración espermática. El grupo ECV+Ep (7.889 ± 0.6834) presentó menor concentración de espermatozoides comparado con el grupo C+Ve (14.42 ± 1.171) [t (1,10) = 4.990, p= 0.0004; Figura 14D].

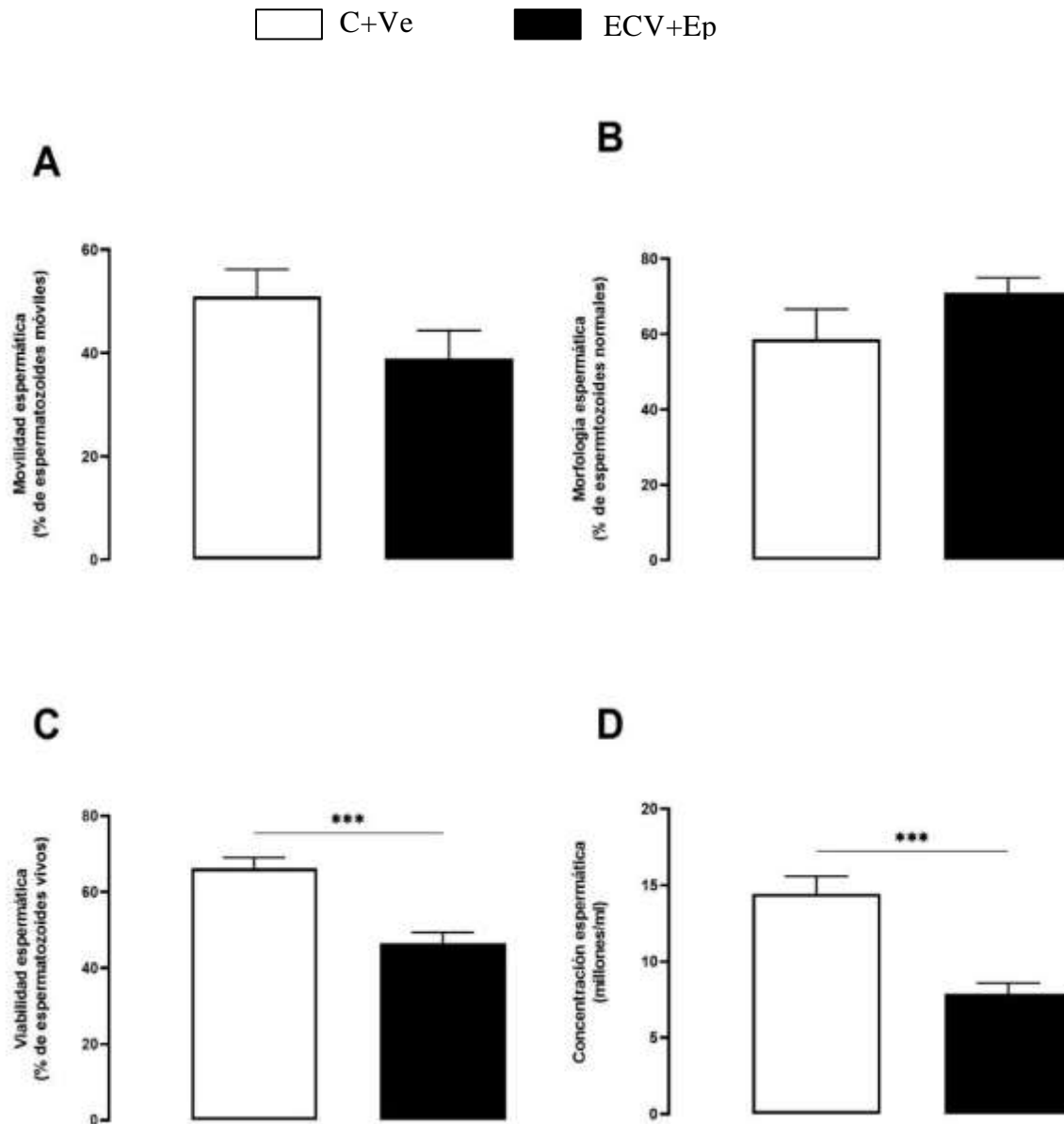


Figura 14. Movilidad espermática (A), morfología normal de espermatozoides (B), viabilidad (C) y concentración espermática (D). Los datos representan la media \pm SEM; *** $p < 0.001$. Prueba estadística *t* de Student. ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona. C+Ve: grupo control más administración de vehículo.

El porcentaje de espermatozoides normales fue similar entre grupos. Sin embargo, al realizar la evaluación de anomalías morfológicas en los espermatozoides, el grupo tratado con eplerona (ECV+Ep) presenta menos defectos de cabeza en los espermatozoides comparado al grupo C + Ve. Resultados similares se observaron en el conteo de espermatozoides anormales

por defecto de pieza media en el grupo ECV + Ep comparado con el grupo control (Tabla 3). Con respecto a los espermatozoides anormales con defecto de flagelos, no existen diferencias entre los grupos experimentales (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de anomalías morfológicas en los espermatozoides.

	C+Ve (n=6)	ECV+Ep (n=6)	Valor de p y estadístico
Espermatozoides con defecto de cabeza (%)	9.213 ± 2.350	2.750 ± 0.7610**	t(1,10)= 2.617, p=0.0257
Espermatozoides con defecto de pieza media (%)	2.367 ± 0.8066	0.4167 ± 0.2007*	t(1,10)= 2.346, p=0.0409
Espermatozoides con defecto de flagelo (%)	29.92 ± 6.367	25.67 ± 3.442	t(1,10)= 0.5881, p=0.5695

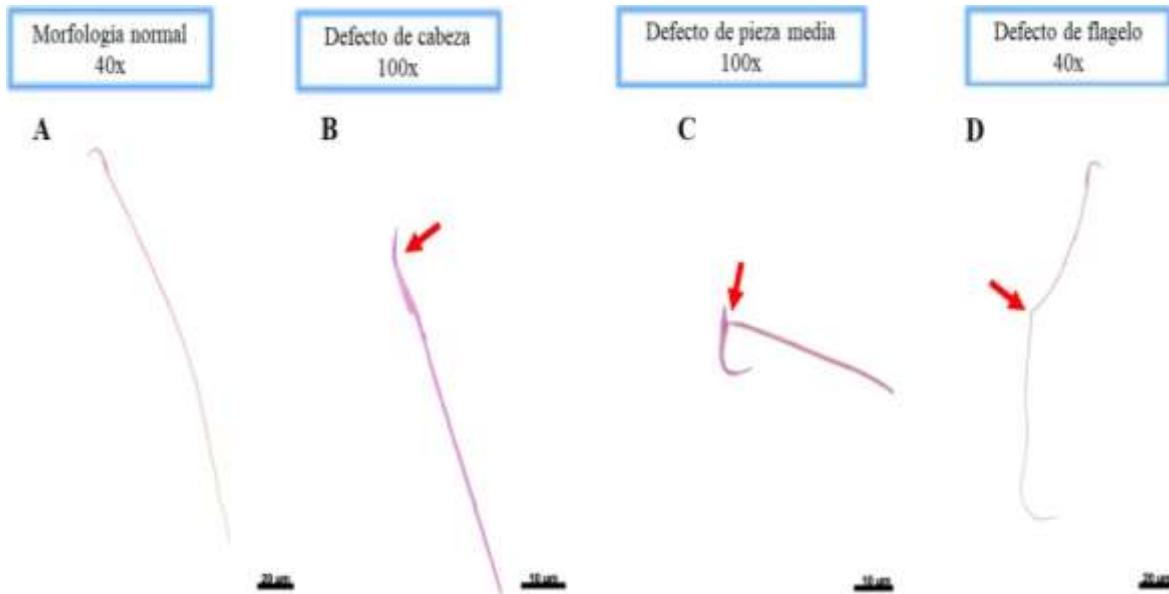


Figura 15. Anormalidades morfológicas del espermatozoide. Microfotografía de morfología normal (A), de defectos de cabeza (B), de defecto de cuello (C) y de defecto de flagelo (D).

7.3 Estrés oxidativo

La concentración de malondialdehído (MDA) aumentó significativamente en los espermatozoides del grupo ECV+Ep (279.90±24.20) comparado con el grupo C+Ve (55.07±13.00) [t (1,10) =8.077, P<0.0001], por lo que la administración de eplerona no previno los efectos del estrés sobre los niveles de MDA (Figura 16A).

Así mismo, se observó que la actividad de la enzima catalasa (CAT) aumentó significativamente en el grupo ECV+Ep (99.23±1.038) en comparación con el grupo C+Ve (91.72±1.341) [t (1,10) =4.429, P=0.0008; Figura 16C]. Resultados similares se encontraron con la enzima superóxido dismutasa (SOD), que aumentó en el grupo ECV+Ep (108.5±2.062), comparado con el grupo C+Ve (38.91±4.896) [t(1,10)=13.10, P<0.0001; Figura 16B]. La actividad potencial reductor férrico (FRP) en el grupo ECV+Ep (103.6±3.203) comparado con el grupo C+Ve (45.52±8.5446) [t (1,10) =6.36, P<0.0001; Figura 16D]. El mismo efecto resultó en la actividad de la caspasa 3 (CAS 3) induciendo diferencias entre el grupo ECV+ Ep (163.8±21.60) y el grupo C+Ve (83.64±5.627) [t(1,10) = 3.592, P=0.0037; Figura 16F] y en la concentración de glutatión (GLUT) entre el grupo ECV+Ep (111.4±6.996) y el grupo C+Ve (94.19±1.979) y [t(1,10)= 2.361, P=0.0399; Figura 15E]. Atribuyendo a la eplerona el aumento de MDA y las enzimas antioxidantes.

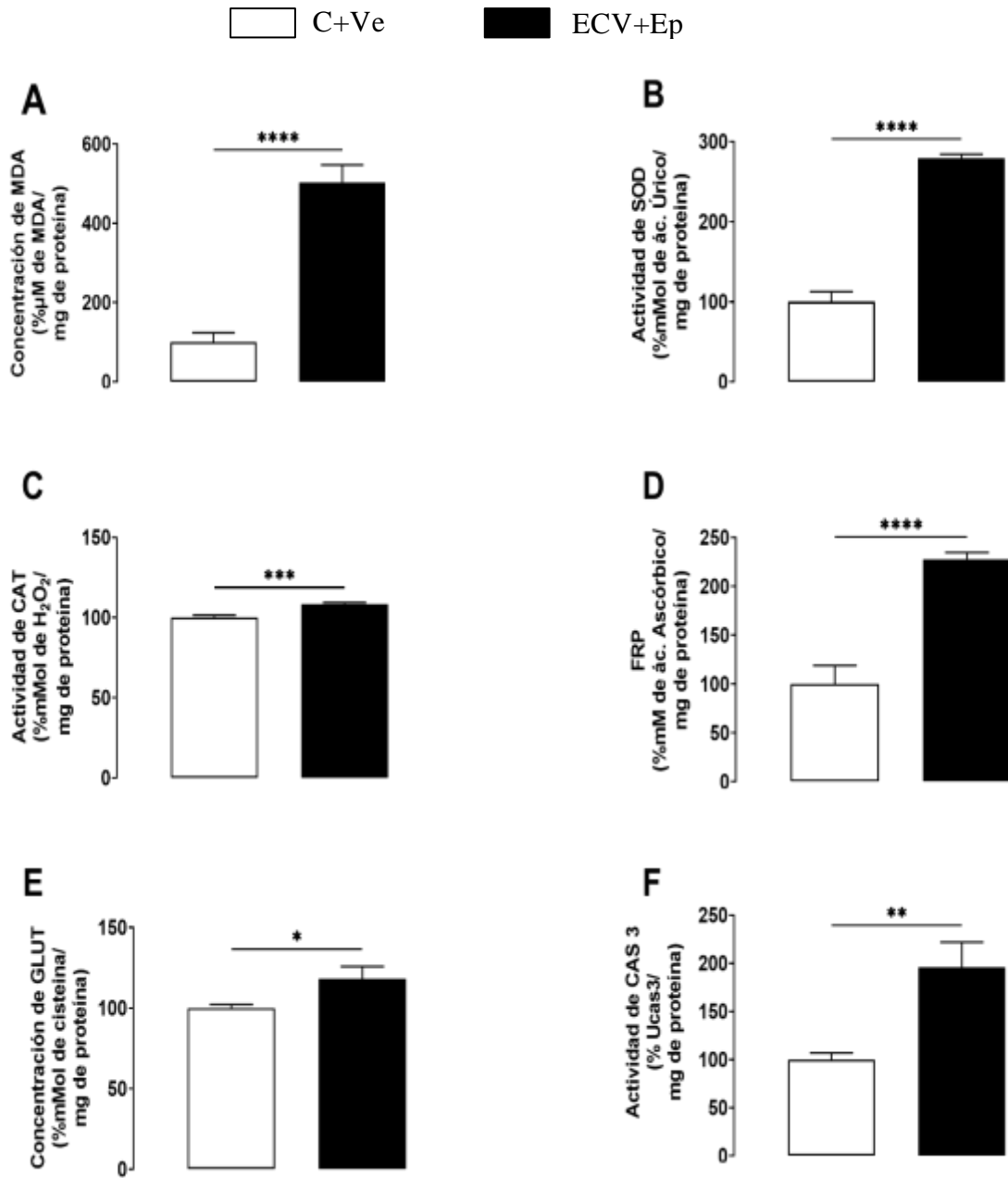


Figura. 16. Análisis de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes. Cuantificación de malondialdehído (MDA, A), actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD, B), catalasa (CAT, C), potencial reductor férrico (FRP, D), caspasa 3 (CAS 3, E) y glutatión (GLUT, F). Los datos representan la media \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Prueba estadística *t* de Student. ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona. C+Ve: grupo control más administración de vehículo. ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona. C+Ve: grupo control más administración de vehículo.

7.4 Inmunohistoquímica

Al evaluar la presencia del marcador proinflamatorio en el tejido testicular, no presentó señalización (representado en color marrón) al ser comparado con un control positivo, cortes de

bazo, como se muestra en la figura 17. Lo que indica que la eplerona previene el proceso inflamatorio que se observa en animales estresados.

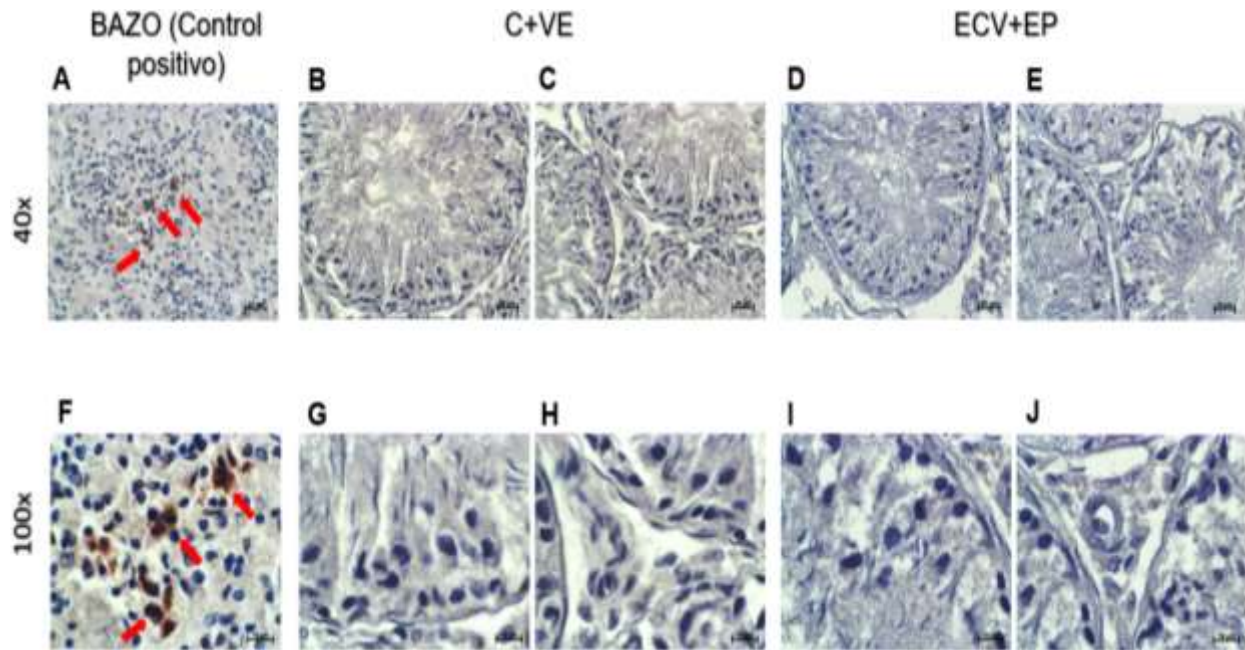


Figura 17. Determinación de citoquina proinflamatoria TNF- α en testículo mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta en el grupo control más administración de vehículo (C+Ve, microfotografías a 40x y 100x B, C, G y H), y grupo ECV+Ep (microfotografías a 40x y 100x D, E, I y J), utilizando como control positivo tejido de bazo (microfotografías a 40x y 100x A y J). C+Ve: grupo control más administración de vehículo y ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona.

7.5. Histología testicular

En el análisis histológico testicular (Figura 19), no se hallaron diferencias en el número de túbulos seminíferos entre el grupo ECV+Ep (200.7 ± 18.58) comparado con el grupo C+Ve (207.5 ± 14.18) [$t(1,10) = 0.2923$, $P = 0.7760$] (Figura 18A). Se observó el mismo efecto en el área de los túbulos entre el grupo ECV+Ep ($26212 \mu\text{m}^2 \pm 1168$) comparado con el grupo C+Ve ($30734 \mu\text{m}^2 \pm 2886$) [$U(1,10) = 7$, $P = 0.0931$] (Figura 18B), en el área de la luz tubular entre el grupo ECV+Ep ($1957 \mu\text{m}^2 \pm 162.5$) comparado con el grupo C+Ve ($2614 \mu\text{m}^2 \pm 637$) [$U(1,10) = 14$, $P = 0.5887$] (Figura 18C) y del epitelio germinativo entre el grupo ECV+Ep ($24263 \mu\text{m}^2 \pm 1216$) comparado con el grupo C+Ve ($28127 \mu\text{m}^2 \pm 2319$) [$U(1,10) = 7$, $P = 0.0931$] (Figura 18D).

La evaluación del área intersticial no mostró diferencias significativas entre los grupos ECV+Ep (177916 $\mu\text{m}^2 \pm 16245$) y el grupo C+Ve (142216 $\mu\text{m}^2 \pm 6129$) [t(1,10)= 2.056, P=0.051] (Figura 18E).

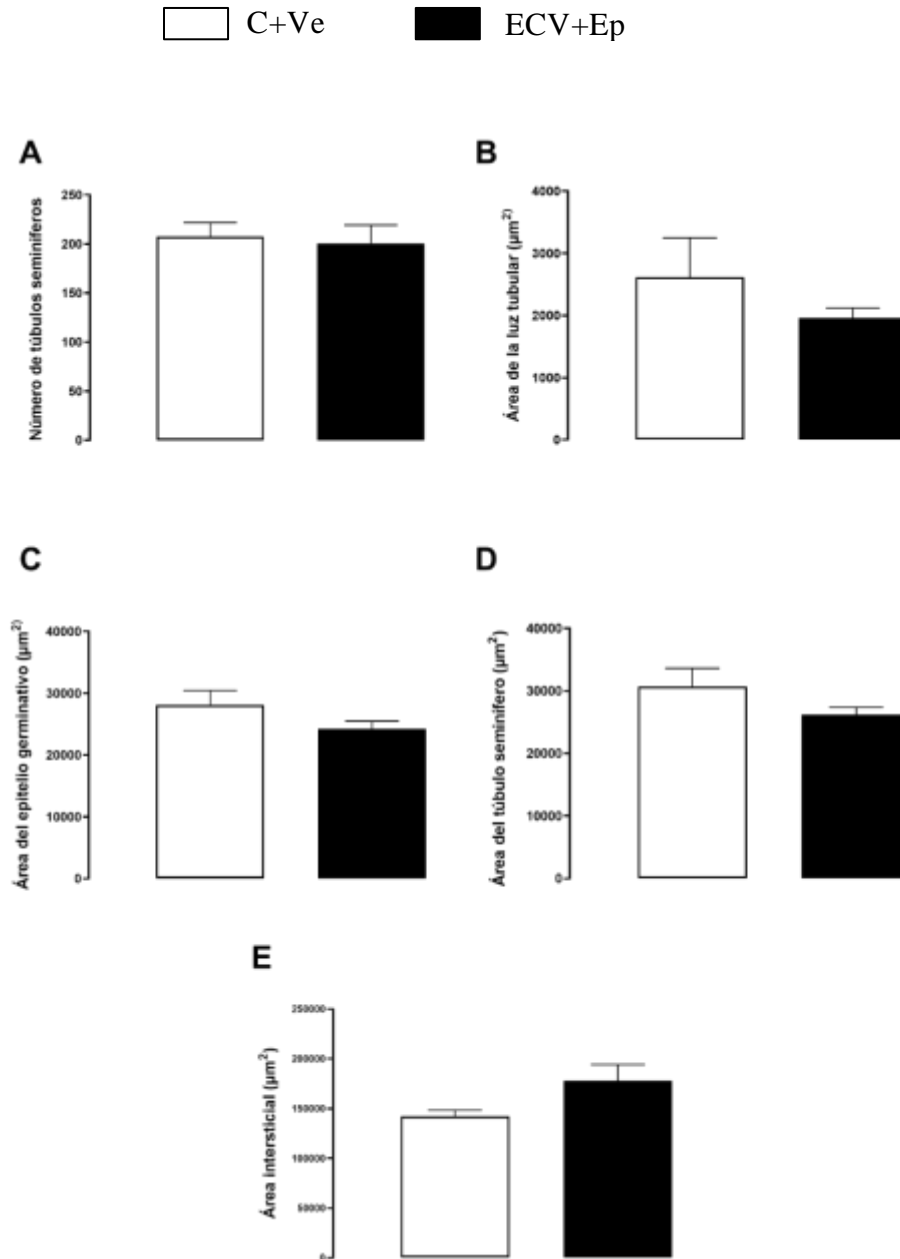


Figura. 18. Análisis histológico testicular. Número de túbulos seminíferos (A), área tubular, (B), área de la luz tubular (C), área del epitelio germinativo (D) y área intersticial (E). Los datos representan la media \pm SEM en prueba estadística t de Student (A y E) y U Mann Whitney (B, C y D). ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona. C+Ve: grupo control más administración de vehículo. ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona. C+Ve: grupo control más administración de vehículo.

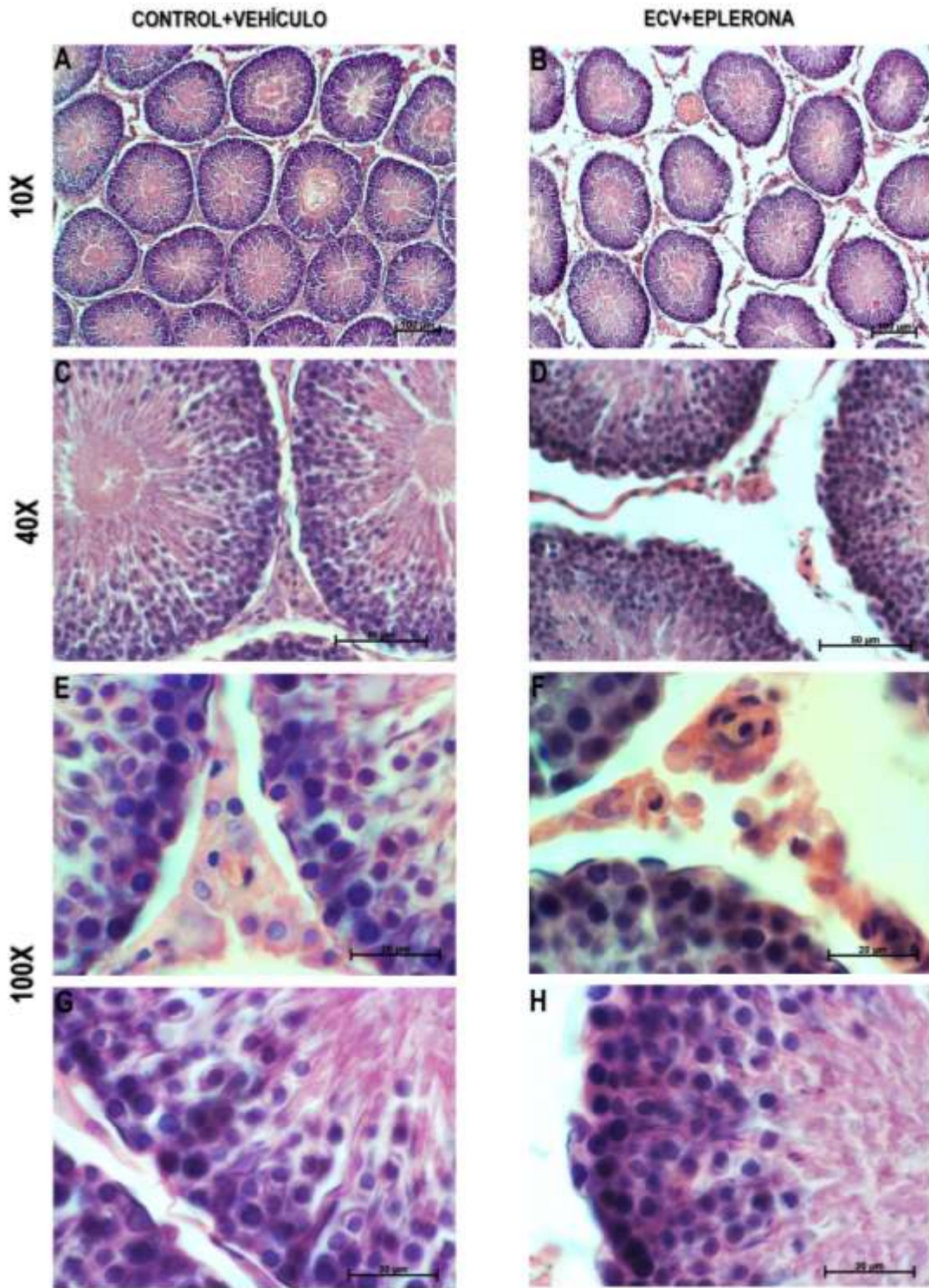


Figura. 19. Evaluación de la morfología testicular mediante tinción de hematoxilina y eosina. En el grupo control más administración de vehículo C+Ve, microfotografías a 10x (A), 40x (C) y 100x (E y G), y grupo ECV+Ep microfotografías a 10x (B), 40x (D) y 100x (F y H). C+Ve: grupo control más administración de vehículo y ECV+Ep: grupo sometido a estrés crónico variable más administración de eplerona.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio, realizado en ratas Wistar jóvenes adultas, se evaluó la participación de aldosterona elevada inducida por estrés crónico, sobre la calidad espermática y la inflamación testicular, al bloquear los receptores de mineralocorticoides mediante la administración de un fármaco antagonista, la eplerona.

Los resultados obtenidos sugieren que la administración de eplerona en el grupo ECV+Ep altera parámetros de crecimiento como ganancia de peso corporal e índice de adiposidad. Wada y cols. (2017), han evaluado los efectos de la eplerona sobre el tejido adiposo en ratas, mostrando que el uso del antagonista del receptor de mineralocorticoide reduce el peso corporal, así como la acumulación de este tejido, mejorando el metabolismo energético. Dicha reducción se debe a la presencia de receptores a mineralocorticoides en tejido adiposo y su bloqueo con dicho antagonista ha resultado en la reducción del tamaño del adipocito, así como el aumento en la producción de adiponectina, que estimula la oxidación de ácidos grasos.

Estos hallazgos indican que la activación de RM por aldosterona en el tejido adiposo desencadena efectos negativos sobre el metabolismo y, al ser bloqueados con eplerona, rompe un ciclo vicioso de trastornos metabólicos generados por dicha hormona (Hirata y cols. 2009). Los niveles elevados de aldosterona potencializan la expresión de los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), así como del RM en tejido adiposo, por lo que, la disminución del peso corporal y del tejido adiposo, propiciado por la eplerona, parte de la inhibición de la activación del RAAS, así como del RM y su expresión. Cabe mencionar que la eplerona ejerce efectos inhibitorios sobre la proliferación de células adipocitos al bloquear RM (Vecchiola y cols. 2020).

Se encontró que tanto de la viabilidad como de la concentración espermática disminuyeron en el grupo estresado con la administración de eplerona. Esto indica que no se previenen totalmente los efectos del estrés sobre la calidad de los espermatozoides. Actualmente, escasos trabajos indican que la administración de eplerona afecta de manera adversa la calidad espermática o al testículo, dado que posee menor afinidad por receptores de andrógenos en comparación con otros antagonistas del receptor de mineralocorticoides (De Gasparo y cols. 1987). Sin embargo, se ha mostrado en perros que al inducir el bloqueo de RM con la administración de eplerona, el

tamaño y peso de la glándula prostática disminuye conforme aumenta la dosis (Levin y cols. 2013). Además, Levin y cols. (2013) mostraron que el volumen de eyaculado también es menor en los perros tratados con eplerona, sin alterarse la testosterona sérica, ni los parámetros de la calidad espermática. Este resultado sugiere que las afecciones encontradas sobre la próstata fueron ocasionadas por el bloqueo de receptores de andrógenos, debido a las elevadas dosis administradas de eplerona, siendo este fármaco capaz de desplazar la actividad androgénica pudiendo alterar la reproducción en machos.

Así mismo, se observó tras administrar espironolactona, que posee mayor afinidad por los receptores de andrógenos que eplerona, los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo no se vieron afectados en morfología, movilidad ni viabilidad (Wong y Lee 1982), Sin embargo, la concentración de espermatozoides disminuye, efecto similar al que encontramos en la evaluación espermática en el grupo de ECV+EP en la presente investigación, ya que los antagonistas del RM como espironolactona y EP en la cauda del epidídimo desregulan la concentración de iones potasio y sodio, aumentando el líquido intraluminal epididimario y diluyendo la concentración de espermatozoides (Wong y Lee 1982).

Turner y Cesarini (1983) tuvieron resultados similares al evaluar la concentración de espermatozoides a lo largo del epidídimo en ratas, a las cuales se les inhibió la actividad mineralocorticoide de aldosterona con un antagonista de su receptor, Ellos propusieron que es la bomba sodio/potasio la encargada del intercambio electrolítico en el epidídimo. Wong y Lee (1982) observaron que los antagonistas de aldosterona pueden alterar la concentración electrolítica, principalmente en la cauda epididimaria, y podrían afectar su capacidad para concentrar espermatozoides, añadiendo que a lo largo del epidídimo se obtiene la maduración y movilidad de los gametos masculinos, y es en la cauda epididimaria donde inician un estado de reposo.

De igual forma, Wong y cols. (1981) observaron que el estado de reposo espermático en la cauda del epidídimo se debe a la gran cantidad de iones K^+ presentes en esa región, lo que permite la inmovilización durante su almacenamiento. Esto favorece mayor concentración de gametos masculinos, que se altera por la ausencia de aldosterona, disminuyendo iones K^+ en la luz de la

cauda. Así, es posible que la aldosterona participe en la regulación de la maduración y almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo.

Por otro lado, los resultados de estrés oxidativo obtenidos hacen hincapié en que la sobreactividad antioxidante se induce al aumentar niveles de SOD, CAT, GLUT y FRP, así como elevación de caspasas y MDA en el grupo ECV+Ep, añadiendo que disminuye la viabilidad y concentración espermática en el grupo tratado con eplerona. No obstante, la baja movilidad espermática asociada al estrés crónico fueron prevenidas por la administración de eplerona. Se ha evidenciado que niveles elevados de ROS provocan una sobreactividad mitocondrial resultando en la generación de ATP indispensable para el movimiento espermático, sumado a las alteraciones morfológicas que se producen por el estrés crónico variable principalmente en la cabeza y el flagelo del espermatozoide (Pérez-Sánchez y cols., enviado) son prevenidos en el grupo ECV+Ep, favoreciendo el correcto desplazamiento espermático.

No se observó marcaje de expresión de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el epitelio germinativo ni en el espacio intersticial, indicando que la eplerona inhibió el proceso inflamatorio inducido por el estrés. De y cols. (1993) mostraron que, en condiciones fisiológicas basales, la expresión de TNF- α en el testículo es normal. Sin embargo, la sobreexpresión puede indicar respuesta inmunológica hacia algún patógeno o proceso inflamatorio. La citoquina es liberada principalmente por espermátidas redondas y espermátocitos paquitenos en el túbulo seminífero y en espacio intersticial por macrófagos y monocitos.

También se ha mostrado la expresión de esta citoquina en las células de Leydig, que intervienen en la respuesta inmunológica del testículo a partir de la expresión de receptores de reconocimiento de patrones específicos como receptores de tipo toll, TLR3 y TLR4 principalmente, capaces de activar la vía de señalización de NF- κ B, para la posterior producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (Shang y cols 2011). Sin embargo, la eplerona es capaz de reducir la expresión de TNF- α y mantener, en condiciones normales, la fosforilación de NF- κ B (Wada y cols. 2017), así como la atenuación de estrés oxidativo en el corazón (Reddy y cols. 2015), riñón y tejido adiposo (Wada y cols. 2017). Estos hallazgos apoyan los resultados en la expresión de TNF- α en tejido testicular en el grupo ECV + EP.

Dado los resultados contradictorios que obtuvimos sobre el estrés oxidativo, así como disminución en algunos parámetros de la calidad espermática, se sugiere que, a causa del tiempo y dosis de administración, la eplerona logra unirse a receptores de andrógenos (RA), desplazando a la testosterona, ya que los receptores de andrógenos en el espermatozoide se encuentran principalmente en el núcleo, la membrana de la cabeza y mitocondrias, y en el testículo en las células peritubulares y células de Sertoli. Los RA desempeñan actividad en la supervivencia y capacitación espermática mediante la vía de señalización PI3K/AKT relacionada a la concentración de andrógenos. Así mismo, la eplerona es capaz de expresar y modular los componentes de la vía PI3K/Akt (Mahajan y cols. 2018), entre estos los proapoptóticos, siendo posible vía por la cual se induzca la muerte celular y estrés oxidativo.

También los RA son indispensables en el proceso de espermatogénesis, tras modular actividad androgénica en las células de Sertoli y las células mioides peritubulares que, al bloquearse por eplerona, pueden inhibir su actividad. De Gendt y cols. (2004) encontraron que, al desactivar selectivamente los RA en células de Sertoli en ratones, no altera la cantidad de estas células sobre el epitelio germinativo. Sin embargo, disminuye el número de espermátocitos y espermátidas redondas, ocasionando una detención de la división meiótica en la espermatogénesis, efectos asociados a la apoptosis celular, y baja expresión de genes que promueven el desarrollo de las células germinales.

Resultados similares encontraron Chang y cols. (2004) al desactivar selectivamente los RA en las células de Sertoli, observando alteraciones en parámetros de la calidad espermática como concentración, viabilidad y movilidad en espermatozoides epididimarios. Así mismo, determinaron que la espermatogénesis es detenida antes de la primera división meiótica al observarse poca población y diferenciación celular en el epitelio germinal, aunado al aumento en la densidad celular apoptótica, efecto que contribuye a la detención del proceso espermatogénico. Zhang y cols. (2006) encontraron que al desactivar RA en células mioides peritubulares del tejido testicular, disminuye el 57% del recuento total de espermatozoides epididimarios, sin alterar otros parámetros de la calidad espermática ni la densidad celular del epitelio germinativo, debido a que las células mioides juegan un papel indispensable sobre las

funciones de las células de Sertoli y la contractibilidad del túbulo seminífero para el transporte de los espermatozoides hacia el epidídimo, ralentizando este proceso.

Estos hallazgos sugieren que cuando eplerona bloquea los receptores androgénicos, es capaz de inhibir su actividad, indispensable para la espermatogénesis, espermiogénesis y maduración de los gametos masculinos, induciendo un proceso apoptótico, tras la detención del ciclo celular, y por consiguiente la disminución en la concentración y viabilidad espermática obtenida en el grupo ECV+Ep. La espermiogénesis también es regulada por la actividad de los andrógenos, capaces de regular a otras vías de señalización como el del sistema renina-angiotensina, que es fundamental en la reproducción masculina. Se ha mostrado que la testosterona promueve la expresión del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1) en el epidídimo de rata, permitiendo la secreción de aniones en dicho órgano, así como la secreción de fluidos (Leung y cols. 2002).

Además, la angiotensina II participa en la formación, maduración y capacitación del espermatozoide. Sin embargo, al bloquear RA que median su actividad en el testículo puede dar lugar a gametos disfuncionales.

Así mismo, al bloquear a los receptores de mineralocorticoides con eplerona, la aldosterona sérica incrementa (Levin y cols. 2013) y desencadena mecanismos de retroalimentación negativa del eje, resultando también en la disminución de los componentes del RAAS, sugiriendo que esos últimos al participar en la formación y maduración espermática, y reducir sus niveles, la morfología espermática normal sea alterada, conduciendo a la aparición de estrés oxidativo y apoptosis en espermatozoides del grupo ECV+Ep, propiciando baja concentración y viabilidad en los gametos así como menor defectos morfológicos observados en este grupo.

Las alteraciones producidas sobre la calidad espermática a partir de un modelo de estrés crónico variable en ratas macho jóvenes no se previenen por completo con la administración de eplerona en dosis de 100 mg/kg de peso corporal, fármaco antagonista del receptor de mineralocorticoides, ya que induce un estado de estrés oxidativo y muerte celular de los espermatozoides, afectando directamente la viabilidad y concentración espermática. Es importante evaluar la histología del epidídimo, así como analizar los efectos de la eplerona sobre la fertilidad y arreglo testicular y epididimario en ratas macho, administrando dosis más bajas

de eplerona (25 mg y 50 mg/kg de peso corporal/día), así establecer con certeza el posible mecanismo ejercido por el fármaco sobre la calidad espermática.

9. CONCLUSIÓN

La administración de eplerona en dosis de 100 mg/Kg de peso corporal revierte los efectos del ECV sobre la movilidad y morfología de los espermatozoides disminuyendo las anomalías, así como en la inflamación testicular. Sin embargo, hubo un efecto citotóxico que incrementó el estrés oxidativo y la apoptosis celular en los espermatozoides epididimarios, disminuyendo la concentración espermática. Esto sugiere que los efectos adversos inducidos por la alta dosis de eplerona sean generados sobre el funcionamiento epididimario, tras el bloqueo del receptor mineralocorticoide.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario evaluar la calidad espermática administrando dosis más bajas de eplerona, 25 y 50 mg/Kg de peso corporal, así como la histomorfometría epididimaria, dado que, al no alterarse el arreglo histológico testicular, posiblemente los efectos encontrados en la disminución de la calidad espermática se deban al epidídimo. Cabe enfatizar que, en el segmento inicial, cabeza y cauda epididimarias hay mayor expresión de receptores a mineralocorticoides, cuya actividad es indispensable para la maduración y almacenamiento espermático.

11. REFERENCIAS

1. Abd EL-Meseeh N, El-Shaarawy E, AlDomairy A, Abou Sehly R. 2016. Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Ann Anat* 205:37-44.
2. Aghazadeh Y, Zirkin B, Papadopoulos V. 2015. Pharmacological regulation of the cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. *Vitam Horm* 98:189-227.
3. Aquila S, Middea E, Catalano S, Marsico S, Lanzino M, Casaburi I, Barone I, Bruno R, Zupo S, Andó S. 2007. Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway. *Hum Reprod* 22(10):2594-605.

4. Auger J. 2010. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl* 12(1):36-46.
5. Azenabor A, Ekun A, Akinloye O. 2015. Impact of inflammation on male reproductive tract. *J Reprod Infertil* 16(3):123-9.
6. Biag J, Huang Y, Gou L, Hintiryan H, Askarinam A, Hahn J, Toga A, Dong H. 2012. Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *J Comp Neurol* 520:6-33.
7. Binart N, Lombès M, Baulieu E. 1995. Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem J* 311(Pt 3):797-804.
8. Bollag W. 2014. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol* 4(3):1017-1055.
9. Bonfiglio J, Inda C, Refojo D, Holsboer F, Arzt E, Silberstein S. 2011. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology* 94:12-20.
10. Borrow A, Heck A, Miller A, Sheng J, Stover S, Daniels R, Bales N, Fleury T, Handa R. 2019. Chronic variable stress alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the female mouse. *Physiol Behav* 209:112613.
11. Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. 2004. *Proc Natl Acad Sci* 101(18):6876-6881.
12. Chen H, Sun F, Zhong X, Shao Y, Yoshimura A, Liu Y. 2013. Eplerenone-Mediated aldosterone blockade prevents renal fibrosis by reducing renal inflammation, interstitial cell proliferation and oxidative stress. *Kidney Blood Press Res* 37:557-566.
13. Choy JT, Eisenberg ML. 2018. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril* 110(5):810-814.

14. Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236.
15. Collodel G, Moretti E, Fontani V, Rinaldi S, Aravagli L, Saragó G, Capitani S, Anichini C. 2008. Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian J Med Res* 128(3):254-261.
16. Cudicini C, Lejeune H, Gómez E, Bosmans E, Ballet F, Sáez J, Jégou B. 1997. Human Leydig Cells and Sertoli Cells are producers of interleukins-1 and -6. *J Clin Endocrinol Metab* 82(5):1426-1433.
17. Corona A, Díaz M, Rodríguez I, Cuevas E, Martínez M, Castelán F, Rodríguez J, Nicolás L. 2015. High sucrose intake ameliorates the accumulation of hepatic triacylglycerol promoted by restraint stress in young rats. *Lipids* 50(11):1103-1113
18. Corona A, Díaz M, Cuevas-Romero E, Luna D, Valente H, Vázquez O, Martínez M, Rodríguez J, Nicolás L. 2017. Interactive effects of chronic stress and a high-sucrose diet on nonalcoholic fatty liver in young adult male rats. *Stress* 20(6):608-617.
19. De S, Chen H, Pace J, Hunt J, Terranova P, Enders G. 1993. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133(1) 389-396.
20. de Gasparo M, Joss U, Ramjoué H, Whitebrear S, Haenni H, Schenkel L, Kraehenbuehl C, Boillaz M, Grob J, Schmidlin J, et al. 1987. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 240(2):650-656.
21. De Gendt K, Swinnen J, Saunders P, Schoonjans, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5):1327-1332.
22. De León Y, Lara M, Pacheco P, Lara O, Martínez M, Cuevas E, et al. 2021. Histomorphological testicular changes and decrease in the sperm count in pubertal rats induced by a high-sugar diet. *Ann Anat* 235:151678.

23. Durairajanayagam D. 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol* 16(1):10-20.
24. Dutta S, Sengupta P, Slama P, Roychoudhury S. 2021. Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male reproduction. *Int J Mol Sci* 22(18):10043.
25. Duval F, González F, Rabia Hassen. 2010. Neurobiology of stress. *Rev Chil. Neuro-psiquiatr* 48(4): 307-318.
26. Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
27. Enyeart J. 2005. Biochemical and Ionic signaling mechanisms for ACTH-stimulated cortisol production. *Vitam Horm* 70:265-279.
28. Fainberg J, Kashanian JA. 2019. Recent advances in understanding and managing male infertility. *8:F1000 Faculty Rev*-670.
29. Fejes G, Pearce D, Fejes A. 1998. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6):2973-2978
30. Fiore C, Sticchi D, Pellati D, Forzan S, Bonanni G, Bertoldo A, Massironi M, Calò L, Fassina A, Rossi GP, Armanini D. 2006. Identification of the mineralocorticoid receptor in human spermatozoa. *Int J Mol Med* 18(4):649-652.
31. Ganong W. 2005. Review of medical physiology, Twenty-Second Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. San Francisco California.
32. Gao X, Yamazaki Y, Tezuka Y, Omata K, Ono Y, Morimoto R, et al. 2021. Pathology of adosterone biosynthesis and its action. *Tohoku J Exp Med* 254(1):1-15.
33. García E, Gómez L, Arenas E, Aragón A, Ibarra- J, Retana M. 2015. Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst Biol Reprod Med* 61(3):150-160.

34. Ge RS, Dong Q, Sottas C, Latif S, Morris DJ, Hardy MP. 2005. Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol* 243(1-2):35-42.
35. Gjerstad J, Lightman S, Spiga F. 2018. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress* 1(5):403-416.
36. Gladstones G, Burton P, Mark P, Waddell B, Robets P. 2012. Immunolocalisation of 11 β -HSD-1 and -2, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor and Na⁺ K⁺-ATPase during the postnatal development of the rat epididymis. *J Anat* 220(4):350-362.
37. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet J, Redmon J, Sparks A, Wang C, Swan S. 2010. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 93(4):1104-1111.
38. Grammatopoulos D, Chrousos G. 2022. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13(10):436-444.
39. Gu N, Zhao W, Wang G, Sun F. 2019. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol* 15;17(1):66.
40. Gu X, Li S, Matsuyama S, DeFalco T. 2022. Immune cells as critical regulators of steroidogenesis in the testis and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:894437.
41. Gupta S, Sundaram C, Reuter S, Garwal B. 2010. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta* 1799(10-12):775-787.
42. Guido C, Santoro M, De Amicis F, Perrotta I, Panza S, Rago V, Cesario MG, Lanzino M, Aquila S. 2014. Human sperm anatomy and endocrinology in varicocele: role of androgen receptor. *Reproduction* 147(5):589-598.
43. Hales D, Diemer T, Hales K. 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 10(3):201-217.

44. Hedger MP, Meinhardt A. 2000. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J Reprod Immunol* 48(2):69-80.
45. Hernández-Cano A E. 2021. El hiperaldosteronismo induce estrés oxidativo y disminuye la calidad espermática en ratas machos jóvenes. Tesis de la Licenciatura de Química Clínica. Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana.
46. Hess R, De Franca L. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*, 636:1-15.
47. Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. 2009. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res* 84(1):164-172.
48. Hussein M, Abou-Deif E, Bedaiwy M, Said T, Mustafa M, Nada E, Ezat A, Agarwal A. 2005. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 83(5):1447-1453.
49. Janevic T, Kahn L, Landsbergis P, Cirillo P, Cohn B, Liu X, Factor-Litvak P. 2014. Effects of work and life stress on semen quality. *Fertil Steril* 102(2):530-538.
50. Jin JM, Yang WX. 2014. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene* 551(1):15-25.
51. Jones R, Mann T, Sherins R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31(5):531-537.
52. Joseph D, Whirledge S. 2017. Stress and the HPA Axis: balancing homeostasis and fertility. *Int J Mol Sci* 18(10):2224.
53. Jurewicz J, Radwan M, Merez-Kot D, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. 2014. Occupational, life stress and family functioning: does it affect semen quality? *Ann Hum Biol* 41(3):220-228.

54. Kellner M, Peiter A, Hafner M, Feuring M, Christ M, Wehling M, Falkenstein E, Losel R. 2003. Early aldosterone up-regulated genes: new pathways for renal disease? *Kidney Int* 64:1199-1207.
55. Kemal D, Morshedi M, Oehninger S. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74(6):1200-1207.
56. Kim H, Cheon E, Bai D, Lee Y, Koo B. 2018. Stress and heart rate variability: A meta-analysis and review of the literature. *Psychiatry Investig* 15(3):235-245.
57. Kolbasi B, Bulbul M, Karabulut S, Altun C, Cakici C, Ulfer G, Mudok T, Keskin I. 2021. Chronic unpredictable stress disturbs the blood–testis barrier affecting sperm parameters in mice. *Reprod Biomed Online* 42(5):983-995.
58. Koolhaas J, Bartolomucci A, Buwalda B, De Boer S, Flügge G, Korte S, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijik G, Wöhr M, Fuchs E. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35(5) 1291-1301.
59. Kumar N, Singh A. 2021. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biol Reprod* 104(3):508-520.
60. Kyrou I, Tsigos C. 2008. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones (Athens)* 7(4):287-293.
61. Leistner C, Menke A. 2020. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress. *Handb Clin Neurol* 175:55-64.
62. Leung PS, Wong TP, Chung YW, Chan HC. 2002. Androgen dependent expression of AT1 receptor and its regulation of anion secretion in rat epididymis. *Cell Biol Int* 26(1):117-122.
63. Levin E, McMahon E, John-Baptiste A, Bell R. 2013. Prostate effect in dogs with the aldosterone receptor blocker eplerenone. *Toxicol Pathol* 41(2):271-279.
64. Levy D, Rocha R, Funder J. 2004. Distinguishing the antihypertensive and electrolyte effects of eplerenone. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2736-2740.

65. Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler C, Aono T. 2002. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 54(1-2):33-42.
66. Mahajan U, Chandrayan G, Patil C, Arya D, Suchal K, Agrawal Y, Ojha S, Goyal S. 2018. Eplerenone attenuates myocardial infarction in diabetic rats via modulation of the PI3K-Akt pathway and phosphorylation of GSK-3 β . *Am J Transl Res*. 10(9):2810-2821.
67. Makeyeva Y, Nicol C, Ledger WL, Ryugo DK. 2020. Immunocytochemical localization of olfactory-signaling molecules in human and rat spermatozoa. *J Histochem Cytochem* 68(7):491-513.
68. Mäkelä J, Koskenniemi J, Virtanen H, Toppari J. 2019. Testis development. *Endocr Rev* 40(4):857-905.
69. Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J. 2003. Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 23:763-776.
70. Malcher R, Di S, Marcheselli V, Weng F, Stuart C, Bazan N, Tasker J. 2006. Opposing crosstalk between Leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 26(24):6643-6650.
71. Markou A, Sertedaki A, Kaltsas G, Androulakis, I., Marakaki, C, Pappa T, Gouli A, Papanastasiou L, Fountoulakis S, Zacharoulis A, Karavidas A, Ragkou D, Charmandari E, Chrousos G, Piaditis G. 2015. Stress-induced aldosterone hypersecretion in a substantial subset of patients with essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 100(8):2857-2864.
72. Martínez P, Proverbio F, Camejo M. 2007. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian J Androl* 9(1):102-107.
73. Matisz C, Badenhrst C, Gruber A. 2021. Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation. *Stress* 24(5):635-644.

74. McNeilly A, De Kretser D, Sharpe R. 1979. Modulation of prolactin, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) secretion by LHRH and bromocriptine (CB154) in the hypophysectomized pituitary-grafted male rat and its effect on testicular LH receptors and testosterone output. *Biol Reprod* 21(1):141-147.
75. McGraw J, Cherney M, Bichler K, Gerhardt A, Nauman M. 2019. The relative role of CYP3A4 and CYP3A5 in eplerenone metabolism. *Toxicol Lett* 315:9-13.
76. Midzak A, Akula N, Lecanu L, Papadopoulos V. 2011. Novel androstenediol interacts with the mitochondrial translocator protein and controls steroidogenesis. *J Biol Chem* 286(11):9875-9887.
77. Mikulska J, Juszczak G, Gawrońska M, Herbet M. 2021. HPA Axis in the pathomechanism of depression and schizophrenia: new therapeutic strategies based on its participation. *Brain Sci* 11(10):1298.
78. Moore K. 1979. *Embriología Clínica*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F.
79. Murthy N, Wray S, Melville G, Wynter H, Ram N y Haran N. 1988. Testicular function in rats following immobilization stress. *Int J Gynaecol Obstet* 26(2):297-299.
80. Myers B, McKlveen J, Herman J. 2018. Neural regulation of the stress response: the many faces of feedback. *Cell Mol Neurobiol* 10:1007/s10571-012-9801-y.
81. Nordkap L, Priskorn L, Bräuner EV, Marie Hansen Å, Kirstine Bang A, Holmboe SA, Winge SB, Egeberg Palme DL, Mørup N, Erik Skakkebaek N, Kold Jensen T, Jørgensen N. 2020. Impact of psychological stress measured in three different scales on testis function: a cross-sectional study of 1362 young men. *Andrology*. 8(6):1674-1686.
82. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin I, Goldstein D. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275(4): R1247-R1255.

83. Pérez E, Corona A, Arroyo O, Soto I, Cruz Lumbreras S, Rodríguez J, Cuevas E, Nicolás L. 2024. Chronic unpredictable mild stress increases serum aldosterone without affecting corticosterone levels and induces hepatic steatosis and renal injury in young adult male rats. *J Mol Histol* 55(3):265-278.
84. Picut C, Remick A, De Rijk E, Simons M, Stump D, Parker G. 2015. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol* 43(3):326-342.
85. Pogotto U, Marsicano G, Fezza F, Theodoropoulou M, Grübler Y, Stalla J, Arzberger T, Milone A, Losa M, Di Marzo V, Lutz B, Stalla G. 2001. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2687-2696.
86. Protopapas N, Hamilton L, Warkentin, R, Xu W, Sutovsky P, Oko R. 2019. The perforatorium and postacrosomal sheath of rat spermatozoa share common developmental origins and protein constituents. *Biol Reprod* 100(6): 1461-1472.
87. Reddy N, Mahajan U, Patil C, Agrawal Y, Ojha S, Goyal S. 2015. Eplerenone attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in β -receptor stimulated myocardial infarcted rats. *Am J Transl Res*. 7(9):1602-1611.
88. Rival C, Lustig L, Iosub R, Guazzone V, Schneider E, Meinhardt A, Fijak M. 2006. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell Tissue Res* 324(2):311-318.
89. Roldan E, Gomendio M, Vitullo D. 1992. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol Rev Camb Philos Soc* 67(4):551-593.
90. Rosiepen G, Weinbauer G, Schlatt S, Behre H, Nieschlag E. 1994. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium, estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique, in laboratory and feral rats. *J Reprod Fertil* 100(1):299-306.

91. Rossi P, Dolci S. 2013. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:181.
92. Roy J, Hill E, Ruan Y, Vedovelli L, Păunescu, T, Brown D y Breton, S. 2013. Circulating aldosterone induces the apical accumulation of the proton pumping V-ATPase and increases proton secretion in clear cells in the caput epididymis. *Am J Physiol Cell Physiol* 305(4):C436-C446.
93. Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
94. Sánchez C, Cuevas E, Soto I, Arteaga M., De León Y, Rodríguez J, Nicolás L. 2020. High-sucrose diet potentiates hyperaldosteronism and renal injury induced by stress in young adult rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 47(12):1985-1994.
95. Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G, Lovell R. 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 274(2):271-279.
96. Shang T, Zhang X, Wang T, Sun B, Deng T, Han D. 2011. Toll-like receptor-initiated testicular innate immune responses in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 152(7):2827-2836.
97. Shalet SM. 2009. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer* 53(2):285-288.
98. Struthers A, Krum H, Williams G. 2008. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol* 31(4):153-158.
99. Tam T, Wu M, Masson S, Tsang M, Stabler S, Kinkade A, Tung A, Tejani A. 2017. Eplerenone for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2(2):CD008996.
100. Tafet G, Nemeroff C. 2015. The links between stress and depression: psychoneuroendocrinological, genetic, and environmental interactions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 28(2):77-88.

101. Tasker J, Herman J. 2011. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14(4):398-406.
102. Tavilani H, Goodarzi M, Vaisi-Raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. 2008. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int Braz J Urol* 34:485-491.
103. Theas M. 2018. Germ cell apoptosis and survival in testicular inflammation. *Andrologia* 50(11):e13083.
104. Tresguerres J, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil P, Lahera V, Mora F, Tamargo J. 2005. *Fisiología Humana*. Editorial. McGraw Hill Interamericana de España, S.A.U. Madrid.
105. Turner T, Cesarini D. 1983. The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. *J Androl*. 4(3):197-202.
106. Vandenamee P, Gilluzi L, Berghe T, Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10):700-714.
107. Vecchiola A, Fuentes C, Solar I, Lagos C, Opazo M, Muñoz N, Riedel C, Owen G, Kalergis A, Fardella C. 2020. Eplerenone implantation improved adipose dysfunction averting RAAS activation and cell division. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:223.
108. Verrey F. 1998. Early aldosterone effects. *Exp Nephrol*, 6:294-301.
109. Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. 2017. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol* 235(3):179-191.
110. Wang Y, Chen F, Leping Y, Zirkin B, Chen H. 2017. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction* 154(4):R111-R122.
111. Wong P, Lee M. 1982. Effects of spironolactone (aldosterone antagonist) on electrolyte and water content of the cauda epididymidis and fertility of male rats. *Biol Reprod* 27(4):771-777.

112. Wong P, Lee W, Tsang A. (1981). The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. *Exp. Cell Res.* 131:97-104.
113. Wu F, Lun Y, Lui Q. 2018. The emerging role of aldosterone/mineralocorticoid receptors in the pathogenesis of erectile dysfunction. *Endocrine* 61(3):372-382.
114. Xiong Y, Chang Y, Hao J, Zhang C, Yang F, Wang Z, Liu Y, Wang X, Mu S and Xu Q. 2021. Eplerenone attenuates fibrosis in the contralateral kidney of UUO rats by preventing macrophage-to-myofibroblast transition. *Front. Pharmacol* 12:620433.
115. Xue J, Schmidt S, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel T, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino A, Mallmann M, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman T, Ulas T, Schultze L. 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40(2):274-288.
116. Yang Y, Harmon C. 2017. Molecular signatures of human melanocortin receptors for ligand binding and signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(10 Pt A):2436-2447.
117. Yogo K. 2022. Molecular basis of the morphogenesis of sperm head and tail in mice. *Reprod Med Biol* 21(1): e12466.
118. Yu L, Li C, Zhang H. 2013. Updated immunoregulation mechanism of the testis. *Zhonghua Nan Ke Xue* 19(5):456-459.
119. Zhang J, Huang B, Hu G, Zhan X, Xie T, Li S, Zhang X, Li H, Ge R, Xu Y. 2018. Aldosterone blocks rat stem Leydig cell development in vitro. *Front Endocrinol* 9:4.
120. Zhu Y, Yin Q, Wei D, Yang Z, Du Y, Ma Y. 2019. Autophagy in male reproduction. *Syst Biol Reprod Med.* 65(4):265-272.
121. Zirkin B, Chen H, Luo L. 1997. Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Exp. Gerontol* 32(4-5):529-537.

122. Zirkin B, Papadopoulos V. 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99(1):101-111.
123. Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. 2006. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci* 103(47):17718-17723.
124. Zou P, Wang X, Yang W, Liu C, Chen Q, Yang H, Zhou N, Zeng Y, Chen H, Zhang G, Liu J, Cao J, Ao L, Sun, L. 2019. Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS). *Int J Mol Sci* 20(18):4470.

12. PUBLICACIONES



XLVIII Reunión Anual

Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A. C.

Centro Cultural Universitario, UMSNH

Morelia, Michoacán

Agosto 13 al 16, 2023

33. EFECTO DE LA EPLERONA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL EN RATAS JÓVENES ADULTAS ESTRESADAS

Osorio Pérez TG¹, Nolasco-Garduño VG¹, Lucio-Lucio RA², De León-Ramírez YM³, Rodríguez-Antolín J², Nicolás-Toledo L².

¹Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. ³Facultad de Química Clínica, Universidad autónoma de Tlaxcala.

En la rata, hemos mostramos que el estrés aumenta los niveles de aldosterona, disminuye la concentración de testosterona sérica y baja concentración espermática, movilidad, viabilidad. Se ha reportado que las células de Leydig tienen receptores de aldosterona y dicha hormona regula el equilibrio de líquidos y electrolitos en el epidídimo. Además, el aumento de aldosterona inhibe la proliferación y maduración de las células de Leydig. El presente trabajo pretende bloquear la unión de aldosterona con su receptor, el cual vincula el estrés y los niveles elevados de aldosterona que puedan inducir baja calidad espermática en ratas jóvenes, con un fármaco antagonista. Ratas machos Wistar de 51 días de edad, se asignaron de manera aleatoria en dos grupos (6/grupo): grupo control (C) y grupo estrés crónico (SC), los cuales tuvieron acceso libre a agua simple y dieta Chow 5001 purina. Dos horas antes del estímulo del estrés fue administrada la eplerona. El estrés crónico consistió en exponer a la rata a 5 diferentes tipos de estrés en diferentes horarios durante 4 semanas: reducción del espacio con caja limpia (5 horas) y con caja sucia (5 horas), nado forzado en agua caliente (28 °C) y en agua fría (18 °C) (10 minutos) y restricción de movimiento (3 horas). Al final del experimento se realizó la eutanasia. Inmediatamente se extrajo una muestra de espermatozoides de la cauda epididimal (en solución salina tamponada con fosfato) para la evaluación de la calidad espermática. En conclusión, el bloqueo de aldosterona revirtió parcialmente los efectos del estrés crónico sobre la calidad espermática y potenció los efectos del estrés oxidativo.

Categoría: M



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.

TENEMOS EL HONOR DE OTORGAR LA PRESENTE CONSTANCIA A
**Osorio Pérez TG, Nolasco-Garduño VG, Lucio-Lucio
RA, De León-Ramírez YM, Rodríguez-Antolín J,
Nicolás-Toledo L**

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL CARTEL
**EFECTO DE LA EPLERONA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL
EN RATAS JÓVENES ADULTAS ESTRESADAS**

XLVIII Reunión Anual del AIBIR

DEL 13 AL 16 DE AGOSTO DE 2023

CENTRO CULTURAL UNIVERSITARIO, UMSNH MORELIA, MICHOACAN.

DRA. CARMEN YOLANDA ACEVES VELASCO
PRESIDENTE

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
SECRETARIA

Influence of chronic stress on oxidative stress in epididymal spermatozoa of young rats

Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez¹, Eliut Pérez Sánchez^{2,4}, Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño¹, Leticia Nicolás Toledo³

1. Maestría en ciencias Biológicas, 2. Licenciatura en Química Clínica, 3. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. 4. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala Corresponding autor: Leticia Nicolás Toledo. Km 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla S/N, La Loma Xicohtencatl, C.P. 90070, Tlaxcala, Tlaxcala. teléfono: 2464621557

e-mail: leticia.nicolast@uatx.mx

In adult rats, chronic stress has been reported to affect spermatogenesis, with the loss of germ cells and the inicio of an apoptotic process. We have found that chronic stress increases aldosterone levels in young adult rats. Leydig cells have aldosterone receptors, and this hormone is a regulator of fluid and electrolyte balance in the epididymis. In addition, the proliferation and maturation of the Leydig cells are inhibited by an increase in aldosterone. The present study aimed to evaluate the effects of elevated aldosterone levels induced by chronic stress on oxidative stress and sperm quality. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, was used. Two experiments were designed. The first consisted of control and chronic unpredictable mild stress (CUMS). The second consisted of control + vehicle (C + veh), CUMS + eplerenone (CUMS + EP, 100 mg/ kg/día of eplerenone diluted in 1 mL of tap water). On postnatal day 51, eplerenone was administered orally through a gastric tube two hours before the start of the stress. The stress stimuli consisted of 5 different stimuli: reduction of space in a clean cage for 5 hours, restriction of movement for 3 hours, forced swimming in cold water for 10 minutes, forced swimming in warm water for 10 minutes, and reduction of space in a dirty cage for 5 hours. The order of the stressor stimuli was different during each week, excluding the weekend. In the first experiment, sperm motility, viability, concentration, and morphology were lower the JE4 group than in the control group. In the JE4 group, SOD activity was lower than in the control group. At the same time, the CAS3 activity was higher compared to the control group. In the second experiment, sperm viability and sperm concentration were lower in the JE4 + EP group than in the control + Veh group. In the JE4 + EP group, TBARS, SOD, CAT, and CAS3, were higher than in the control group + Veh group. In conclusion, aldosterone is increased by chronic stress-induced oxidative stress however, the eplerenone potentiates oxidative stress, sperm cell death, and thus reduced sperm quality.

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Tonantzi Guadalupe Osorio Pérez

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

Influence of chronic stress on oxidative stress in epididymal spermatozoa of young rats

Por:

En la modalidad de cartel en el VIII Congreso de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina
26 - 29 de septiembre de 2023, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Atentamente
Por el Comité Organizador



Dra. Mina Königsberg Fainstein





**XLIX
Reunión
Anual**

**Academia de Investigación en
Biología de la Reproducción A.C.**
19 al 22 de julio de 2024
Veracruz, Ver.

R35-2024M. EL CONSUMO DEL PROBIÓTICO LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM 299V PREVIENE LA BAJA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS MACHO PERIPUBERALES. Osorio Pérez TG, Pérez Sánchez E, Nicolás Toledo L

¹Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

En la rata macho peripuberal, el estrés crónico por restricción de movimiento incrementa la concentración de corticosterona sérica. La corticosterona elevada ha sido asociada con el aumento de estrés oxidativo e inflamación testicular que causan baja calidad espermática. El probiótico *Lactiplantibacillus plantarum* 299V (LP299v) tiene efectos antiinflamatorios sistémicos y antioxidantes. La cepa LPP101 reduce la inflamación testicular y estrés oxidativo inducido por ingesta de alcohol en ratas adultas. El objetivo del presente estudio es evaluar si el consumo de LP299V previene la disminución de la calidad espermática y las alteraciones morfológicas en el espermatozoide inducido por estrés crónico por restricción de movimiento en la rata macho peripuberal. Ratas macho de la cepa Wistar de 21 días de edad, fueron asignadas en 4 grupos (n=5/grupo): control más vehículo (C+Veh), control más probiótico (C+Pro), estrés más vehículo (St+Veh) y estrés más probiótico (St+Pro). Los grupos C+Veh y C+Pro no fueron perturbados durante el experimento, excepto para registrar el peso corporal, ingesta de agua y alimento. Los grupos estresados se sometieron a estrés por restricción de movimiento utilizando un tubo rígido por una hora durante 5 días/semana durante 4 semanas. El probiótico o vehículo (500 µL) se proporcionó mediante una jeringa de insulina vía oral durante 4 semanas. A los 51 días de edad se realizó la eutanasia y extracción de espermatozoides de la cauda epididimaria para evaluar la calidad espermática. El estrés crónico redujo la motilidad, viabilidad y concentración espermática y provocó anomalías morfológicas en cabeza y flagelo. El consumo del probiótico LP299V previno la baja calidad espermática y redujo las anomalías morfológicas de la cabeza y flagelo. En conclusión, el consumo de LP299V previene los efectos deletéreos sobre la calidad espermática a temprana edad.



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

OTORGA EL PRESENTE
RECONOCIMIENTO

A: Osorio Pérez TG, Pérez Sánchez E, Nicolás Toledo L

Por la presentación del póster titulado

**EL CONSUMO DEL PROBIÓTICO LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM 299V
PREVIENE LA BAJA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL INDUCIDA POR
ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS MACHO PERIPUBERALES**

en la XLIX reunión de la Academia de Investigación en Biología de la
Reproducción (AIBIR)

Veracruz, Ver., del 19-22 de julio 2024

DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ
MOTA
Presidenta

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO
Secretaria



EL HIPERALDOSTERONISMO INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO CAUSA REDUCCIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RATA MACHO JÓVEN

Osorio Pérez TG¹, Pérez-Sánchez E², Corona-Pérez A³, Lucio RA², Rodríguez-Antoñín J², Nicolás-Toledo L².

¹Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala, ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

³Licenciatura en Nutrición. Unidad Académica Multidisciplinaria Calpulalpan, UATx.

En humanos, se observó una disminución de la calidad espermática desde 1938 hasta 2019, asociada al estilo de vida. El estrés crónico es un factor de riesgo relacionado con la disminución de la fertilidad masculina. En ratas, hemos mostrado que el estrés crónico leve e impredecible (ECLI) provoca un incremento de aldosterona, más que de corticosterona. Además, se asocia con inflamación y fibrosis que inducen daño renal y hepático. Hasta ahora, no se conocen los efectos de la aldosterona sobre la calidad espermática en individuos con estrés crónico. La hipótesis de este trabajo es que el hiperaldosteronismo inducido por ECLI provoca una reducción de la calidad espermática, induce inflamación testicular y estrés oxidativo en el espermatozoide epididimario de la rata macho joven. Se usaron 16 ratas macho Wistar de 51 días de edad, asignadas de manera aleatoria en dos grupos (8 por grupo): el grupo control (C) no fue perturbado durante el experimento, mientras que al grupo ECLI se le aplicó el paradigma de estrés crónico leve e impredecible una vez al día a diferentes horas, sin repetición de la secuencia estresante durante cuatro semanas. Al final del experimento, se obtuvo suero para medir la testosterona sérica. En el testículo, se analizó la histomorfometría y se identificó la expresión del factor de necrosis tumoral alfa. De la cauda epididimaria se extrajeron espermatozoides para evaluar la calidad espermática y el estrés oxidativo. En el grupo ECLI se redujeron la testosterona sérica, la motilidad, la concentración y la viabilidad. En los espermatozoides se observaron anomalías en cabeza y flagelo, así como inflamación testicular y estrés oxidativo epididimario. En conclusión, el estrés crónico induce hiperaldosteronismo, inflamación testicular y estrés oxidativo epididimario, lo que provoca la reducción de la calidad espermática.

Agradecimientos: CONAHCYT (CVU:1232927)



LXVII

Congreso Nacional
de la Sociedad Mexicana
de Ciencias Fisiológicas

La Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C.

Otorga la siguiente

CONSTANCIA

a

**Osorio Pérez TG, Pérez-Sánchez E, Corona-Pérez A, Lucio RA, Rodríguez-Antolín J,
Nicolás-Toledo L**

Por presentar el cartel titulado

**EL HIPERALDOSTERONISMO INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO CAUSA REDUCCIÓN DE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
RATA MACHO JÓVEN**

Tlaxcala, Tlaxcala, 6 de septiembre de 2024


Dra. Margarita Martínez Gómez
Presidenta

13. ANEXOS

Anexo 1. Soluciones empleadas y su tiempo de aplicación para la deshidratación de tejido testicular.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE APLICACIÓN
<i>ETANOLAL 50%</i>	20 min
<i>ETANOLAL 60%</i>	20 min
<i>ETANOLAL 70%</i>	30 min
<i>ETANOLAL 80%</i>	30 min
<i>ETANOLAL 96%</i>	30 min
<i>ETANOLAL 100%</i>	30 min
<i>ALCOHOL-XILOL</i>	30 min
<i>XILOL 1</i>	30 min
<i>XILOL 2</i>	30 min
<i>PARAPLUST I</i>	12 h
<i>PARAPLUST II</i>	13 h
<i>PARAPLUST III</i>	18 h

Anexo 2. Soluciones empleadas y su tiempo de aplicación para tinción de hematoxilina-eosina.

SOLUCIÓN		TIEMPO DE APLICACIÓN
DESPARAFINAR	Xilol 1	5 min
	Xilol 2	5 min
	Etanol:Xilol	5 min
HIDRATACIÓN	Etanol 100%	5 min
	Etanol 100%	5 min
	Etanol 96%	3 min
	Etanol 80%	3 min
	Etanol 60%	3 min
	Agua destilada	3 min

	Hematoxilina de Harris	11 min
	Agua corriente	40 s
CONTRASTE	Etanol ácido	40 s
	Agua destilada	40 s
AZULEAMIENTO	Etanol amoniacal	3-4 min
	Agua destilada	40 s
DESHIDRATACIÓN	Etanol al 96%	40 s
	Etanol al 96%	40 s
	Etanol al 100%	30 s
	Etanol al 100%	30 s
	Etanol: Xilol	10 s
	Xilol	10 s
	Xilol	10 s
MONTAJE	Cytoseal TM	

Anexo 3. Prueba de inmunohistoquímica. Reactivos y tiempos de aplicación.

Proceso	Solución	Concentración	Tiempo
<i>Destape de ag</i>	Citrato de sodio	10mM pH6	3 noches
<i>3 lavados</i>	PBS	1X	10 min c/u
<i>Bloqueo de peroxidasa</i>	H ₂ O ₂	3%	30 min
<i>2 lavados</i>	PBS	1X	10 min c/u
<i>1 lavado</i>	PBS Tritón	0.3% en 1X	10 min
<i>Bloqueo inespecífico</i>	NSG	5%	1 hora
<i>Ac Primario</i>	TNF- α	1:500	1 noche
<i>3 lavados</i>	PBS Tritón	0.3% en 1X	10 min c/u

<i>Ac secundario</i>	Anti-conejo de ratón	1:100	2 horas
<i>2 lavados</i>	PBS Tritón	0.3% en 1X	10 min c/u
<i>1 lavado</i>	PBS	1X	10 min
<i>Complejo enzimático</i>	AB	1:200	1 hora
<i>3 lavados</i>	PBS	1X	10 min c/u
<i>Revelar</i>	DAB en H ₂ O ₂	1:200 en 0.3%	