



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

“El estrés más el consumo elevado de sacarosa al destete afecta la concentración de testosterona e histología gonadal en la rata macho”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Yeimy Mar De León Ramírez

Directora

Dra. Leticia Nicolás Toledo



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

“El estrés más el consumo elevado de sacarosa al destete afecta la concentración de testosterona e histología gonadal en la rata macho”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Yeimy Mar De León Ramírez

Directora

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Esta investigación fue realizada bajo la dirección de la Dra. Leticia Nicolás Toledo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por beca CONACYT (331678) y el Apoyo de la Infraestructura al Cuerpo Académico Fisiología del Comportamiento, UATx (225126).



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

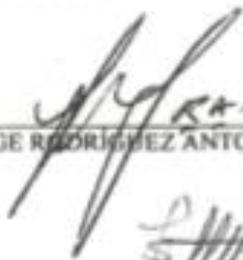
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Yeimy Mar de León Ramírez realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "El estrés más el consumo elevado de sacarosa al destete afecta la concentración de testosterona e histología gonadal en rata macho".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 1 DE 2016



DRA. IDA SOTO RODRÍGUEZ



DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



DRA. LYDIA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ



DRA. MARGARITA CERVANTES RODRÍGUEZ



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por el amplio programa que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto que aquí se presenta.

A la beca CONACYT (331678) y al Apoyo de Infraestructura al Cuerpo Académico Fisiología del Comportamiento, UATx (225126) por haber financiado gran parte de mis estudios de posgrado.

Se contó con la tutoría de la Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez y el Dr. Jorge Rodríguez Antolin, a los cuales les agradezco sus importantes aportes de conocimiento y participación activa en el desarrollo de la presente tesis. De la misma manera, agradezco a la Dra. Estela Cuevas Romero, a la Dra. Margarita Cervantes Rodríguez y a la Dra. Ida Soto Rodríguez por las atenciones prestadas.

Agradecimientos

Agradezco de manera muy importante, con gran cariño y admiración a la Dra. Leticia Nicolás Toledo, así como a mi comité tutorial integrado por la Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez y el Dr. Jorge Rodríguez Antolin; por su generosidad al brindarme la oportunidad de hacer uso de su amplia experiencia científica y de su destacable conocimiento, así mismo agradezco su tiempo, paciencia y sobre todo la confianza de permitirme realizar este proyecto en un ámbito laboral de confianza, apoyo y libertad, indispensable para que este proyecto culminará con éxito y que sin duda alguna, es de suma importancia para mi formación académica y personal.

De manera muy especial, agradezco a:

Dios, por permitirme culminar mis sueños de realizar este proyecto, y por hacer partícipes a las personas indicadas en un momento tan especial en mi vida.

A mis padres, Bernardino de León Hernández y a Guadalupe Ramírez Cova, que son los pilares de mi educación, por su apoyo incondicional, su sabios consejos, amor, paciencia, pero sobre todo por nunca permitirme abandonar el barco, a pesar de todos los altibajos que la vida nos pone en el camino.

A mis hermanos, Jessica Eniff de León Ramírez, Fanny Gisel de León Ramírez y Gibran Adan de León Ramírez, porque, sin duda alguna, la vida sin ellos sería más difícil de sobrellevar; así mismo les agradezco su cariño, apoyo, fortaleza y paciencia en mis peores momentos.

A mi tía, Elena Ramírez Cova y a mi abuela, Celerina Cova Martínez, porque siempre han estado incondicionalmente y porque su apoyo ha sido de gran ayuda para culminar mis logros académicos.

Con mucho cariño, a mis compañeras de laboratorio, especialmente a Yadira Díaz Aguila, Cristhian Neftaly Sánchez Solis y Adriana Corona, por su inmensa paciencia y apoyo, además de la disposición de su valioso tiempo y conocimientos que me fueron de gran ayuda durante la realización de este proyecto.

De manera muy especial y sentimental a mis abuelos Concepción Ramírez y Gregorio de León, porque fueron pilares muy importantes en mi vida con los que me hubiera gustado compartir este logro, y que aunque hoy ya no están conmigo, siempre les estar eternamente agradecida.

RESUMEN

Estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas. En particular, las evidencias señalan que las bebidas con aporte energético incrementan el riesgo de padecer obesidad, diabetes y síndrome metabólico. En pacientes con sobrepeso u obesidad han encontrado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad. Se ha mostrado que la concentración de testosterona disminuye, mientras que las concentraciones de estrona y estradiol son mayores que las observadas en pacientes no obesos. Por otro lado, la obesidad es caracterizada por un proceso inflamatorio con un aumento de estrés oxidativo, el cual puede dañar estructuras celulares, como por ejemplo, el aumento de estrés oxidativo testicular conduce a un aumento en la apoptosis de células germinales y posterior hipo-espermatogénesis. Estas alteraciones, aunado a la presencia de estresores crónicos antes y después del nacimiento, se han relacionado con cambios en el metabolismo. Los individuos pueden mostrar una preferencia por los alimentos ricos en azúcares y grasas, contribuyendo al exceso de calorías. Tanto en humanos como en animales, el estrés tiene efectos adversos alterando la homeostasis de energía resultando sobrepeso y obesidad. En humanos, los retos psicosociales y socioeconómicos activan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal causando hipersecreción de cortisol, que se relaciona con el aumento de grasa visceral, resistencia a la insulina, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares, hipertensión, osteoporosis y depresión. El estrés crónico aumenta la concentración de corticosterona e induce apoptosis en las células de Leydig en ratas y disminuye la concentración de testosterona. Sin embargo, no ha sido evaluado el efecto del estrés y una dieta alta en sacarosa sobre los niveles de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas infantiles. Para ello, utilizamos ratas machos wistar de 21 días de edad (n=8/grupo): ratas que consumen agua simple (C), agua simple + estrés (E), agua azucarada (sacarosa al 30%; A30) y agua azucarada + estrés (A30/E). Los animales fueron sometidos a estrés crónico mediante restricción de movimiento durante 1 hora diaria, 5 veces a la semana. Tanto el estrés como el agua azucarada se administró por cuatro semanas. Al sacrificio, los testículos fueron extraídos para su análisis y la determinación de triglicéridos por Folch y estrés oxidativo por TBARS. La corticosterona, leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y Newman-Keuls como análisis post hoc. La dieta

alta en sacarosa incrementó el peso testicular y los niveles de leptina sérica y se asoció al aumento del diámetro del lumen con una disminución del epitelio germinativo, sin afectar, los niveles de testosterona sanguínea ni los niveles de triglicéridos gonadales. Por otro lado, el estrés crónico por restricción de movimiento induce estrés oxidativo testicular. En conclusión se sugiere que la presencia de los dos estímulos por un largo periodo puede exacerbar un daño que afecte la fertilidad. Es relevante para nosotros mostrar que el consumo de sacarosa afecta la organización histológica del testículo a pesar de que los niveles de testosterona y de triglicéridos no fueron afectados. Probablemente estas modificaciones histológicas son relevantes para la maduración espermatogénica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Generalidades del testículo.....	13
1.1.1 Espermatogénesis	14
1.1.2 Desarrollo Embrionario y fetal del testículo	17
1.1.3 Patologías del testículo	27
1.2 Influencia de la dieta alta en carbohidratos en el desarrollo de obesidad.....	29
1.2.1 Obesidad e infertilidad.....	29
1.3 Influencia del estrés en el desarrollo de obesidad.....	32
1.3.1 Estrés e infertilidad	33
2. ANTECEDENTES	35
2.1 Obesidad, libido e infertilidad masculina.....	35
2.2 Estrés, libido e infertilidad masculina	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	43
4. HIPÓTESIS.....	44
5. OBJETIVO GENERAL.....	44
6. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	44
7. METODOLOGÍA.....	45
7.1 Animales.....	45
7.2 Grupos experimentales	45
7.3 Protocolo de la dieta	46
7.4 Inducción de estrés	46
7.5 Obtención de muestra sanguínea y gónadas	46
7.6 Determinación de hormonas (corticosterona, testosterona y leptina).....	47
7.7 Análisis histológico de las gónadas	47

7.8 Determinación de triglicéridos gonadales	48
7.9 Determinación de estrés oxidativo	49
7.10 Análisis estadístico	50
8. RESULTADOS	51
8.1 Ganancia de peso y variables dietéticas	51
8.2 Índice de adiposidad	52
8.3 Peso testicular	53
8.4 Características cualitativas testiculares	54
8.5 Cuantificación histológica testicular	55
8.6 Hormonas.....	56
8.7 Triglicéridos	57
8.8 Estrés oxidativo	58
9. DISCUSIÓN.....	59
10. CONCLUSIÓN.....	63
11. GLOSARIO:.....	64
11. REFERENCIAS.....	66
12. PUBLICACIONES.....	80

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del testículo

Los testículos son glándulas pares ovales ubicadas en el escroto, de 5cm de largo y 2.5cm de diámetro en humanos adultos, cada testículo tiene un peso de 10-15g. Los testículos se desarrollan cerca de los riñones, en la porción posterior del abdomen y habitualmente descienden hacia el escroto a través de los conductos inguinales durante el séptimo mes de desarrollo fetal (Eccles y cols. 1902).

Los testículos están cubiertos por una serosa llamada túnica albugínea, una cápsula fibrosa blanca compuesta por tejido conectivo denso irregular que se extiende hacia el interior, formando trabéculas que dividen al testículo en una serie de compartimentos internos llamados lóbulos. Cada lóbulo contiene de uno a tres túbulos muy enrollados llamados túbulos seminíferos donde se producen los espermatozoides.

Los túbulos seminíferos contienen dos tipos de células, las células espermotogénicas que producen espermatozoides y las células de Sertoli, única célula somática presente en el interior de los túbulos seminíferos que se encarga de varios procesos en la espermatogénesis, ésta comprende la diferenciación desde las espermatogonias hasta la formación de espermatozoides (Eccles y cols. 1902).

Las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hacia la luz del túbulo seminífero y forman uniones en forma de valla llamada barrera hematotesticular. Las células de Sertoli llevan a cabo un actividad hormonal que determina las condiciones internas del túbulo seminífero y son las que sustentan y protegen a las células espermotogénicas en desarrollo de diversas maneras ya que nutren a los espermátocitos, a las espermátides y a los espermatozoides, fagocitan el citoplasma sobrante que se genera durante el desarrollo y controlan los movimientos de las células espermotogénicas y la liberación de espermatozoides hacia la luz del túbulo seminífero. También producen líquido para el transporte de espermatozoides, secretan la

hormona inhibina y median lo efectos de la testosterona y la hormona folículo estimulante (FSH) (Rey 2001).

Las células de Sertoli se comportan como células puente entre el espacio intertubular y la luz del túbulo seminífero y son el tipo celular predominante en el epitelio seminífero hasta la pubertad. Las células de Sertoli responden a la estimulación de la FSH. Dicha hormona regula la síntesis y secreción de la proteína transportadora de andrógenos que es una proteína secretora con una elevada afinidad por los andrógenos, testosterona y dihidrotestosterona. Además secretan inhibina y las subunidades de activina (subunidades α y β). La inhibina (heterodímero $\alpha\beta$) ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y FSH en el hipotálamo y adenohipófisis. La activina (homodímero $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$) ejerce retroalimentación positiva sobre la liberación de FSH (Rey 2001).

En el intersticio que separa a los dos túbulos seminíferos adyacentes hay grupos de células llamadas células de Leydig, éstas son células ovoides o irregulares con núcleo denso esférico y citoplasmas finamente granular y vacuolado. Las células de Leydig contienen gotas de lípidos, mitocondrias con crestas tubulares características y un retículo endoplásmico liso bien desarrollado (Rey 2001).

Tras la pubertad, las células de Leydig son estimuladas por la hormona luteinizante (LH) por un mecanismo mediado por adenosina monofosfato cíclica (AMPC), entonces las células de Leydig producen testosterona, que puede convertir en dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa. Aproximadamente un 95% de la testosterona se encuentra en el suero ligada a la globulina transportadora de hormonas sexuales, otras proteínas se sintetizan por las células de Leydig, mientras que el resto se elabora en la corteza suprarrenal.

1.1.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un largo proceso de desarrollo celular del epitelio seminífero, por el que las células madre, llamadas espermatogonias, se convierten en espermatozoides. Las diferentes fases que lo componen son: Fase I, las espermatogonias se someten a divisiones mitóticas, dando lugar a los espermatoцитos primarios (I gonocitos), garantizando al mismo tiempo su número constante a través de la renovación. En la segunda fase, el espermatoцитo sufre divisiones

ameioticas dando lugar a las espermátides haploides. La tercera y última fase, la espermiogénesis, es donde las espermátidas sufren transformaciones importantes y dan lugar a los espermatozoides (Clermont, 1972; Orsi y Ferreira, 1978).

Los espermatocitos primarios son producto de la división mitótica de la última generación de espermatogonias (B) (Ortavant y cols. 1977). Los espermatocitos primarios que aparecen en la etapa preleptotena o de "reposo" (Leblond y Clermont), caracterizado por la presencia de cromatina densa nuclear. La etapa leptotena, marca el principio de la profase meiótica (Courot et al.), se caracteriza por una dispersión inicial de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear, con una fuerte compactación posterior de los filamentos de cromatina. Dicha cromatina se vuelve condensada dentro del núcleo (Courot y cols. 1977; Orsi y Ferreira). En la etapa de cigotena, los cromosomas homólogos se emparejan y engrosan (Courot et al.); por lo tanto, el material de la cromatina se hace más evidente, con una configuración que se describe como una "roseta" de cromosomas homólogos (Ortavant y cols. 1977). A continuación, en la etapa de paquitenos, cada cromosoma se divide longitudinalmente en dos cromátidas, por tanto los cromosomas engrosan aún más (Ortavant y cols. 1977).

La espermatogénesis es un proceso metabólicamente activo que depende de la estricta cooperación metabólica entre diferentes tipos de células testiculares. El control endocrino de la espermatogénesis es severamente alterado por la diabetes mellitus, esto está directamente relacionado con el metabolismo de la glucosa que es una característica única de las células del testículo. En el testículo, el metabolismo de la glucosa es un evento primordial (Fig. 1), debido a que la espermatogénesis depende en primera instancia del metabolismo de la glucosa y después

del transporte de glucosa a través de la sangre de las células germinales y otros intermediarios metabólicos, altamente controlados debido a la barrera testicular sanguínea (Alves y cols. 2013).

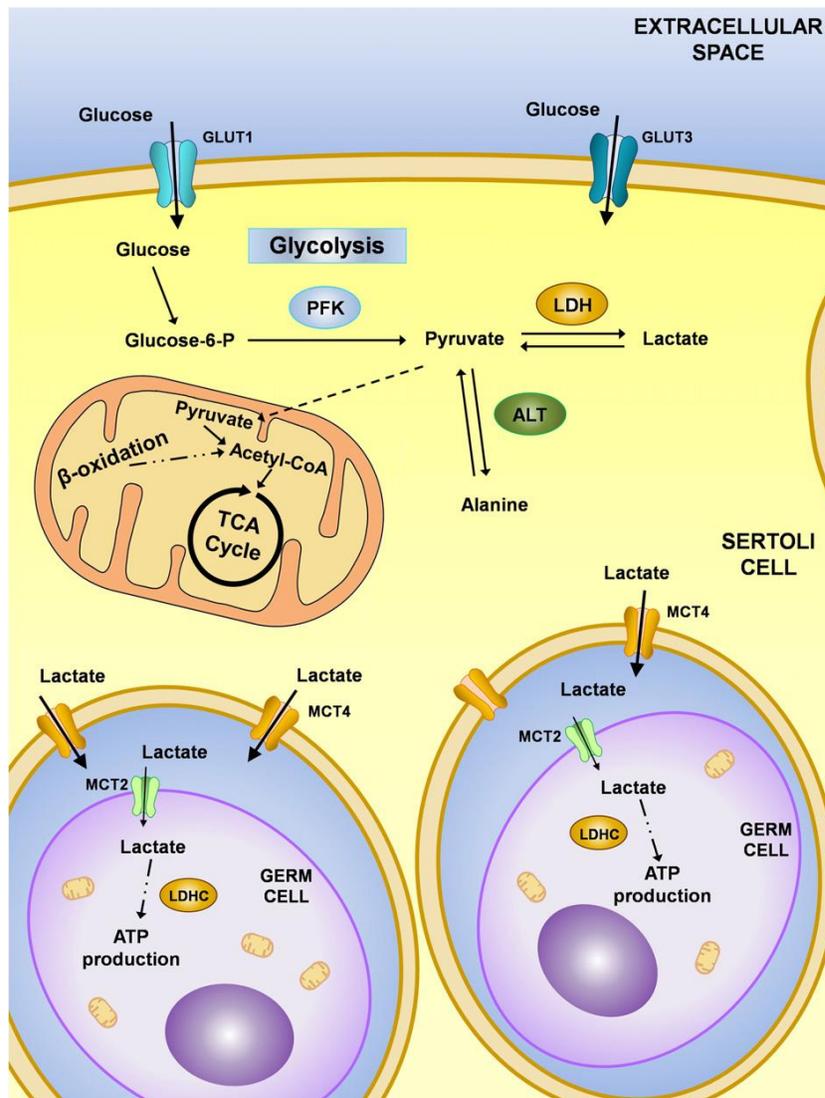


Figura de la metabólica de células de células

1. Ilustración cooperación entre las Sertoli y las germinales. La

glucosa del fluido intersticial entra a las células de Sertoli a través de transportadores de glucosa, principalmente GLUT1 y GLUT3, y es convertida en glucosa-6-fosfato que es entonces convertida en piruvato por la fosfofructoquinasa (PFK). El piruvato puede: a) Ser transportada al interior de la mitocondria para formar acetyl-CoA; b) ser convertida a lactato por la lactato deshidrogenasa (LHD); o c) convertirse en alanina por la alaninoaminotransferasa (ALT). El lactato producido por las células de Sertoli es transportado por los MCT, para producir ATP (Alves y cols. 2013).

1.1.2 Desarrollo Embrionario y fetal del testículo

En la rata macho han sido reportado de 5 a 6 periodos del desarrollo testicular, indicados en días postnatales (DPN), referenciados con base en las características microscópicas. Estas etapas incluyen los periodos neonatales (0-7 DPN), infantil (8-20 DPN), juvenil (21-32 DPN), peri- puberal (33-55 DPN), y puberal tardío (56-70 DPN) (Ojeda y Skinner 2006). Recientemente se ha subdividido el periodo infantil en la etapa temprana de la infancia (8-14 DPN) y la infancia tardía (15-20 DPN) en la rata. Estos periodos se correlacionan con etapas de desarrollo en humanos (Barrow y cols. 2011). La comparación de edades entre ratas y humanos se aprecia en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla de comparación de las etapas de desarrollo en ratas y humanos		
Nombre de la etapa en ratas/humanos	RATAS	HUMANOS
Neonatal/Recién nacido	0 – 7 DPN	0 – 28 días
Infantil/Infante	8 – 20 DPN	1 – 23 meses
Juvenil/Niño	21 – 32 DPN	2 – 12 años
Peri-puberal/Adolescente	33 – 55 DPN	12 – 16 años
Pubertad tardía/Adolescente	56 – 70 DPN	

Tabla 1. - Comparación de la edad de etapas de desarrollo en ratas y humanos. DPN= Días posnatales (a. Ojeda y cols. 1980; b. Barrow y cols. 2011).

Período neonatal: nacimiento al 7 DPN. El período neonatal es el tiempo de transición (1) de los gonocitos¹ fetales para activar la espermatogonia mitótica, (2) un promedio alto de mitosis y maduración de las células de Sertoli y (3) la regresión de las células de Leydig fetales y la sustitución por el progenitor de las células Leydig (Huckins y Clermont 1968). En el día 3 DPN, los testículos están formados por túbulos rodeados por células de Sertoli mitóticamente activas y gonocitos (Imagen A1). Las células de Sertoli, que tienen un distintivo núcleo ovalado o alargado, se sitúan a lo largo de la base de la membrana. Los numerosos gonocitos, o células

1 Ver glosario.

fetales germinales, son mitóticamente inactivos y presentan tantas células redondas con núcleos que contienen cromatina dispersa y un nucléolo prominente disperso (Rossi y Dolci 2013). El núcleo de estos gonocitos está localizado en el centro de los túbulos. Las células de Leydig fetales regresivas son mitóticamente inactivas, así que la actividad mitótica en la población de las células de Leydig es rara. Cualquier actividad mitótica durante ésta etapa sería debido al desarrollo del progenitor de las células Leydig desde las células madres del mesénquima (Sharpe y cols. 2003). Además de la actividad mitótica, las células de Leydig fetales no pueden ser diferenciadas histológicamente del progenitor de las células Leydig. Así como el período neonatal progresa, la actividad mitótica mengua y se vuelve menos evidente en la población de las células espermatogónicas, aunque el ritmo mitótico permanece alto en la población de células Sertoli.

Período de infancia temprana: 8 al 14 DPN: Durante el periodo infantil temprano, la característica predominante de los túbulos es la rápida expansión de las células de Sertoli y espermatogonias (del tipo A, intermedias, y tipo B, espermatogonias), con la proliferación del progenitor de las células Leydig en el intersticio (Gaytan y cols. 1986). Esta proliferación causa una apariencia pseudoestratificada confusa en el epitelio tubular (Imagen A2). La diferenciación de las células Sertoli y las espermatogonias está basada en las características del núcleo. Las células de Sertoli son caracterizadas por las células de tamaño medio que poseen un núcleo elongado con cromatina dispersa y un prominente nucléolo (Desjardins 1978). Las espermatogonias Tipo A tiene un núcleo redondo y alargado finamente punteado con una cromatina dispersa y un prominente nucléolo. La espermatogonias tipo B tiene un pequeño y redondo núcleo con borde periférico de cromatina condensada y con un punteado grueso. La actividad mitótica es pronunciada en las espermatogonias, la célula Sertoli, y la población de las células progenitoras de Leydig. Los gonocitos fetales, son caracterizados por un núcleo redondo grande y ubicación central dentro de los túbulos, que progresivamente se dispersan y dejan de tener dicha apariencia alrededor del día 10 DPN (Ketelslegers y cols. 1978).

Periodo infantil tardío: 15 al 20 DPN: El período infantil tardío es el tiempo cuando (1) la densidad máxima de las células en cada túbulo ocurre, (2) las células de Sertoli cesan de

dividirse, (3) los túbulos comienzan a segregar dentro de las etapas, y (4) el desarrollo del espermatozoido ocurre (comienza la meiosis) (Berndtson y Thompson, 1990).

En el día 15 DPN, las espermatogonias y el progenitor de las células Leydig son aún mitóticamente activas y las espermatogonias alcanzan su mayor densidad formando una capa gruesa pseudo-estratificada con las células de Sertoli (Orth 1982; Berndtson y Thompson, 1990). El promedio mitótico en la población de las células espermatogónicas disminuye comparada con aquellas del periodo de la infancia temprana, y las espermatogonias apoptóticas están presentes en el centro de los túbulos (Imagen A3).

Desde el día 15 al 18 DPN, las células de Sertoli paran de dividirse y sobreviene el desarrollo de espermatozoidos. Espermatozoidos preleptoténicos², leptoténicos³, y cigoténicos⁴ se hacen evidentes. Los espermatozoidos preleptoténicos son identificados por su ubicación basal en el túbulo y son ampliamente dispersos con una cromatina toscamente agrupada (Cheng y Mruk 2012). Los espermatozoidos leptoténicos y cigoténicos son reconocidos por su localización alrededor del lumen, cromatina sólidamente condensada, citoplasma evidente y bordes distintivos en las células. La separación entre las etapas de los túbulos se vuelve aparente a la par de que algunos túbulos son poblados por espermatozoidos mientras que otros túbulos son poblados por numerosos espermatozoidos leptoténicos y cigoténicos (Ojeda y cols. 1980; Picut y cols. 2014). Tan pronto como el desarrollo de los espermatozoidos sobreviene, la actividad mitótica se vuelve más rara en la población de células espermatogónicas (Imagen A4).

Para el día 18 DPN, se forma la lumina tubular, se evidencia por un pequeño espacio claro dentro de los túbulos, y espermatozoidos paquítenos aparecen. Los espermatozoidos paquítenos son caracterizados por células localizadas en la lumina con un núcleo largo y redondo, cromatina nuclear que es menos densamente empaquetada más que los espermatozoidos leptoténicos y cigoténicos, citoplasma eosinofílico y bordes celulares inconfundibles (Chemes y cols. 1976). En este punto, hay una transición distintiva de espermatogonias y células de Sertoli en una doble capa en forma de roseta. Estos túbulos son caracterizados por una capa externa de

2,3,4 Ver glosario

espermatogonias (tipo A, intermedias, y tipo B) y una capa interna de células de Sertoli, núcleo oblongado y cromatina finamente punteada (Imagen A5).

El intersticio contiene el progenitor de las células Leydig con una pequeña población de células de Leydig inmaduras que representan la siguiente fase de desarrollo de las células de Leydig. No existe una clara diferencia morfológica entre el progenitor de las células Leydig o células de Leydig inmaduras. La actividad mitótica continúa dentro de la población de células de Leydig (Lee y cols. 1975).

Periodo Juvenil: 21 al 32 DPN. El periodo juvenil está caracterizado por (1) mantenimiento de la primera producción de espermatogénesis a espermátidas redondeadas y (2) un incremento dramático en el diámetro tubular. La presencia de numerosos espermatocitos paquitenos grandes y la formación de espermatocitos secundarios (en el día 26 DPN) son característicos de ésta etapa. Hay un incremento marcado en el diámetro de los túbulos con el retiro de las células de Sertoli y espermatogonias en una sola capa a lo largo de la membrana (Imagen A6) (Lee y cols. 1975). La apoptosis de los espermatocitos paquitenos está presente dentro de los túbulos dispersados (Imagen A7).

El período juvenil es el momento en el que hay una expansión prominente del diámetro tubular, hay una producción significativa de testosterona por las células de Leydig inmaduras, aumentan los niveles de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona leutinizante), y la formación de espermátidas redondas. Simultáneamente con la expansión tubular, hay una pérdida de la apariencia de doble capa de la roseta inmadura, ya que las células de Sertoli y las espermatogonias retroceden a una sola capa de células en la membrana basal. Los niveles séricos de FSH, habiendo alcanzado su primer pico en el día 18, alcanzando su máximo en el periodo juvenil el día 26 (Lee y cols. 1975). El aumento constante en los niveles de FSH puede explicarse, en parte, debido a la disminución de los niveles de inhibina de la población estable de células de Sertoli después del día 20.

Los niveles de LH siguen un patrón similar al de los niveles de FSH, a saber hay un aumento constante en los niveles de LH que ocurre en días posteriores que en los niveles de FSH. Los niveles de LH llegan a su punto más bajo en el día 25 y aumentan a partir de entonces. El nivel

más bajo de LH se debe a un aumento de la testosterona producida a partir de las células de Leydig inmaduras, que tiene una retroalimentación negativa sobre la producción de LH. Mientras que sólo una pequeña cantidad de testosterona se produce a partir de las células de Leydig inmaduras, sólo se necesita una pequeña cantidad de testosterona para apagar la producción de LH durante el periodo juvenil temprano, porque el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas inmaduro tiene un mecanismo de retroalimentación negativa de la testosterona-LH sensible. Sin embargo, después del día 25 (al final del periodo juvenil), el eje hipotálamo-hipófisis-gónada madura lo que reduce la sensibilidad a la retroalimentación negativa; y los niveles de LH comienzan a aumentar en paralelo con el aumento de los niveles de testosterona. La relación paralela entre LH y testosterona es una característica distintiva de la actividad madura del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Varias explicaciones representan la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y su sensibilidad reducida a la retroalimentación negativa de la testosterona en la segunda mitad del periodo juvenil. La PRL (prolactina) es uno de los factores que reducen la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Negro-Vilar y cols. 1973; Dohler y Wuttke 1975; Becu-Villalobos y cols. 1992; Stoker y cols. 1999). Una mayor producción de PRL durante la etapa juvenil tiene la ventaja añadida de promover los receptores de LH en las células de Leydig, haciendo que las células de Leydig sean más receptivas a los niveles bajos de LH (McNeilly y cols. 1979), y que permite una mayor producción de testosterona por estas células. La reducción de la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas junto con aumento de la sensibilidad en las células de Leydig a un nivel de bajo de LH, explica cómo los niveles de LH y los niveles de testosterona puede comenzar tanto aumentar o a bajar en paralelo (en lugar de en direcciones opuestas). La pérdida de los efectos inhibidores de ácido gamma aminobutírico (GABA) durante este tiempo también permite niveles más elevados de gonadotropinas. GABA es normalmente un neurotransmisor inhibitorio que es responsable de los niveles de gonadotropina durante los períodos de infancia y adolescencia temprana. Debido a que se madura el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, hay una interacción compleja de neurotransmisores excitatorios (noradrenalina, neuropéptido Y -NPY-, y aminoácidos) e inhibitorios (GABA y los opioides endógenos) que dan lugar a la desinhibición general de los efectos de GABA a nivel del hipotálamo. Esta desinhibición de acción central conduce a mayores niveles de gonadotropinas cuando el animal llega a la pubertad.

Independientemente de la razón de los niveles elevados de gonadotropinas durante la segunda mitad del período juvenil, mayores niveles de LH y FSH son críticos para la maduración final de las células de Leydig. Al comienzo del período juvenil, las células de Leydig son o progenitoras (que producen andrógenos reducido por enzimas) o las células de Leydig inmaduras (que producen andrógenos y testosterona reducidos por enzimas). Hacia el final del periodo juvenil, la maduración final de las células de Leydig se produce y prevalece la producción de testosterona. Es importante en este proceso final de maduración final el aumento de los niveles de FSH en el día 26 y el aumento de los niveles de LH. Dicho aumento de los niveles de FSH aumentan la unión de FSH a las células de Sertoli, que desencadena la producción del factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1) por las células de Sertoli. La FSH, IGF-1, y la LH trabajan en conjunto para facilitar la maduración final de las células de Leydig (Swerdloff y Walsh 1973; Chen y cols. 1976;).

Período pre-puberal: 32 al 55 DPN: El periodo pre-puberal es el tiempo que abarca el comienzo de la pubertad. El comienzo de la pubertad (o la mitad del periodo pre-puberal) esta generalmente considerada por ser el momento cuando la separación del prepucio ocurre, que generalmente ocurre entre los días 40 y 50 DPN en la rata, alrededor del día 43 (Stoker y cols. 2000). Esta aparición de la pubertad también corresponde al tiempo de lanzamiento del espermatozoide maduro en la cabeza del epidídimo (Korenbrodt, y cols. 1977). Después del período pre-puberal, el proceso puberal continua por aproximadamente dos semanas después de este período hasta que el tamaño del testículo adulto y cantidad de espermatozoides son alcanzados, generalmente alrededor del día 70 DPN.

Durante el período pre-puberal, hay espermatogénesis activa, mientras el diámetro tubular continua expandiéndose y la transición de espermátides está por finalizar, así como la formación total del túbulo seminífero está por llegar a su etapa final (Imagen A8). Cuando las espermátides se encuentran en el último paso de su maduración el cual surge en el día 46 DPN, en el cual todas las etapas de los túbulos deberían estar presentes. Sin embargo, la apariencia de las diferentes etapas de los túbulos podría variar de los animales maduros debido a las bajas cantidades de células, la baja densidad de espermátidas alargándose, y diámetros tubulares más

pequeños cuando se comparan con los testículos de un adulto (Ketelslegers y cols. 1978; Lee y cols. 1975).

El aumento de los niveles de producción de testosterona a partir del incremento del número de células de Leydig madura ahora es paralelo a un incremento de los niveles de LH ya que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas sigue madurando (Lee y cols. 1975; Ketelslegers y cols. 1978). Los niveles de DHT disminuyen después del día 40. Los niveles de PRL siguen siendo relativamente altos hasta el día 50 (Stoker y cols. 1999) y aumentan la sensibilidad de las células de Leydig a LH (por el aumento de los receptores de LH). La PRL también promueve la producción de testosterona mediante la inhibición de la actividad de la 5 α - reductasa en las células de Leydig (Witorsch y Kitay 1972; Martini y cols. 1978). Una asociación entre niveles elevados de PRL, el aumento de los niveles de testosterona, y la disminución de los niveles de DHT es apoyada por la observación de que los niveles de PRL son altos cuando la producción de DHT a partir de células de Leydig disminuye drásticamente al día 40 y aumentan los niveles de testosterona a partir de este día.

Los testículos son tejidos con una demanda energética elevada, con un alto flujo glucolítico. De hecho el metabolismo de la glucosa es crucial para el desarrollo normal de la espermatogénesis, pero estos órganos no son capaces de acumular este metabolito (Mallidis y cols. 2009) porque la glucosa se oxida rápidamente en este tejido (Setchell y Hinks, 1967).

En las células de Sertoli, es el componente somático clave del epitelio seminífero (Rato et al., 2010), son esenciales en el control metabólico de la espermatogénesis principalmente en el metabolismo de carbohidratos (Alves y cols. 2012b; Rato y cols. 2012b). Después de entrar la glucosa en las células de Sertoli a través de GLUT1 y GLUT3, la glucosa por la vía glucolítica produce piruvato, en el cual la mayoría de este piruvato se convierte en lactato que funciona como "combustible" para el desarrollo de las células germinales (Boussouar y Benahmed. 2004, Alves y cols. 2012c; Rato y cols. 2012a). Incluso, las células Sertoli adaptan su metabolismo para mantener la producción de lactato. Para ello, dichas células modulan la expresión de las enzimas clave del metabolismo del lactato y de transportadores de metabolismo de la glucosa (Oliveira y cols. 2012).

El aumento de los niveles circulantes de glucosa causa cambios metabólicos generales, que pueden ser reflejadas a nivel testicular. Este aumento de los niveles de glucemia pueden conducir a la producción de radicales libres de oxígeno, que a su vez podría causar daños en los tejidos y la alteración de la función reproductiva (Amaral y cols. 2006). De hecho, el aumento de la disponibilidad de glucosa puede conducir a un aumento de la actividad glucolítica y por lo tanto una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los túbulos seminíferos, ROS se producen continuamente por las células de Sertoli y las células germinales, ello como resultado de su actividad metabólica continua (Fujii y cols. 2003). Diferentes células testiculares muestran diferente susceptibilidad a las ROS (Fujii y cols. 2003). Además, una mayor disponibilidad de la glucosa aumentará la producción de ATP disponible para el esperma. Hay evidencias con respecto a una relación directa entre la disponibilidad y el consumo de glucosa por los espermatozoides (Hoppe 1976).

Período puberal tardío: 56 al 61 DPN: Durante el período puberal tardío, hay un crecimiento continuo de los testículos y las características morfológicas consistentes con la apariencia normal de un testículo adulto. Los diámetros tubulares se incrementan, las fases tubulares pueden ser reconocidas por sus características asociaciones celulares, y hay un incremento de números fácilmente perceptibles y la densidad de espermátidas elongándose (Martini y cols. 1978; Witorsch y Kitay 1972).

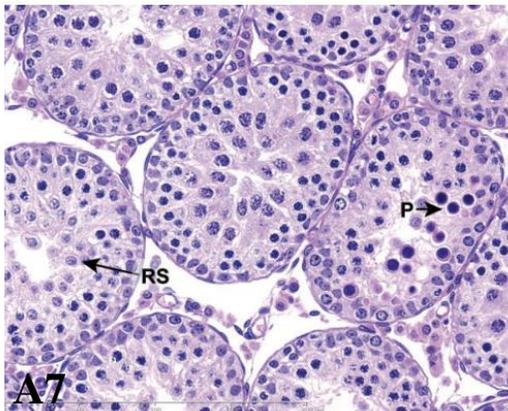
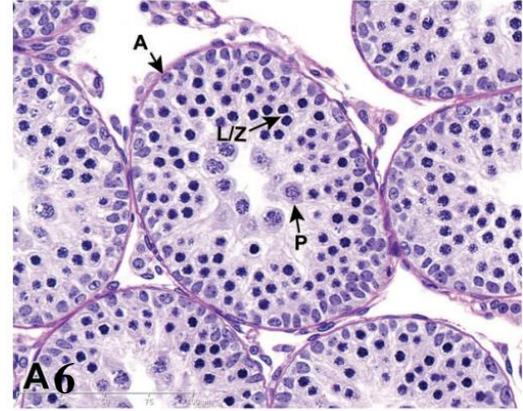
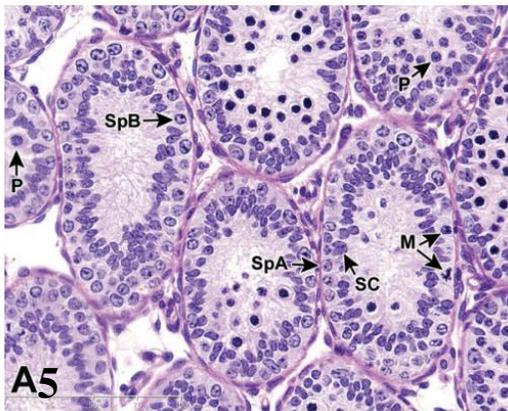
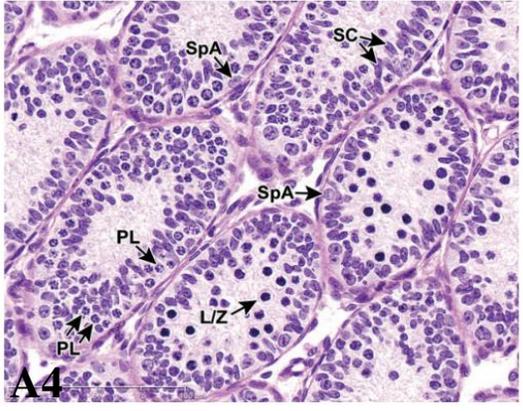
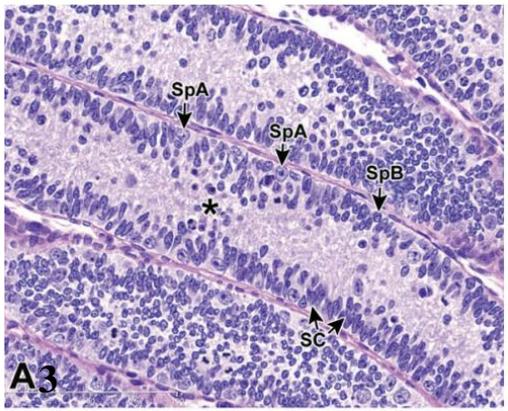
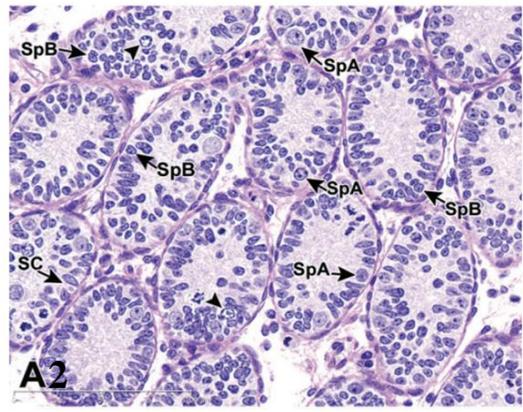
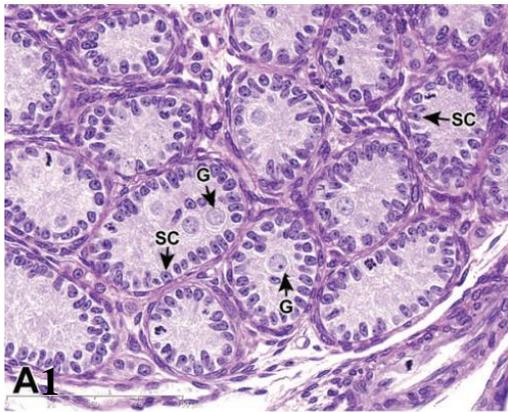


Imagen A1. - Testículos, 3 DPN (neonatal). Túbulos revestidos por numerosas células de Sertoli en mitosis (SC) alrededor de la membrana basal. Los gonocitos (G) son numerosos, mitóticamente inactivos, y tienen un núcleo grande y redondo colocado en posición central dentro de los túbulos.

Imagen A2. - Testículos, 9 DPN (a principios de la infancia). Los túbulos están revestidos por numerosas células de Sertoli (SC) y espermatogonias, formando una capa pseudoestratificada. Las células de Sertoli son reconocidos como de tamaño medio que tienen un núcleo alargado, con cromatina dispersa y un nucléolo prominente. Espermatogonias tipo A (SpA) tienen un núcleo ovalado grande con cromatina finamente punteada, y las espermatogonias tipo B (SPB) tienen un pequeño núcleo redondo con un borde periférico de la cromatina condensada y punteado por supuesto. Se observa actividad mitótica en las espermatogonias, células de Leydig progenitoras y en las poblaciones de células de Sertoli, así como muchas células en la profase (punta de flecha).

Imagen A3 - Testículos, 15 DPN (infancia tardía). Se observa una densidad máxima de espermatogonias formando una capa pseudoestratificada. La apoptosis de las espermatogonias, debido a la sobrepoblación, está presente en un grado leve en el lumen tubular (asterisco). SpA= Espermatogonias A; SpB= espermatogonias B; SC= células de Sertoli.

Imagen A4.- Testículos, 16 DPN (infancia tardía). Se produce el desarrollo espermatocito y esto se correlaciona con el desarrollo de la barrera hemato-testicular (CEL). Se nota la formación de espermatocitos leptotene y cigotenos en la lumina (L/Z) en algunos túbulos. Otros túbulos están pobladas por espermatocitos preleptotenos (PL) que residen fuera de la CEL. Etapas tubulares son reconocibles, con algunos túbulos que contienen leptotene y cigotenos, mientras que otras contienen espermatocitos preleptotenos, como el tipo de células espermatogénica más desarrolladas. El índice mitótico en la población de células espermatogónicas se reduce, y mitosis en las células de Sertoli ha cesado. SpA= Spermatogonia A; SC= Células de Sertoli.

Imagen A5. - Testículos, 18 DPN (infancia tardía). Las espermatogonias y las células de Sertoli (SC) forman una roseta de doble capa con una fila exterior de espermatogonias tipo A (SpA) y B (SpB) y una fila llena de núcleos de células de Sertoli. Las espermatogonias tipo A finamente han dispersado la cromatina y las Tipo B tiene un borde periférico con cromatina condensada. Los espermatocitos paquitenos (P) aparecerán, y unas pocas espermatogonias con actividad mitótica (M) están todavía presentes.

Imagen A6. - Testículos, 25 DPN (juvenil). El desarrollo de espermatocitos paquitenos continúa, las células de Sertoli y las espermatogonias se retiran a una sola capa basilar a medida que el diámetro del túbulo se expande. A= espermatogonia tipo A; L/Z= espermatocitos leptotene/cigotenos; P= espermatocitos paquitenos. Tinción con H-E.

Imagen A7. - Testículos, 27 DPN (juvenil). La apoptosis de los espermatocitos paquitenos está presente (P) en algunos túbulos, y las espermátidas redondas (RS) empiezan a formarse en otros túbulos.

Imagen A8. - Testículos, 46 DPN (peri - puberal). Espermátides en su último proceso presente en la penúltima etapa del túbulo. Tinción con H-E. (Ojeda y cols. 1980; Picut y cols. 2014).

Peso de los testículos

El peso del final del cuerpo y los testículos derecho e izquierdo se incrementan continuamente desde el día 10 DPN hasta el día 61 DPN. En el día 18 DPN hay un aumento muy significativo debido a la formación de espacios luminales en los túbulos seminíferos. Desde el día 53, el peso promedio de los testículos incrementa paulatinamente de 1,262.1 mg y 1,248.6 mg a 1,578.0 mg y 1,600.7 mg para los testículos izquierdo y derecho respectivamente, indicando un crecimiento continuo de los testículos después hasta el día 61 DPN (Ojeda y cols. 1980; Barrow y cols. 2011).

1.1.3 Patologías del testículo

La infertilidad puede ser causada por muchos factores físicos y emocionales, que pueden causar: 1) disminución de la cantidad de espermatozoides, 2) cambios morfológicos en los espermatozoides, 3) afectación en la expulsión de los espermatozoides. Dentro de las principales patologías en edad temprana asociadas a la infertilidad masculina se encuentran:

Anorquia: Es la ausencia de ambos testículos al nacer, el embrión desarrolla órganos sexuales incipientes en las primeras semanas después de que el óvulo es fecundado. Si los testículos incipientes no logran desarrollarse en los varones antes de la octava semana del embarazo, el bebé tendrá genitales femeninos. Si los testículos desaparecen entre la octava y la décima semana, el bebé nacerá con genitales ambiguos. Esto significa que el niño tendrá partes anatómicas tanto de genitales masculinos como de los femeninos. Sin embargo, si los testículos desaparecen entre las semanas 12 y 13, el bebé tendrá genitales masculinos normales (pene y escroto), pero no testículos. Esto se conoce como anorquia congénita o “síndrome de los testículos desaparecidos”.

Hidrocele: Es un saco lleno de líquido ubicado en el escroto. Las hidroceles son comunes en los bebés recién nacidos, durante el desarrollo del bebé en el útero, los testículos descienden desde el abdomen a través de un conducto hasta el escroto. Las hidroceles se presentan cuando este conducto no se cierra. El líquido drena desde el abdomen a través del conducto abierto y queda atrapado en el escroto. Esto hace que el escroto se hinche. La mayoría de los hidroceles desaparecen meses después del nacimiento. Algunas veces, un hidrocele puede ocurrir con una hernia inguinal.

Hipogonadismo: El hipogonadismo se presenta cuando las glándulas sexuales del cuerpo producen pocas o ninguna hormona. Existen dos tipos de causas: primero, denominado causa primaria, esta afectación se puede dar por una mal formación anatómica; segundo, causa central, dicha patología integra el Sistema Nervioso Central (el hipotálamo y la hipófisis), de tal manera que la información a nivel cerebral no es recibida en las gónadas y por consiguiente no es funcional la gónada. Existen trastornos genéticos, los más comunes que causan hipogonadismo primario es el síndrome de Turner (en las mujeres) y el síndrome de Klinefelter (en los hombres).

Y a nivel del Sistema Nervioso Central, existe el hipogonadismo central por el síndrome de Kallaman.

Orquitis: Es la inflamación de uno o ambas gónadas. La orquitis puede ser causada por una infección causada principalmente por bacterias y virus. El virus más común que causa orquitis es el de las paperas. A menudo ocurre en niños después de la pubertad. La orquitis generalmente se desarrolla de 4 a 6 días después del comienzo de las paperas. La orquitis también puede ocurrir junto con infecciones de la próstata o el epidídimo.

Testículo no descendido: Los testículos no descendidos ocurren cuando uno o ambos testículos no logran bajar al escroto antes de nacer. En la mayoría de los casos, los testículos de un niño descienden a partir de los 9 meses de edad. Los testículos no descendidos son bastante comunes en los bebés que nacen prematuros. Los testículos que no descienden de forma natural al escroto se consideran anormales. Un testículo no descendido tiene una mayor probabilidad de presentar cáncer incluso si se baja hasta el escroto con cirugía. El otro testículo también es más propenso a padecer cáncer. Descender el testículo al escroto puede mejorar la producción de espermatozoides e incrementa las probabilidades de una buena fertilidad.

Tumor testicular: Es una inflamación o neoplasia (masa) en uno o en ambos testículos. Un tumor testicular que no duele puede ser un signo de cáncer. La mayoría de los casos de cáncer testicular ocurre en hombres entre 15 y 40 años de edad. También se pueden presentar a edades más tempranas.

Varicocele: Es la hinchazón de las venas dentro del escroto. Estas venas se encuentran a lo largo del cordón que sostiene los testículos de un hombre (cordón espermático). Un varicocele se forma cuando las válvulas dentro de las venas que hay a lo largo del cordón espermático impiden que la sangre circule apropiadamente. La sangre se acumula, lo que lleva a una hinchazón y dilatación de dichas venas. (Esto es similar a las venas varicosas en las piernas). La mayoría de las veces, los varicoceles se desarrollan lentamente. Son más comunes en hombres entre 15 y 25 años de edad y se observan con más frecuencia en el lado izquierdo del escroto. La súbita aparición de un varicocele en un hombre mayor puede ser causada por un tumor renal que puede bloquear el flujo sanguíneo a una vena. El problema es más común en el lado izquierdo que en

el derecho. Sin embargo, en la actualidad se han reportados que existen otros factores ambientales y nutricionales que son asociados a la infertilidad, como la obesidad, diabetes, síndrome metabólico y estrés.

1.2 Influencia de la dieta alta en carbohidratos en el desarrollo de obesidad

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) reportó una prevalencia del 34.4% de sobrepeso y obesidad en niños menores de 5 a 11 años a nivel nacional, mientras que en adolescentes fue del 35%. En particular, las evidencias señalan que las bebidas con aporte energético incrementan el riesgo de padecer obesidad, diabetes y síndrome metabólico y aumentar la prevalencia de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Nseir y cols. 2010). México es uno de los principales consumidores de refrescos y bebidas azucaradas per cápita en el mundo con un consumo promedio de 4 a 5 refrescos al día en niños y adultos, que equivalen a más de 163 litros por persona al año (Rivera y cols. 2008; Barquera y cols. 2008; Euromonitor 2009; Chaloupka y cols. 2011). Estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas. La severidad de la obesidad y sus múltiples complicaciones depende principalmente de la exposición a factores ambientales adversos, teniendo en cuenta que el desarrollo prenatal, la infancia, niñez y adolescencia son periodos críticos caracterizados por aumento en la vulnerabilidad a dichos factores ambientales, así como a las alteraciones metabólicas generadas por el sobrepeso, la obesidad y/o la diabetes (Charmandari y cols. 2003).

1.2.1 Obesidad e infertilidad

La obesidad además de ser un factor de riesgo importante para desarrollar síndrome metabólico, está asociada a la disfunción del entorno hormonal que afecta el sistema reproductivo en mujeres y hombres al presentar infertilidad (Kasturi y cols. 2008). Recientemente se ha publicado que la obesidad disminuye los niveles de testosterona, se ha asociado a la disfunción del hígado, debido a un aumento tanto de la transaminasa glutámico oxalacética (GOT), la transaminasa glutámico piruvato (GPT) y los niveles de triglicéridos, lo que nos lleva a una esteatosis hepática (Hagiuda y cols. 2014); demostrando así la correlación que existe entre la obesidad, la función del hígado y la infertilidad (Hagiuda y cols. 2014). De estos, la infertilidad ha recibido mayor atención,

debido al rápido aumento en la prevalencia de la obesidad (Pasquali y cols. 2007). En las mujeres, la obesidad favorece el inicio precoz e irregularidades en la menstruación, oligo-ovulación o anovulación crónica y la infertilidad en la edad adulta, mientras que en hombres, la obesidad ha sido asociada a una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad, disminuyendo la concentración de testosterona a medida que la obesidad se agrava con un aumento en las concentraciones de estrona y estradiol (Schneider y cols. 1979; Strain y cols. 1982; Zumoff y cols. 1990; Haffner y cols. 1993; Giagulli y cols. 1994; Andrea y cols. 1999; Jensen y cols. 2004; Pauli y cols. 2008; Erdemir y cols. 2012). En los últimos años, algunos estudios han asociado el índice de masa corporal (IMC) con los parámetros reproductivos en los hombres, mostrando que el aumento en el IMC se relaciona con la baja calidad del semen, disminución de la concentración de espermatozoides, así como de la motilidad normal de los espermatozoides. Sin embargo, el impacto que la obesidad pudiera tener sobre las concentraciones de testosterona libre, gonadotropinas y la inhibina B no ha sido establecido (MacDonald y cols. 2010). En apoyo a esto, existe controversia pues otros estudios no muestran ninguno de los aspectos anteriormente mencionados, aun cuando hay concentraciones alteradas de las hormonas sexuales en suero (Fernández y cols. 2011).

Una de las principales complicaciones del aumento del IMC es la diabetes mellitus. Y en la última década se ha visto un aumento en la incidencia de hombres obesos que son con diabetes mellitus tipo 1 o 2 (Giommi y cols. 2004). La gran mayoría de los pacientes con obesidad son diagnosticados antes de los 30 años de edad y actualmente hay un alarmante incremento del número de niños y adolescentes con diabetes tipo 1 y 2 (Alves y cols. 2013; Dabelea y cols. 2014). Aun cuándo se sabe que la diabetes mellitus es la causa de diversas modificaciones que reducen la tasa de fertilidad, el mecanismo por el cuál esto ocurre aún es desconocido y constantemente se encuentra en debate. En recientes estudios se ha propuesto que existe una relación entre los parámetros del semen y el IMC, el mecanismo para esto es muy posible que incluya, de alguna manera, algún tipo de alteración del perfil hormonal reproductivo (Pasquali y cols. 2007; Qin y cols. 2007; Hammoud y cols. 2008). Aunado a esto, el exceso de peso corporal se ha asociado con una reducción de los niveles de testosterona, así como de

gonadotropinas y la capacidad de la globulina como hormona fijadora (Isidori y cols. 1999; Kaufman y Vermeulen. 2005; Aggerholm y cols. 2008).

La espermatogénesis es un proceso metabólicamente activo que depende de la estricta cooperación metabólica entre diferentes tipos de células testiculares. El control endocrino de la espermatogénesis es severamente alterado por la diabetes mellitus, esto está directamente relacionado con el metabolismo de la glucosa que es una característica única de las células del testículo. En el testículo, el metabolismo de la glucosa es un evento primordial (Fig. 10), debido a que la espermatogénesis depende en primera instancia del metabolismo de la glucosa y después del transporte de glucosa a través de la sangre de las células germinales y otros intermediarios metabólicos, altamente controlados debido a la barrera testicular sanguínea (Alves y cols. 2013).

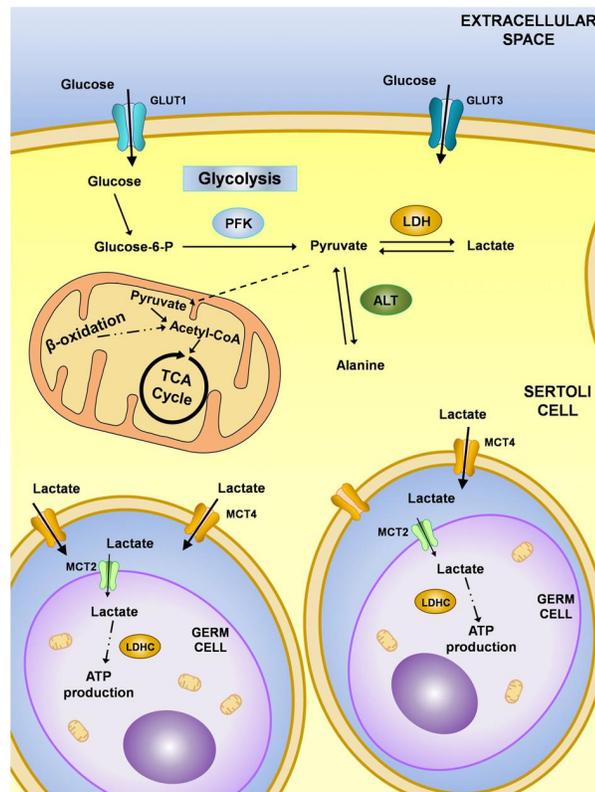


Figura 10. Ilustración de la cooperación metabólica entre las células de Sertoli y las células germinales. La glucosa del fluido intersticial entra a las células de Sertoli a través de transportadores de glucosa, principalmente GLUT1 y GLUT3, y es convertida en glucosa-6-fosfato que es entonces convertida en piruvato por la fosfofructoquinasa (PFK). El piruvato puede: a) ser transportada al interior de la mitocondria para formar acetil-CoA; b) ser convertida a lactato por la lactato deshidrogenasa (LHD); o c) convertirse en alanina por la alanina-aminotransferasa (ALT). El lactato producido por las células de Sertoli es transportado por los MCT, para producir ATP (Alves y cols. 2013).

1.3 Influencia del estrés en el desarrollo de obesidad

En adición al consumo alto de calorías, el estilo de vida moderno que incluye poca actividad física y un aumento de estrés derivado del trabajo y medio ambiente social. En este contexto, existe literatura que sugiere que tanto en el humano como en animales, el estrés tiene efectos adversos alterando la homeostasis de energía resultando sobrepeso y obesidad (Jayo y cols. 1993; Shively y cols. 1998; Bjorntorp 2001). Estudios en humanos indican que retos psicosociales y socioeconómicos activan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) causando hipersecreción de cortisol, que se relaciona con el desarrollo de hipertensión, osteoporosis y depresión (Chrousos y cols. 1998). El aumento de cortisol ha sido también asociado con el aumento de grasa visceral, resistencia a la insulina, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares (Bjorntorp 2001). Además, la expresión de los receptores de glucocorticoides en hígado es incrementada y puede aumentar la actividad de la enzima gluconeogénica fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) resultando resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en edad adulta (Nyirenda y cols. 1998; Ozanne y cols. 2002).

El estrés psicosocial se asocia con el desarrollo de la obesidad (Tamashiro 2011; Isasi et al. 2015). Los individuos pueden mostrar una preferencia por los alimentos más ricos en azúcares y grasas, contribuyendo al exceso de calorías (Torres y Nowson 2007). El estrés excesivo o crónico puede desencadenar o exacerbar muchas enfermedades o trastornos como la ansiedad y depresión que se ha relacionado con la obesidad abdominal, donde los niños y adolescentes en desarrollo son particularmente vulnerables a los efectos del estrés crónico (Guerra y cols. 2000; Pervanidou y Chrousos 2011; Pervanidou y Chrousos 2012). La exposición a eventos estresantes a edades tempranas favorecen la secreción crónica de cortisol en niños, dicha exposición puede afectar la pubertad, la composición corporal, promoviendo el desarrollo de obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2, así como el arreglo histológico testicular (Pervanidou y Chrousos 2012; Vanaelst y cols. 2012). Es importante resaltar que un periodo crítico en el desarrollo de tejidos y órganos también se extiende hasta el periodo postnatal. Por consiguiente, la experiencia nutricional (pobre nutrición o sobrenutrición) en el periodo postnatal puede influir para inducir efectos en la programación metabólica (Srinivasan y Patel 2003). Se ha mostrado que la dieta rica en carbohidratos (fórmula de leche

alta en carbohidratos) en ratas recién nacidas, resulta en una hiperinsulinemia. A nivel molecular, hay un incremento en la biosíntesis de insulina y el RNA mensajero de los genes que codifican la preproinsulina y factores de transcripción tal como el Pdx-1, el cual está involucrado en la regulación de la expresión del gen preproinsulina. A nivel celular, significantes cambios incluyen una reducción en el tamaño de los islotes pancreáticos y un aumento en el número de islotes pequeños. Estas ratas continúan con hiperinsulinemia en la vida adulta (Srinivasan y Patel 2003).

1.3.1 Estrés e infertilidad

El estrés es la respuesta a estresores físicos o psicológicos que provocan una desestabilización de la homeostasis y causan diversos estragos en varios sistemas, entre ellos, la función reproductiva, esta desestabilización es contrarrestada por complejas respuestas fisiológicas y de comportamiento que colectivamente tienen como objetivo restablecer el equilibrio perturbado (Chrousos y cols. 2007). Por otro lado, el estrés crónico es definido como el estado patológico de prolongada amenaza a la homeostasis por un estresor repetitivo o persistente, que de manera progresiva provoca disfunción reproductiva e infertilidad.

En varios estudios se ha mostrado que, la exposición a estresores crónicos de manera constante pueden poner en peligro funciones fisiológicas, como el metabolismo y la reproducción (Charmandari y cols. 2005). Hans Selye, sugirió que la exposición a estresores crónicos incrementa la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y a la par reduce la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, y se observa una relación antagonista entre los glucocorticoides y las hormonas gonadales (Selye 1946; Charmandari y cols. 2005; Chrousos 2007). Es por eso que, el incremento en los glucocorticoides durante el estrés inhibe la estimulación de la GnRH en el hipotálamo, así como la liberación de las gonadotropinas en la hipófisis (Gore y cols. 2006), y la función gonadal, además disminuyen la síntesis de hormonas esteroideas e induce apoptosis celular en las gónadas (Whirledge y Cidlowski 2010). El estrés es considerado uno de los factores que causa infertilidad en hombres (Sheiner y cols. 2003), al reducir el conteo espermático (Collodel y cols. 2008; Lenzi y cols. 2003), la motilidad (Fukuda y cols. 1996), y probablemente causa defectos morfológicos en el espermatozoide (Auger y cols.

2001) y con ello, la disminución de la fertilidad en hombres, principalmente en aquellos con baja concentración espermática (Hjollund y cols. 2004). En humanos, la exposición prolongada a estrés, incrementa los niveles de cortisol en plasma con una constante disminución de los niveles de testosterona en plasma (Remes y cols. 1985).

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad, libido e infertilidad masculina

En los últimos años, algunos estudios han asociado el índice de masa corporal (IMC) con los parámetros reproductivos en los hombres, mostrando que el aumento en el IMC se relaciona con la baja calidad del semen, disminución de la concentración de espermatozoides, así como de la motilidad normal de los espermatozoides. Sin embargo, el impacto que la obesidad pudiera tener sobre las concentraciones de testosterona libre, gonadotropinas y la inhibina B no ha sido establecido (MacDonald y cols. 2010). En apoyo a esto, existe controversia pues otros estudios no muestran ninguno de los aspectos anteriormente mencionados, aun cuando hay concentraciones alteradas de las hormonas sexuales en suero (Fernández y cols. 2011).

Una de las principales complicaciones del aumento del IMC es la diabetes mellitus. Y en la última década se ha visto un aumento en la incidencia de hombres obesos que son con diabetes mellitus tipo 1 o 2 (Giommi y cols. 2004). La gran mayoría de los pacientes con obesidad son diagnosticados antes de los 30 años de edad y actualmente hay un alarmante incremento del número de niños y adolescentes con diabetes tipo 1 y 2 (Alves y cols. 2013; Dabelea y cols. 2014). Aun cuando se sabe que la diabetes mellitus es la causa de diversas modificaciones que reducen la tasa de fertilidad, el mecanismo por el cuál esto ocurre aún es desconocido y constantemente se encuentra en debate. En recientes estudios se ha propuesto que existe una relación entre los parámetros del semen y el IMC, el mecanismo para esto es muy posible que incluya, de alguna manera, algún tipo de alteración del perfil hormonal reproductivo (Pasquali y cols. 2007; Qin y cols. 2007; Hammoud y cols. 2008). Aunado a esto, el exceso de peso corporal se ha asociado con una reducción de los niveles de testosterona, así como de gonadotropinas y la capacidad de la globulina como hormona fijadora (Isidori y cols. 1999; Kaufman y Vermeulen. 2005; Aggerholm y cols. 2008).

En pacientes con sobrepeso u obesidad se ha encontrado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad. Esto es acompañado por una disminución en los niveles de testosterona, mientras que las concentraciones de estrona y estradiol son mayores que las observadas en pacientes no obesos (Jensen y cols. 2004; Corona y cols. 2006; Pauli y cols. 2008;

Erdemir y cols. 2012). El aumento de la concentración de estradiol, es consecuencia de la conversión mediada por la aromatasas de los andrógenos gonadales y suprarrenales en estradiol y estrona. Este proceso también tiene lugar en el tejido adiposo (Zumoff y cols. 1990; Erdemir y cols. 2012), y podría tener un efecto directo sobre el medio ambiente testicular, alterando la espermatogénesis, movilidad y concentración espermática (Oliva y cols. 2001; Goyal y cols. 2003; Akingbemi 2005). La obesidad abdominal así como la presencia de estresores crónicos antes y después del nacimiento, se han relacionado con el aumento del índice de individuos con infertilidad (Sheiner y cols. 2003).

Estudios recientes, muestran una correlación inversa entre los niveles de testosterona en suero y el incremento acelerado de los niveles de insulina en humanos (Seidell y cols. 1990; Zumoff y cols. 1990). De manera particular, la resistencia a la insulina disminuye la secreción de testosterona en las células de Leydig cuando el peso corporal aumenta, independiente de los niveles de testosterona en suero (Pitteloud y cols. 2005). Dicha información sugiere, que esta relación inversa se debe al grado de obesidad que presenten los individuos. Aunado a ello, también se han mostrado niveles bajos de globulina fijadora a hormonas sexuales (SHBG) por sus siglas en inglés (Tsai y cols. 2004). En este mismo contexto, la señalización de la insulina en el cerebro juega un rol importante en regular la función reproductiva. La insulina promueve la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica, esto a su vez, estimula la secreción de gonadotropinas en la glándula pituitaria para estimular la secreción de testosterona en las células de Leydig (Bruning y cols. 2000). Por lo tanto, las tasas de complicaciones de la obesidad asociadas al estrés han aumentado en tan solo una década (Kyrou y Tsigos 2008).

La tendencia a la disminución de la fertilidad en hombres, ha sido evidente desde los años de 1940. Una asociación es la exposición a diversos factores ambientales durante la etapa del desarrollo sexual gonadal fetal, el cual altera la programación epigenética de la espermatogénesis (Carlsen y cols. 1992). Los mecanismos epigenéticos son básicamente 3 tipos: 1) Metilaciones en el ADN, 2) Modificaciones en las histonas y 3) Remodelación de la cromatina (Rajender y cols. 2011).

La influencia de la obesidad en las funciones sexuales masculinas ha sido analizada en modelos animales con androgenización neonatal, donde se ha encontrado hipogonadismo y obesidad en edad adulta (Nohara y cols. 2013). Por otro lado, la obesidad es caracterizada por un proceso inflamatorio con un aumento de estrés oxidativo (Marseglia y cols. 2015), el cual puede dañar estructuras celulares, como por ejemplo, el testículo, el cual induce un aumento en la apoptosis de células germinales y posterior hipoespermatogénesis (Turner y Lysiak 2008). Estos autores encontraron que el aumento en óxido nítrico se asocia con el estrés oxidativo, lo que puede inhibir los efectos del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) e inhibir la producción de testosterona, lo que sugiere que el estrés oxidativo testicular puede estar asociado con la disminución en los niveles de testosterona (Kasturi y cols. 2008). Aunado a ello, el estrés oxidativo altera la función espermática a través de la peroxidación lipídica o lipoperoxidación, lo que conlleva a un daño oxidativo en el ADN y la formación de aductos con proteína (Kasturi y cols. 2008).

Cabe resaltar que estudios en modelos animales con una dieta alta en carbohidrato sobre la organización histológica del testículo no han sido realizados. Dicho interés es relevante porque el consumo de sacarosa a diferentes porcentajes, tiempo de exposición y edad han mostrado la presencia de obesidad y alteraciones metabólicas (El Hafidi y cols. 1997; 2000; 2001; 2004; 2006; Alexander y cols. 2004; Pérez-Torres y cols., 2009). Específicamente, en el modelo de rata con una dieta con 30% de sacarosa, se ha reportado un aumento en la ganancia de peso y en los triglicéridos en plasma, algunos de ellos mostraron un aumento en la masa de tejido adiposo y se observaron cambios en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, presión arterial, colesterol y en los niveles de glucosa en plasma (Aguilera y cols., 2001; El Hafidi y cols., 2001; Oron-Herman y cols., 2008). Además de la presencia de alteraciones en órganos metabólicos importantes como hígado, páncreas, riñón, tejido adiposo y la glándula adrenal (El Hafidi 2001; 2004; Alexander y cols. 2004; Pérez-Sánchez 2011; Díaz-Aguila y cols. 2015; Corona-Pérez y cols. 2015). Lo que nos lleva a pensar que dicho modelo también puede afectar la organización histológica del testículo.

En ratas machos se ha propuesto otro tipo de mecanismo, el rol que tiene la insulina en la infertilidad. La fluctuación en la cantidad de glucosa e insulina, causan alteraciones moleculares

importantes, debido al deterioro de la obesidad ya que los individuos pierden gradualmente la sensibilidad a la glucosa e insulina. La insulina actúa sinérgicamente con otras hormonas que son importantes para la reproducción. El rol de la insulina se da en las células testiculares modulando la motilidad espermática y realizando la absorción total de las cisternas de nucleótidos, ATP, GTP y UTP, así como de la transferrina de las células de Sertoli (Fig. 11). Las células de Sertoli son responsables de la conversión de glucosa a lactato para el desarrollo de células germinales. La disminución de glucosa en el medio principal de las células de Sertoli incrementa la absorción de glucosa para mantener la producción de lactato, modulado por la expresión de GLUT1 y GLUT3, pero la disminución en los niveles de insulina o la resistencia a la insulina (RI), alteran el metabolismo de los HC, por lo que aunque los GLUT's se adapten al cambio, el piruvato se afecta (Alves y cols. 2013).

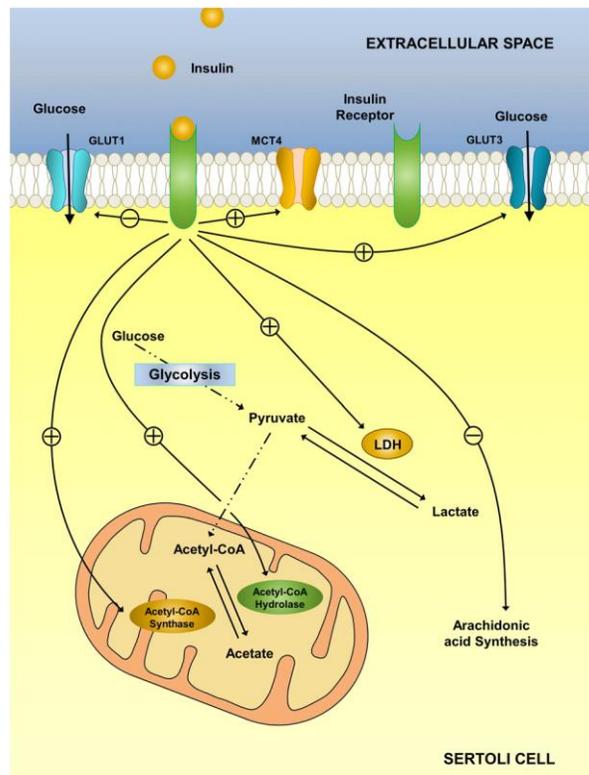


Figura 11. Ilustración de la acción de la insulina en las vías metabólicas de las células de Sertoli. Los efectos de la insulina, son mediados por las interacciones con los receptores de insulina, que pueden inducir efectos severos en el metabolismo asociado a los transportadores. Algunos de estos efectos pueden ser estimulatorios, como en el transportador monocarboxilato 4 (MCT4), transportador de glucosa 3 (GLUT3), lactato deshidrogenasa (LDH), acetil-CoA sintetasa y acetil-CoA hidrolasa, mientras otros efectos pueden ser inhibitorios como en el transportador de glucosa 1 (GLUT1) y la síntesis del ácido araquidónico (Alves y cols. 2013).

Sin embargo, hay estudios relacionados con dieta rica en grasa y los parámetros de reproducción sexual (Erdemir y cols. 2012). Diversos estudios han mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, además de favorecer el desarrollo del síndrome metabólico, incrementa las concentraciones de leptina, de 17β -estradiol y de estradiol, disminuyendo la LH, FSH, testosterona así como, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y diferencias histológicas en los túbulos seminíferos (Olivares y cols. 2011; Fernández y cols. 2011; Viguera-Villaseñor y cols. 2011). En ratas Sprague–Dawley de 21 días de edad con una dieta con 25% de grasa durante 90 días, muestran que no hay cambios en los niveles de insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos, pero sí presentan aumento en los niveles de leptina y estradiol con una disminución en la concentración de testosterona, al analizar los túbulos seminíferos no encontraron diferencias histológicas (Viguera Villaseñor y cols. 2011). Lo que sugiere que la leptina está asociada a la disminución de los niveles de testosterona. Por otro lado, en ratas de 6 semanas de edad, que consumen una dieta hipercalórica (alta en grasas y en índice calórico, como salchichas, papas fritas, mantequilla, dulces, galletas, chocolate, cacahuets salados y queso), se observa un aumento en el peso corporal y triglicéridos, una disminución en los niveles de testosterona, sin modificaciones en colesterol, LH, FSH y estradiol (Erdemir y cols. 2012). Una dieta rica en grasa induce la acumulación de lípidos en tejido adiposo e hígado, provocando cambios deletéreos en el metabolismo y por lo subsecuente sobrepeso en la crías (Kjaergaard y cols. 2014), dicho aumento en las concentraciones de triglicéridos está asociado con la pobre calidad espermática, así como con diversos efectos negativos sobre las células de Leydig y Sertoli, que alteran la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, la formación del citoesqueleto espermático y la maduración espermática (Edermir y cols. 2011; Monfared 2012). Cabe resaltar que la mayoría de los estudios, anteriormente mencionados, están enfocados en estudiar la dieta alta en grasa.

Seung y colaboradores (Seung y cols. 2013), sugiere que la insulina regula directamente la esteroidogénesis testicular por inducción del receptor huérfano DAX-1 en las células de Leydig en el testículo en ratas machos alimentados con una dieta rica en grasa. Esto podría darse por que la insulina se une a los receptores de insulina en las membranas de las células de Leydig y activa los receptores β -fosfoinsulinicos (IR- β), fosfo-IRS1, y fosfo-AKT, generando sobre-

expresión del gen DAX-1. Dicho gen se expresa a lo largo de las células de Leydig descrito en ratones. Con la sobreexpresión de la insulina en las células de Leydig se reducen las células germinativas y causa infertilidad en los ratones, esto se debe a que el DAX-1 actúa como un regulador negativo de los receptores nucleares para disminuir la gluconeogénesis y esteroidogénesis en las células de Leydig. La inhibición de este gen revierte dicho efecto sobre la esteroidogénesis inducida por la insulina. Así, la insulina al estar elevada inicia la vía de señalización y subsecuente a esto se inhibe la esteroidogénesis por inducción del DAX-1, sin presentarse cambios en los niveles de LH y FSH. En conjunto, la expresión de genes enzimáticos esteroidogénicos y la esteroidogénesis disminuyen, debido a que los niveles del DAX-1 son elevados en los testículos de ratones alimentados con una dieta rica en grasa. Se sabe que la leptina se encarga de regular el apetito y se relaciona con el peso corporal, la cantidad de tejido visceral y el consumo de alimento, mostrando una relación inversamente proporcional, es decir, si las cantidades de leptina aumentan, el consumo de alimento disminuye así como el peso corporal y el tejido adiposo también. Sin embargo, Marques y cols. (2010), muestran que el aumento de los niveles de leptina aumenta el consumo de alimento y el peso corporal, pero el peso del testículo disminuye. Diversos estudios muestran que la leptina juega un papel importante en la reproducción humana debido a que los receptores de leptina están presentes en las células granulosas del ovario. Tratamientos de leptina en dichas células, inhibe la estimulación y producción hormonal del estradiol en ratas. Los receptores de leptina también están presentes en el tejido testicular. Y se ha mostrado que la leptina inhibe directamente la hormona del crecimiento, el cual se encarga de estimular la secreción de testosterona en las células de Leydig en la rata a través de una vía funcional de las isoformas de los receptores de leptina. Los niveles de leptina son inversamente correlacionados con las concentraciones de testosterona y se ha demostrado que la testosterona regula el gen de la obesidad. Por lo anterior, se cree que la leptina regula directamente la esteroidogénesis testicular en humanos. Por lo que se sugiere que, la deficiencia en la producción de andrógenos testiculares está relacionada directamente con la cantidad de grasa corporal y los niveles disminuidos de leptina (Andrea y cols, 1999). En ratas machos obesos, se observa una disminución de la calidad espermática debida a la disminución de los porcentajes de espermias con movilidad progresiva, sin afectar otros parámetros espermáticos, lo anterior está asociado con hipotestosteronemia ^{afectando} la

fertilidad. Por otro lado, el tejido adiposo y el aumento de estradiol como consecuencia de la conversión mediada por la aromatasas de los andrógenos gonadales y suprarrenales en estradiol y estrona, se asocian recíprocamente al aumento de la frecuencia de la disfunción eréctil (Pasquali y cols. 2007; **Hofnny** cols. 2010; **Fernández** y cols. 2011).

2.2 Estrés, libido e infertilidad masculina

En varios estudios se ha mostrado que, la exposición a estresores crónicos de manera constante pueden poner en peligro funciones fisiológicas, como el metabolismo y la reproducción (Charmandari y cols. 2005). Hans Selye, sugirió que la exposición a estresores crónicos incrementa la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Selye 1946), y a la par reduce la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Charmandari y cols. 2005), y se observa una relación antagonista entre los glucocorticoides y las hormonas gonadales (Chrousos 2007). Es por eso que, el incremento en los glucocorticoides durante el estrés inhibe la estimulación de la GnRH en el hipotálamo, así como la liberación de las gonadotropinas en la hipófisis (Gore y cols. 2006), y la función gonadal, además disminuyen la síntesis de hormonas esteroideas e induce apoptosis celular en las gónadas (Whirledge y Cidlowski 2010). El estrés es considerado uno de los factores que causa infertilidad en hombres (Sheiner y cols. 2003), al reducir el conteo espermático (Collodel y cols. 2008; Lenzi y cols. 2003), la motilidad (Fukuda y cols. 1996), y probablemente causa defectos morfológicos en el espermatozoide (Auger y cols. 2001) y con ello, la disminución de la fertilidad en hombres, principalmente en aquellos con baja concentración espermática (Hjollund y cols. 2004).

En humanos, la exposición prolongada a estrés, incrementa los niveles de cortisol en plasma con una constante disminución de los niveles de testosterona en plasma (Remes y cols. 1985). En la rata se ha mostrado que la reproducción puede ser alterada tanto por estresores agudos (Fukuda y cols. 1996) como crónicos (Sheiner y cols. 2003; Wingfield and Sapolsky 2003). La magnitud de estos efectos en la reproducción también depende del tipo y duración del estresor (Retana-Márquez y cols. 1996). Por ello, la infertilidad ha sido un tópico de interés para la investigación, usando modelos animales y diferentes tipos de estresores para clarificar los efectos producidos tanto el estrés agudo como crónico sobre los testículos y la calidad espermática. Así, las ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización, causa una disminución de la hormona liberadora de corticotropina en el hipotálamo e incrementa los niveles de

adenocorticotropina y glucocorticoides en plasma, así como un efecto inhibitorio general en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, debido a la disminución de LH y testosterona (Tsuchiya y Hori 1995).

El estrés por inmovilización durante 6h/día por 60 días, causa una reducción en la cantidad de espermátides maduras en el testículo, así como, en la concentración de los espermatozoides en la porción caudal del epidídimo (Almeida y cols. 2000). En otro estudio el estrés por inmovilización durante 4h/día por 2 meses causa una reducción en el número de espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, así como, en las espermátides (Rai y cols. 2003). En ratas machos estresadas por inmovilización en una posición supina durante 6 horas por día durante seis semanas, disminuye la motilidad espermática y la cantidad de eyaculación lo que causa disfunción reproductiva (Potemina 2008). Un estudio reciente realizado en ratas machos, se observó que el estrés por inmovilización (5h/día) durante 60 días o una inmovilización (1h/día) seguido de un nado forzado (15min/día) durante 60 días, causa una reducción en el conteo espermático, en la viabilidad y motilidad, así como, una disminución en el número de espermatozoides (Hariy Reddy 2012). La mayoría de dichos cambios se ha demostrado que son irreversibles (Nirupama y cols. 2012), aunque se ha reportado que no son necesariamente asociados al aumento o disminución de los niveles de testosterona, ya que el efecto del estrés sobre el testículo y sus posibles afecciones depende de las características de cada estresor (Márquez y cols. 2003).

En nuestro laboratorio, hemos estudiado el hígado y el riñón en ratas adultas jóvenes Wistar estresadas y con el consumo de 30% de sacarosa durante un mes, lo que hemos encontrado en el riñón es que los dos factores disminuyen la cápsula de Bowman y el área glomerular y la creatinina sérica es afectada por la dieta (Sánchez Solís tesis de doctorado en proceso). En el hígado se ha reportado que el estrés crónico aumenta los niveles de corticosterona y la actividad de la enzima 11β -HSD-1 acompañado de un aumento de triglicéridos hepáticos, y estrés oxidativo hepático (Corona-Pérez y cols. 2015), por lo que también se puede esperar que en estas ratas encontremos modificaciones a nivel histológico como funcional en las gónadas.

3. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país la ENSANUT en el 2012, reportó que el 9.8% de los preescolares presentó sobrepeso, 34.4% de los niños en edad escolar, 35.9% de los adolescentes y 71.3% de los adultos padece sobrepeso y obesidad. Estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas. Por otro lado, el estrés psicosocial se asocia con el desarrollo de la obesidad (Tamashiro 2011; Isasi y cols. 2015). Los individuos pueden mostrar una preferencia por los alimentos más ricos en azúcares y grasas, contribuyendo al exceso de calorías (Torres y Nowson 2007).

Estudios en ratas machos relacionan las modificaciones en la dieta durante la gestación y/o lactancia aunada a la presencia de estrés, con el aumento a la susceptibilidad a desarrollar obesidad en edad adulta, mostrando que el estrés y/o modificaciones en la dieta durante la vida intrauterina o el medio ambiente postnatal aumenta la susceptibilidad a desarrollar obesidad y conduce a consecuencias metabólicas en edad adulta (Fowden y cols. 2005; Tamashiro y cols. 2009). Recientemente se ha mostrado, que el estrés crónico aumenta la concentración de corticosterona e induce apoptosis en las células de Leydig en ratas y disminuye la concentración de testosterona en machos adultos (Chen y cols. 2012).

Con base en estos resultados, estamos interesados en evaluar, sí el consumo elevado de sacarosa más el estrés inmediato al destete, solo en un mes, afecta la organización histológica de las gónadas y la concentración de testosterona.

Cabe resaltar que la mayoría de los estudios están enfocados en estudiar los efectos de una dieta alta en grasa, sin embargo, los resultados obtenidos son dependientes de la cantidad de grasa presentes en la dieta así como de la edad con la que inician y finalizan el tratamiento.

Pero ¿Qué pasaría si en un individuo aumentaran los niveles de leptina inducidos por el consumo elevado de sacarosa? Y aún mas ¿Qué pasaría si dicho individuo se sometiera a estrés?, aún se desconoce los efectos en las gónadas.

4. HIPÓTESIS

El estrés crónico más el consumo elevado de sacarosa al destete afectan la concentración de testosterona, corticosterona y leptina, y provocan un desarreglo histológico en los testículos de la rata

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés más el consumo elevado de sacarosa al destete sobre la concentración de testosterona, corticosterona y leptina, y el arreglo histológico en los testículos de la rata

6. OBJETIVO ESPECÍFICOS

En todos los grupos experimentales:

Analizar el peso corporal de los animales.

Determinar el índice de adiposidad, la cantidad de tejido adiposo gonadal y visceral

Cuantificar los niveles de leptina, testosterona y corticosterona sanguíneos

Evaluar el arreglo histológico del testículo

Determinar los niveles de triglicéridos gonadales

Cuantificar el estrés oxidativo gonadal

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad. Las ratas se colocaron aleatoriamente en jaulas independientes (37 X 27 X 16 cm) mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo de 12/12 hrs, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

7.2 Grupos experimentales

Al día del destete se tomaron cuatro ratas machos procedentes de madres diferentes (un macho de cada madre). Las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos (un macho de diferente madre por grupo) experimentales (8/grupo): ratas que consumen agua simple (C), agua simple + estrés (E), agua azucarada (sacarosa 30%; A30) y agua azucarada (sacarosa 30%) + estrés (A30/E). Tal manipulación se realizó a partir de día 22 (Fig. 12).

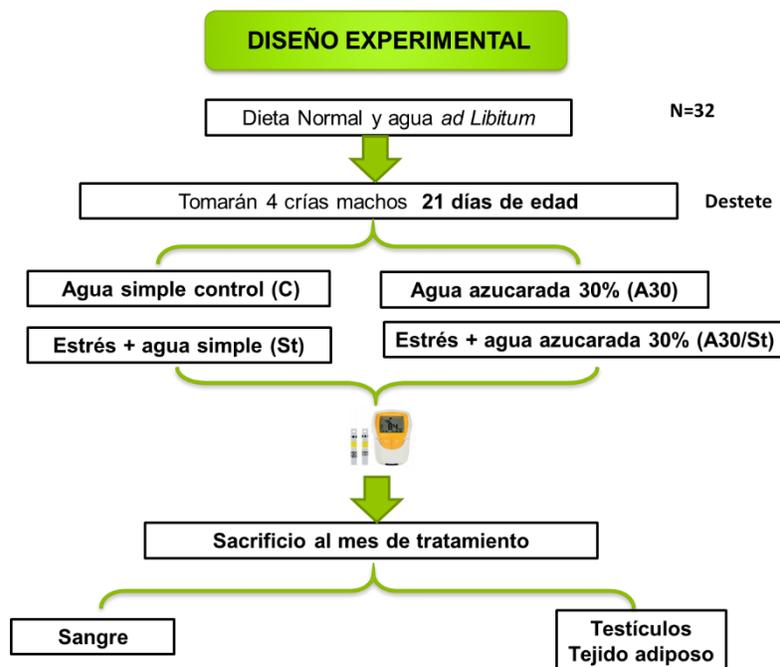


Figura 12. – Diseño experimental. Grupo control (n=8), grupo azucarado (n=8), grupo estresado (n=8) y grupo estresado + azúcar (n=8).

7.3 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina (Tabla 2). Los grupos experimentales recibieron 30% de sacarosa estándar comercial en el agua que consumen, las ratas del grupo control consumieron agua simple. Durante el periodo experimental, se hizo el registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 horas después. La ingesta total de calorías se determinó a partir de la cantidad de alimento ingerido (calculado como $\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal \times 3.3kcal/g de alimento) y el consumo de sacarosa (evaluado como mL de agua/ 100g peso corporal \times g de azúcar/ mL de agua \times 4 cal/g de azúcar).

DIETA CONTROL (CHOW 5001 PURINA)		
Nutrimento	Porcentaje (%)	Kcal
Proteínas	29	98.6
Lípidos	13	44.2
Carbohidratos	58	197.2
Total	100	340

Tabla 2. Aporte calórico por cada 100 gramos de alimento de dieta Chow 5001 de Purina.

7.4 Inducción de estrés

Para someter las ratas a estrés, se colocaron en tubos de plástico de diferentes tamaños, fijados con cinta adhesiva en el exterior, un extremo se mantiene abierto para que la rata pueda respirar. Las ratas son expuestas 1hr diaria de estrés a las 11:00 hrs durante 5 días a la semana hasta concluir el mes del experimento (sin estrés los fines de semana) siguiendo el protocolo de Macedo y colaboradores del 2012. Tal manipulación se realizó a partir de día 22.

7.5 Obtención de muestra sanguínea y gónadas

Al término del tratamiento, previo al sacrificio, las ratas se dejaron en ayuno para lo cual se les quitó el alimento a las ocho de la noche y a las ratas del grupo A30 se les retiró el agua azucarada,

y se les colocó agua simple para cumplir un ayuno de doce horas. Al día siguiente, a las ocho de la mañana, a cada rata se le midió la glucosa sérica con un analizador Accutrend GCT, Roche Diagnostics. Inmediatamente después los animales fueron sacrificados por decapitación para coleccionar dos tubos (13 x 100) de sangre. La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se hicieron alícuotas de 100 µL de suero las cuales se conservaron en refrigeración. Posteriormente se utilizó una alícuota para determinar la concentración sanguínea de testosterona, corticosterona y leptina por el método de ELISA. La rata decapitada inmediatamente se colocó en posición supina, se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral en la cavidad abdominal del dorsal del pene, para extraer los testículos y el tejido visceral y gonadal los cuales fueron pesados. El índice de adiposidad fue calculado como el total de tejido adiposo (g) dividido por el peso corporal (g).

7.6 Determinación de hormonas (corticosterona, testosterona y leptina).

El análisis de corticosterona sanguínea se realizó por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) por medio de un estuche comercial, Kit Enzyme Immunoassay, compañía Assay Desing No.900-097. Los estándares y las muestras fueron medidos por duplicado. La sensibilidad del ensayo para la corticosterona es de 2.1 pg/mL intraensayo y 5.3pg/mL interensayo, para la testosterona de 4.5pg/ml intraensayo y 6.3pg/ml interensayo. Para la leptina el estuche comercial es Enzyme Immunoassay, compañía Cayman No.10007609 y la sensibilidad del ensayo es de 4.1 pg/ml intraensayo y 5.3pg/ml interensayo.

7.7 Análisis histológico de las gónadas

El testículo derecho fue fijado con Bouin durante 24hrs. Posteriormente, el tejido fue deshidratado con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%), aclarado con xilol y fue incluido en Paraplast Plus. Se obtuvieron cortes histológicos transversales de 5µm de espesor con un microtomo, los cuales se colocaron en portaobjetos, 8 cortes por laminilla. Las laminillas fueron teñidas con hematoxilina eosina y se tomaron fotomicrografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 10, 40 y 100 aumentos totales). Con el programa Adobe Photoshop

CS se realizaron reconstrucciones de las imágenes tomadas a 10x (Fig. 13), para muestrear aleatoriamente con un analizador Imágenes AxioVision REL 4.6 (ZeissInc 2007) y determinar el número total de túbulos por cuadrante (Fig. 14, la circunferencia de cada uno de ellos, así como el diámetro del lumen y del epitelio germinativo de dichos túbulos (Fig. 15). El estudio histológico y el análisis morfométrico de los testículos nos revelarían si existen alteraciones histológicas en las gónadas por el estrés y el consumo elevado de sacarosa a temprana edad.

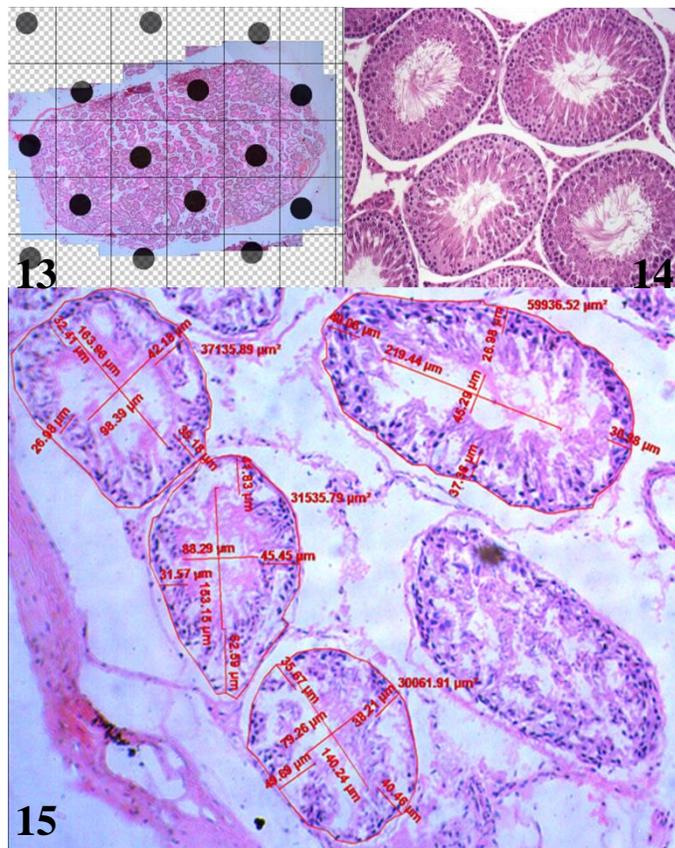


Figura 13. – Reconstrucción del testículo y su cuadrícula. Fotomicrografías donde se muestra la reconstrucción de los cortes histológicos del testículo con tinción Hematoxilina-Eosina (10x). **Figura 14.** – Muestra de un cuadrante. Fotomicrografía de un cuadrante seleccionado aleatoriamente, del grupo control, con tinción Hematoxilina-Eosina (100X). **Figura 15.** – Túbulos seminíferos medidos. Fotomicrografía de un túbulo seminífero con tinción Hematoxilina-Eosina (40X). Se muestran las mediciones realizadas al túbulo seminífero.

7.8 Determinación de triglicéridos gonadales

Con el testículo izquierdo fueron medidos los triglicéridos gonadales por el método de Folch con algunas modificaciones (Corona-Pérez y cols. 2015). Las muestras de tejido gonadal

congelado (aproximadamente 0.5 g cada uno) se homogenizaron en 5.4 ml de cloroformo/metanol (2: 1; v / v; JT Baker, México) y se agitaron en vórtex. La fases orgánica e inorgánica fueron separados por la adición de 1.8 ml de NaCl al 0,7% (JT Baker, México). Las muestras se centrifugaron a 1200 RPM durante 15 min a 4°C. La fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo y se evaporó. Las muestras fueron resuspendidas en isopropanol + Tritón X-100 al 10%. La cantidad de triglicéridos gonadales se midieron usando un kit comercial (Elitech Clinical Systems, México). El contenido de triglicéridos gonadales se reporta como mg de triglicéridos / g de tejido testicular.

7.9 Determinación de estrés oxidativo

Otra cantidad del mismo testículo izquierdo (aproximadamente 0.5 g) fue utilizado para determinar el estrés oxidativo por el método de lipoperoxidación, se determinó mediante dos técnicas independientes: la de TBARs para cuantificación de dialdehído malónico (MDA) y la de dienos conjugados (DC). La cuantificación de MDA se realizó con la técnica del ácido tiobarbitúrico, por espectrofotometría (Luna-Moreno et al. 2007). Se utilizó 1 mg de proteína para el homogenado del testículo. Se incubó la muestra en 1 ml de buffer de tris 0.5 M, pH: 7.4 durante 30 min a 37° C en baño maría. Después se adicionó 1.5mL de ácido acético al 20% (ajustada a pH 2.5 con KOH), 1.5mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8 % y 0.5 mL de agua desionizada. La muestra fue hervida durante 45 minutos y luego se añadió 1mL de KCl al 1.2 %. El complejo coloreado que se formó se extrajo con una solución de piridina-butanol (1:15, v/v) y se cuantificó a 532 nm. El MDA fue utilizado como estándar (coeficiente de extinción: $1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$). La peroxidación de los lípidos *in vitro* se determinó midiendo la absorción UV a 233nm de dienos conjugados (DC) en los extractos de lípidos (cloroformo-metanol 2:1, v/v) resuspendidos en ciclohexano en todas las muestra (Klaassen y LPaa 1969). La identificación de la presencia de grupos carbonilos en las proteínas se realizó por espectrofotometría (Levine y cols. 1990). Brevemente, 1 mg de proteína (método de Lowry) fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadió 0.5 ml de ácido tricloroacético al 20% para precipitarlo. Posteriormente se agregó 0.5 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM en HCl 2M. La mezcla fue incubada por 1 hora en un cuarto frío y se agitaba cada 10 min durante todo el

proceso. Nuevamente se agregó 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó a 11,000 g por 3 min y se tiró el sobrenadante. Los pellets fueron lavados 3 veces con 1 mL de etanol-acetato etilo (1:1 v / v) para remover el reactivo libre, dejando reposar la muestra por 10 min entre cada centrifugación, tirando el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el precipitado de la proteína en 0.6 ml de la solución guanidina 6M con K_2HPO_4 20mM (ajustado pH a 2.3 con ácido trifluoroacético), e incubado a 37°C durante 15 min. Se removió cualquier residuo insoluble por centrifugación a 11, 000 g por 3 min. El producto fue analizado en un espectrofotómetro (Novaspec II) a 360 nm usando como coeficiente de extinción molar 22,000 $M^{-1} cm^{-1}$. El contenido de carbonilos en la proteína fue calculado dividiendo la densidad óptica (D.O.) entre 0.022 y expresado en nmolas / mg de proteína.

7.10 Análisis estadístico

Los valores obtenidos se analizaron a través de una ANOVA de dos vías y una Newman-Keuls como prueba pos hoc ($p < 0.05$) en el programa GraphPad Prisma 5.01. Todos los resultados se muestran como la media \pm el error estándar (e.e).

8. RESULTADOS

8.1 Ganancia de peso y variables dietéticas

Todos los animales presentaron similar ganancia de peso corporal (dieta, $F_{1, 1,31}=1.29$; $p>0.05$; estrés, $F_{1, 1,31}=4.64$; $p>0.05$; interacción, ($F_{1, 1,31}=0.11$; $p>0.05$; Tabla2). Sin embargo, la ingesta de alimento disminuye en los grupo A30 y A30 + E por efecto de la dieta (dieta, $F_{1, 1,31}=114.17$; $p<0.0001$) sin efecto por el estrés ($F_{1, 1,31}=0.06$; $p>0.05$) ni la interacción ($F_{1, 1,31}=0.60$; $p>0.05$; Tabla2). De la misma manera el consumo de agua fue afectado en el grupo A30 por la dieta (dieta, $F_{1, 1,31}=11.47$; $p=0.002$) sin efecto por el estrés ($F_{1, 1,31}=1.83$; $p>0.05$) ni la interacción ($F_{1, 1,31}=0.93$; $p>0.05$; Tabla2). Como consecuencia, la ingesta calórica aumenta en los grupo A30 y A30/E solo por la dieta ($F_{1, 1,31}=120.26$; $p<0.0001$), estrés ($F_{1, 1,31}=1.11$; $p>0.05$), interacción ($F_{1, 1,31}=0.04$; $p>0.05$; Tabla 2). Aunque, los niveles de glucosa en sangre no se modifican (dieta, $F_{1, 1,27}=0.47$; $p>0.05$; estrés, $F_{1, 1,27}=1.29$; $p>0.05$; interacción, $F_{1, 1,27}=0.96$; $p>0.05$; Tabla 3).

Parámetros	C	E	A30	A30+E
Ganancia de peso corporal (g)	129±9	112±8	122±8	98±12
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	11±0.5 ^a	10±0.5 ^a	6±0.2 ^b	6±0.4 ^b
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	25±2 ^a	25±1 ^a	31±1 ^b	28±1 ^a
Ingesta calórica (kcal/día/100g peso corporal)	37±2 ^a	35±2 ^a	56±1 ^b	54±2 ^b
Glucosa sanguínea (mg/dL)	112±7	90±14	109±3	107±13

Tabla 3. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica y glucosa. Se muestra la media ±e.e. Letras diferentes muestran diferencias significativas, $p<0.05$. ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (A30/E) (n=6-8/grupo).

8.2 Índice de adiposidad

El índice de adiposidad no fue afectado por la dieta ($F_{1, 1,25} = 0.54$, $p > 0.05$), pero el estrés produce una disminución comparado con el grupo A30 ($F_{1, 1,25} = 8.73$, $p < 0.05$), aunque no por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1,25} = 0.07$, $p > 0.05$; Fig.16A). Por otro lado, el tejido adiposo gonadal fue similar entre grupos (dieta $F_{1, 1,27} = 3.4479$; $p > 0.05$) (estrés $F_{1, 1,27} = 0.07$; $p > 0.05$) (interacción $F_{1, 1,27} = 0.33$; $p > 0.05$; Fig. 16B).

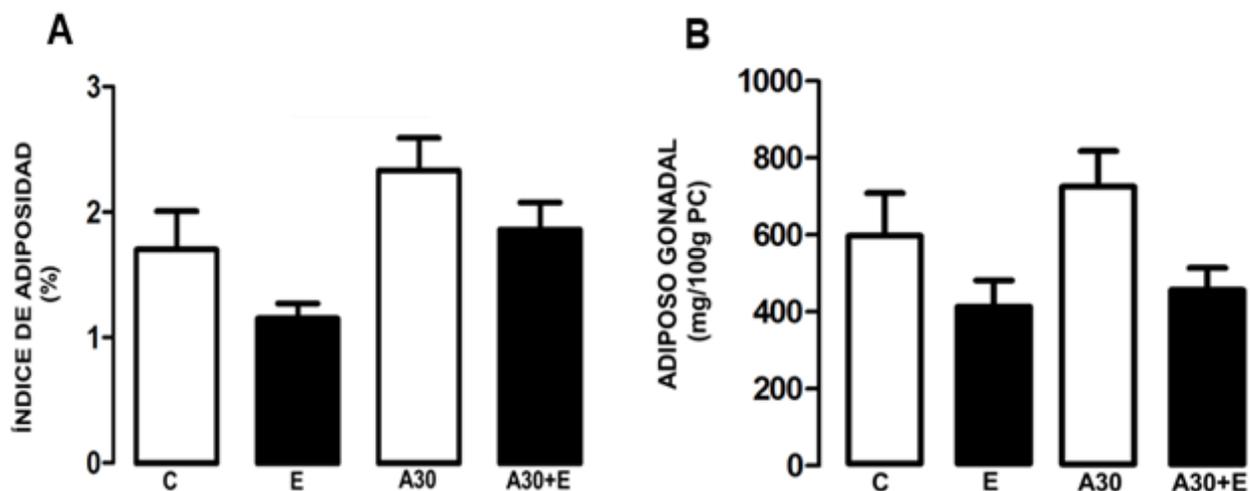


Figura 16. Tejido adiposo visceral (A) Tejido adiposo gonadal (B). Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas, * $p < 0.05$. ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (A30/E) (n=6-8/grupo).

8.3 Peso testicular

El peso testicular fue incrementado significativamente por la dieta ($F_{1, 1,31}=34.20$; $p<0.01$) comparado con los grupos C y E. El estrés incrementó el peso de los testículos comparado con el grupo C ($F_{1, 1,31}=101.94$; $p<0.01$). Sin embargo, el estrés revierte el efecto inducido por la dieta en el grupo A30+E ($F_{1, 1,31}=87.54$; $p<0.01$; Fig. 17).

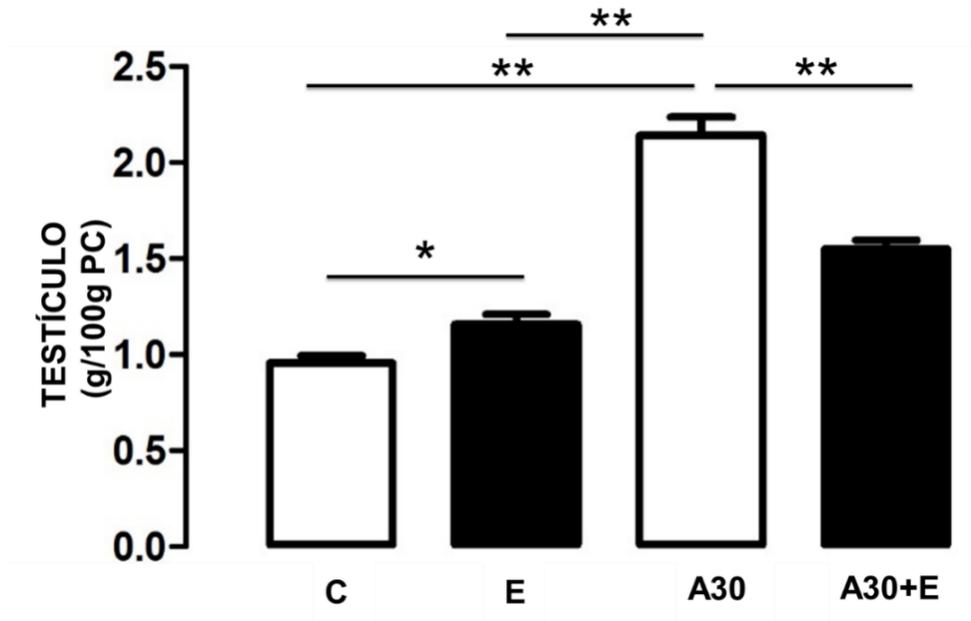


Figura 17. Peso testicular. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas, * $p<0.05$, ** $p<0.01$. ANOVA de dos y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30) y sacarosa al 30% más estrés (A30+E) ($n=8$ /grupo).

8.4 Características cualitativas testiculares

En el grupo C podemos observar una luz tubular adecuada, con un epitelio germinativo abundante y con un citoplasma bien delimitado (Fig. 18C), características similares se observan en el grupo E acompañadas de pequeñas invaginaciones del mismo tejido que inician en la periferia, pero pueden desplazarse hacia el lumen tubular (Fig. 18F). En el grupo A30 podemos observar una luz tubular pequeña, con escaso epitelio germinativo y un citoplasma irregular (Fig. 18I). Finalmente el grupo A30/E presenta las mismas características que el grupo E (Fig. 18L).

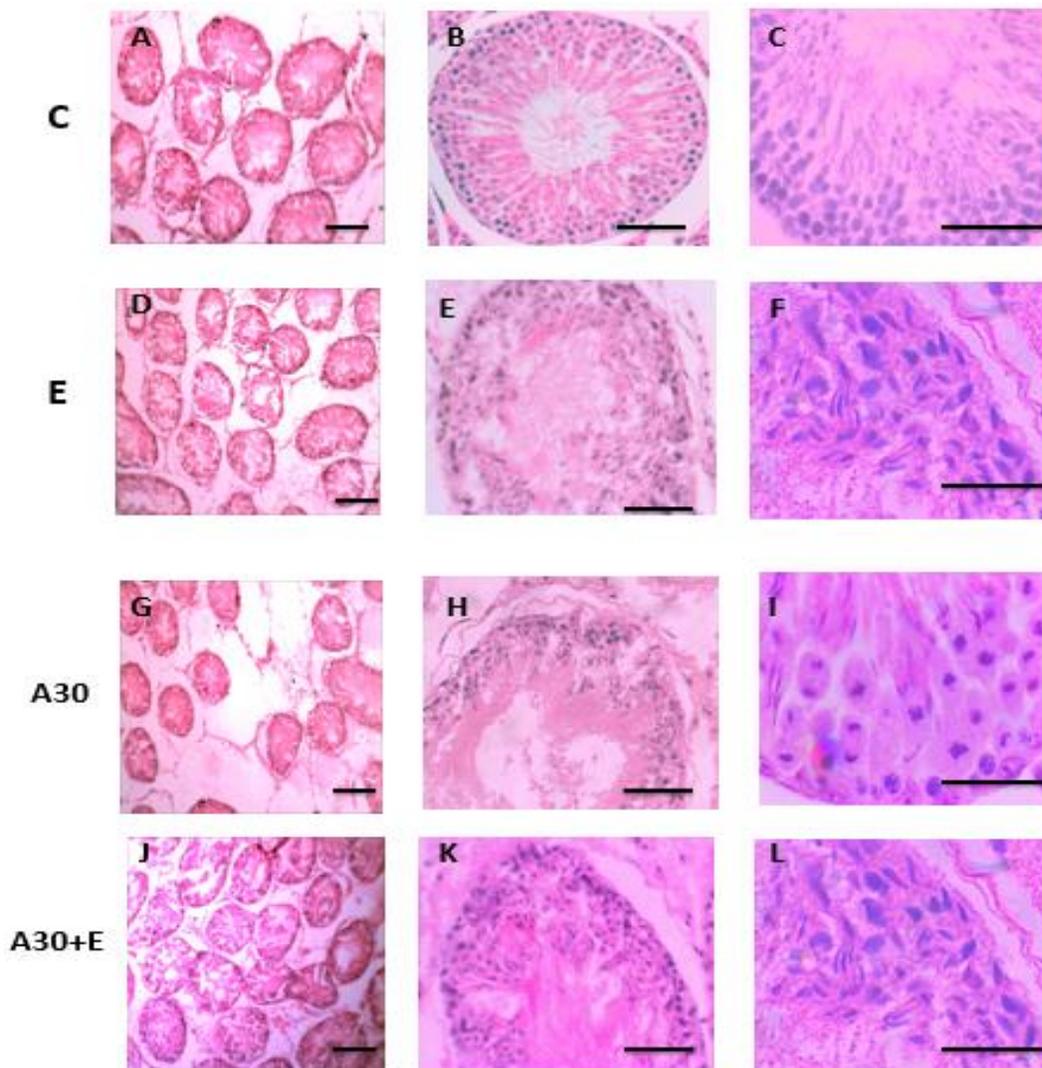


Figura 18. Características morfométricas del testículo. Grupo control (A, B, C); grupo estresado (D, E, F); grupo A30 (G, H, I); grupo A30+E (J, K, L). Lumen, L; epitelio germinativo, eg; intersticio, i. Barra = 50µm (A, D, G, J); barra=10µm (B, E, H, K); barra=5µm (C, F, I, L; n=8/grupo).

8.5 Cuantificación histológica testicular

El número de túbulos seminíferos no se modificó por la dieta ($F_{1, 1,23} = 0.58$, $p > 0.05$) ni el estrés ($F_{1, 1,23} = 1.07$, $p > 0.05$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1,23} = 0.10$, $p > 0.05$; Fig. 19A). La circunferencia tubular disminuye por la dieta rica en sacarosa ($F_{1, 1,23} = 41.64$, $p < 0.01$) comparado con los grupos C, E y A30+E, sin observar modificaciones por el estrés ($F_{1, 1,23} = 65.21$, $p > 0.05$) ni por la interacción de los factores ($F_{1, 1,23} = 54.71$, $p > 0.05$; Fig. 19B). El lumen tubular incrementa por la dieta ($F_{1, 1,23} = 9999.84$, $p < 0.01$) comparado con los grupos C, E y A30+E, pero no por el estrés ($F_{1, 1,23} = 9756.68$, $p > 0.05$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1,23} = 9922.0728$, $p > 0.05$; Fig. 19C). Adicionalmente el epitelio germinativo disminuye por la dieta ($F_{1, 1,23} = 18.92$, $p < 0.01$) comparado con los grupos C, E y A30+E, sin ser afectado por el estrés ($F_{1, 1,23} = 3.30$, $p > 0.05$) ni por la interacción de los factores ($F_{1, 1,23} = 3.47$, $p > 0.05$; Fig. 19D).

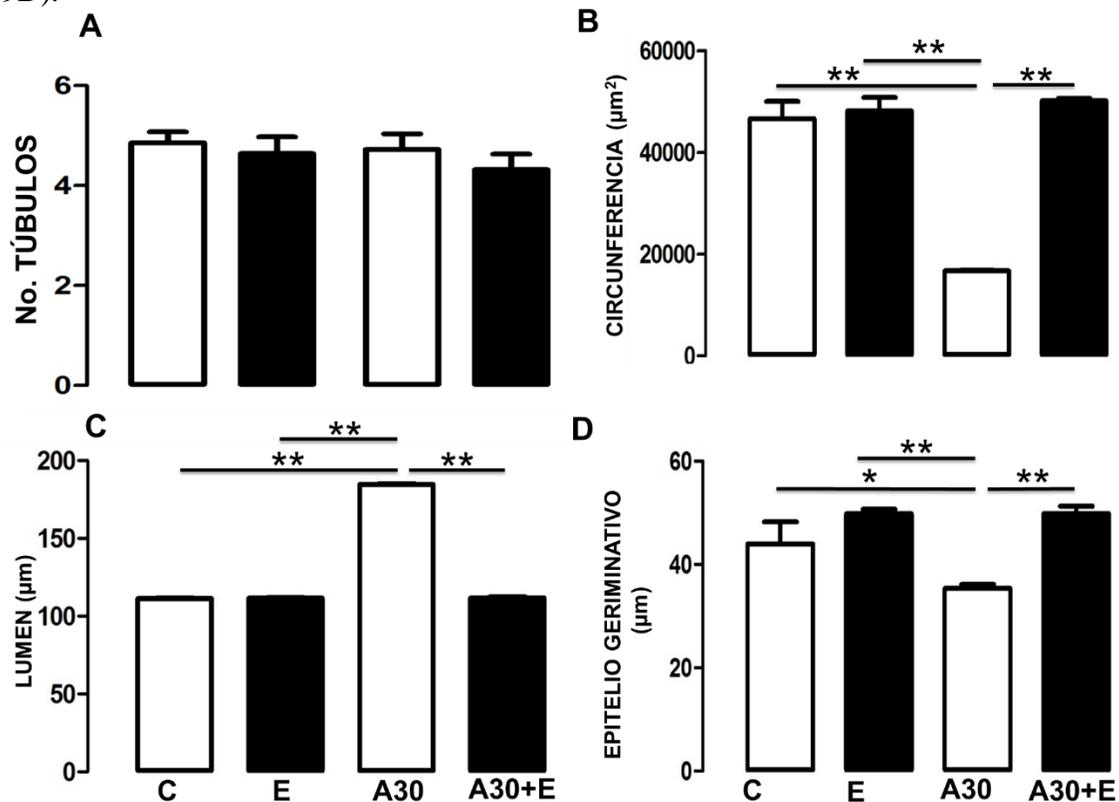


Figura 19. Cuantificación histológica. A) Número de túbulos, B) Circunferencia tubular, C) Lumen tubular; D) Epitelio germinativo. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30) y sacarosa al 30% más estrés (A30+E) (n=6/grupo).

8.6 Hormonas

Como se esperaba el grupo estresado presentó un aumento en los niveles de corticosterona sérica comparado con el grupo control C ($F_{1, 1, 23}=3.09$, $p>0.05$). Mientras que, esta variable es similar en el grupo C y el grupo A30 ($F_{1, 1, 23}=11.39$, $p<0.05$). La interacción entre el estrés crónico y el consumo elevado de sacarosa (A30+E) reduce los niveles de corticosterona sérica comparado con el grupo E ($F_{1, 1, 23}=3.54$, $p>0.05$; Fig. 20A). La testosterona no se modifica por la dieta ($F_{1, 1, 27}=0.90$, $p>0.05$) ni por el estrés ($F_{1, 1, 27}=0.89$, $p>0.05$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1, 27}=2.04$, $p>0.05$; Fig. 20B). Sin embargo, podemos observar una tendencia positiva en el grupo A30 con respecto a los demás grupos. Los niveles de leptina en suero fueron afectados por la dieta comparado por los grupos C y E ($F_{1, 1, 31}=9.83$; $p<0.05$; Fig. 21). El estrés no modifica los niveles de leptina ($F_{1, 1, 31}=2.28$; $p>0.05$; Fig. 21) ni la interacción de ambos factores ($F_{1, 1, 31}=0.60$; $p>0.05$; Fig. 21).

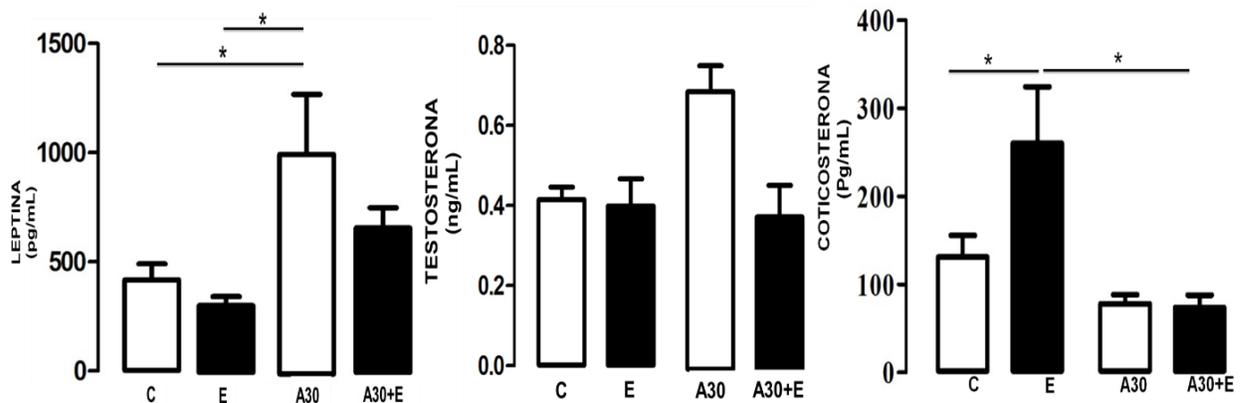


Figura 20. A) leptina sérica, B) Corticosterona sérica y C) Testosterona sérica. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas, * $p<0.05$. ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30) y sacarosa al 30% más estrés (A30+E) (n=8/grupo).

8.7 Triglicéridos

El contenido de triglicéridos gonadal no se modifican por la dieta ($F_{1, 1,24} = 0.47$; $p > 0.05$, Fig. 22) ni por el estrés ($F_{1, 1,24} = 1.29$; $p > 0.05$, Fig. 22), ni por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1,24} = 0.96$; $p > 0.05$, Fig. 22). Sin embargo, podemos observar una tendencia al aumento en el contenido de triglicéridos gonadales en el grupo A30 respecto los demás grupos.

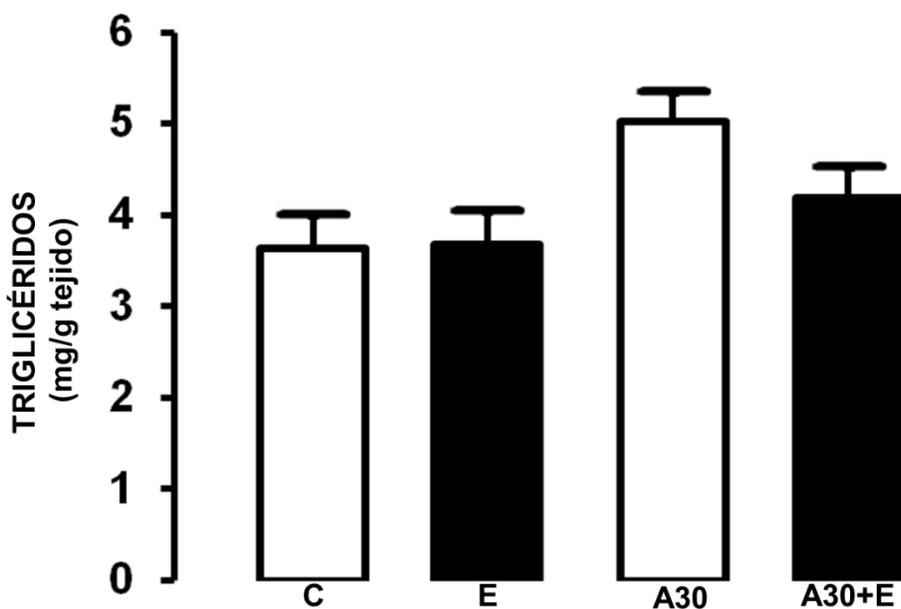


Figura 22. Triglicéridos séricos. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30) y sacarosa al 30% más estrés (A30+E) (n=6-8/grupo).

8.8 Estrés oxidativo

Los dienos conjugados no se modifican (dieta, $F_{1,1,23} = 1.05$; $p > 0.05$; estrés, $F_{1,1,24} = 29.38$; $p > 0.05$; interacción, $F_{1,1,23} = 11.35$; $p > 0.05$; Fig. 23A). El estrés oxidativo (TBARs) no fue afectado por la dieta ($F_{1,1,23} = 1.05$; $p > 0.05$). Sin embargo, el estrés crónico disminuye el estrés oxidativo comparado con los grupos control y A30 ($F_{1,1,23} = 11.35$; $p < 0.01$; Fig. 23B). Por otro lado, los carbonilos no se ven alterados ni por la dieta ($F_{1,1,23} = 0.01$; $p > 0.05$), ni por el estrés ($F_{1,1,23} = 0.06$; $p > 0.05$) ni por la interacción de los factores ($F_{1,1,23} = 0.28$; $p > 0.05$; Fig. 23C).

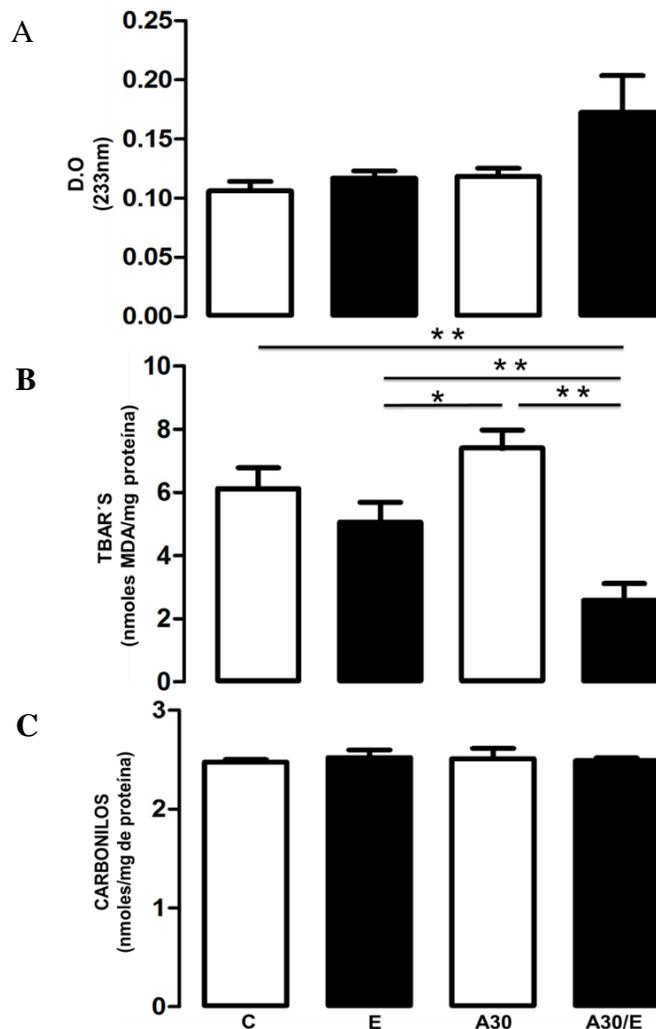


Figura 23. A) DC, B) TBARs, C) CARBONILOS. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA de dos vías y la prueba *pos hoc* de Newman-Keuls. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30) y sacarosa al 30% más estrés (A30+E) (n=6-7/grupo).

9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que todos los animales presentan similar peso corporal. Sin embargo, los grupos que consumieron sacarosa disminuyeron su ingesta de alimento sólido. Estos resultados son parecidos a los reportados por otros autores (Fuente-Martín y cols. 2012). El grupo que consumió sacarosa, aumentó el consumo de agua azucarada y como consecuencia la ingesta calórica se incrementó, sin afectar los niveles de glucosa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores (Velkoska y cols. 2008; Rodrigues y cols. 2009; Fuente-Martín y cols. 2012).

El índice de adiposidad no fue afectado. Estos hallazgos coinciden con otros reportes en roedores donde la ingesta elevada de sacarosa posterior al destete no afecta el peso corporal neonatal. Sin embargo, el peso corporal de estos animales se ve afectado en el período posterior a la pubertad (Velkoska y cols. 2008, Rodrigues y cols. 2009, Fuente-Martín y cols. 2012). Por el contrario, otros autores utilizando una dieta similar reportan una alta acumulación de grasa visceral, debido a que las ratas son adultas al final del estudio (El Hafidi y cols. 2001, 2004, Alexander y cols. 2004, Cervantes-Rodríguez y cols. 2014, Díaz-Aguila y cols. 2016). El estrés crónico por restricción de movimiento induce una reducción en el índice de adiposidad. La reducción de la adiposidad no se observó cuando las ratas expuestas a estrés tuvieron acceso a sacarosa al 30%. Nuestros datos concuerdan con lo reportado en otros modelos de roedores donde el estrés crónico por restricción de movimiento reduce el peso corporal y la grasa visceral (Levin y cols. 2000, Liu y cols. 2014). En este sentido, se sabe que el estrés promueve un aumento de la epinefrina y norepinefrina en tejido adiposo promoviendo la lipogénesis disminuyendo los depósitos de grasa (Vargovic y cols. 2013). Sin embargo, hay trabajos que muestran que el estrés crónico no afecta dichas variables (Nascimento y cols. 2013; Vargovic y cols. 2013; Arcego y cols. 2014; Oliveira y cols. 2014), esto puede deberse al tipo de estrés, el tiempo de exposición y la edad del animal. Con respecto al tejido adiposo gonadal no hay diferencias significativas entre los grupos.

El peso del testículo fue incrementado por la dieta, nuestros datos concuerdan con lo reportado por Shibata y Fukuwatari (2013) donde el peso del testículo aumenta por el consumo elevado de fructosa. Esto puede ser el resultado del contenido de triglicéridos (Naveed y cols. 2014;

Ghorbankhani y cols. 2015). Por otro lado, la pubertad es un periodo crítico para la maduración sexual, el aumento o la disminución del peso testicular puede causar diversos efectos sobre la maduración gonadal en primera instancia y posteriormente sobre la función gonadal. Cabe resaltar que el aumento en el peso testicular ha sido correlacionado con el aumento en las concentraciones de testosterona (Burr y cols. 1970; Mann, 1970; Doehele y Wuttke. 1975; Park Minji y cols.2015). Con respecto al arreglo histológico, encontramos que el número de túbulos no es afectado por la dieta alta en sacarosa ni el estrés crónico por restricción. Sin embargo, el consumo de sacarosa afectó la circunferencia del túbulo, el lumen y el epitelio germinativo. Estos datos concuerdan con los reportados por otros autores, donde una dieta de cafetería induce cambios histomorfométricos en los testículos (Park Minji y cols. 2015). Estos resultados sugieren que el estrés revierte los efectos inducidos por el azúcar. Dado que el grupo de animales que tuvieron una dieta alta en sacarosa y el estrés crónico no se observaron modificaciones morfológicas. En general, una dieta rica en sacarosa puede estimular la captación de glucosa debido a las altas concentraciones, así como la actividad de la PFK1. Por lo tanto, la concentración de lactato intratesticular aumentaría, pero para ser utilizado por las células germinales, el lactato se exporta a través MCT4 (Rato y cols. 2012^a), por lo que la proteína MCT4 también se incrementa lo que sugiere que se estimula la exportación de lactato por las células testiculares y con ello tendríamos un metabolismo acelerado en el testículo lo que daría como resultado un daño en la estructura de dicho órgano, si este proceso se continua, posiblemente afectaría tanto la espermatogénesis como la espermiogénesis lo que afectaría el proceso de maduración de las espermátides y la finalización del desarrollo del túbulo seminífero (Ojeda y cols. 1980; Picut y cols. 2014).

Como se esperaba la corticosterona se incrementó por el estrés crónico por restricción de movimiento. Es bien sabido que el estrés crónico incrementa los niveles de corticosterona en suero (Levin y cols. 2000). Sin embargo, el consumo de sacarosa al 30% durante 4 semanas no afecta los niveles de corticosterona en suero pero es capaz de bloquear el efecto hipercortésolémico inducido por el estrés crónico en ratas macho jóvenes. Dicha modulación en respuesta a estresores por la ingesta de carbohidratos ha sido reportada previamente (Levin y cols. 2000; Macedo y cols. 2012). Las ratas estresadas sometidas a una dieta hipercalórica son

hipo-responsivas al estrés basados en una reducción del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Levin y cols. 2000) y por la disminución en la expresión del RNAm de la CRH en el núcleo paraventricular hipotalámico (Ulrich-Lai et al. 2007). Por lo tanto, podemos sugerir que el aumento de corticosterona inducido por el estrés en esta edad, no afectó histológicamente la gónada. Aunque se ha mostrado en ratas adultas, que el aumento de corticosterona inducido por el estrés crónico reduce la calidad de espermatozoide epididimal, cantidad de espermatozoide y viabilidad, posiblemente por la disminución de la testosterona (Juárez-Rojas et al. 2015), lo que sugiere que una exposición prolongada al estrés en nuestro estudio es necesario (Suárez et al. 1996). En cuanto a los niveles de testosterona, existe discrepancia en la literatura. Algunos autores reportan que los niveles de testosterona disminuyen a medida que la obesidad se agrava, debido al aumento de tejido adiposo y al aumento en los niveles de estradiol, que a su vez causa infertilidad (Bruning y cols. 2000; Pitteloud y cols. 2005; Hagiuda y cols. 2014), mientras que otros autores, indican que las posibles modificaciones tanto en la calidad espermática como en el testículo, principalmente en los túbulos seminíferos, son independientes de las concentraciones de testosterona (Retana-Marquez y cols. 1996; 2003). Ello, debido en parte a que posiblemente el aumento de tejido adiposo no es suficiente para disminuir las cantidades de testosterona (Campos-Silva y cols. 2015) y por otra parte, los cambios en el metabolismo tanto de hidratos de carbono como de triglicéridos en el testículo se ven alterados a causa del aumento en los niveles de testosterona (Cohen, 1997; Campo y cols. 2007), dado que los niveles de transcripción tanto de los transportadores de glucosa (GLUT 1 y GLUT 3) como de los transportadores monocarboxilados (MCT 1 y MCT 4) se alteran (Rato y cols. 2012; Martins y cols. 2013). Sin embargo, nuestros resultados muestran una tendencia positiva al aumento en los niveles de testosterona para el grupo A30, dichos resultados son congruentes con los reportados por Monfared (2011). Se sugiere que dicha tendencia resulta por el incremento en el número de células de Leydig (Amann y cols. 1983; Zirkin y cols. 1980). El estrés crónico no afecta los niveles séricos de leptina, resultados similares a los observados en estudios previos (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Macedo y cols. 2012). Sin embargo, la dieta alta en sacarosa favorece una hiperleptinemia solamente en el grupo que consumió la dieta alta en sacarosa (A30). Estos resultados son consistentes a los observados en animales que reciben dieta hipercalórica (Macedo y cols. 2012) o con alto contenido de grasa (Bruder-Nascimento y

cols. 2013). Estos resultados pueden ser relevantes dado que, la leptina inhibe la esteroidogénesis en la glándula adrenal y en el testículo de dos formas; la primera: disminuyendo la producción de SF-1 factor de transcripción implicado en la inducción de la proteína StAR (Ruiz-Cortes y cols. 2013; Walker y cols. 2004), y que probablemente influya en la síntesis estereidogénica (Shea-Eaton y cols. 2012; Ruiz-Cortes y cols. 2013). La segunda inhibiendo la expresión de la citocromo P450scc y de la citocromo P450c21 esteroide hidroxilasa (Bornstein y cols. 1997), mientras, que los glucocorticoides regulan la expresión del mRNA de gen OB en tejido adiposo, sin conocer claramente dicho mecanismo (Slieker y cols. 1995). Debido a esto, es posible que nosotros no observamos niveles altos de corticosterona en los animales que consumen sacarosa, ni tampoco niveles de leptina alta en los animales estresados, mientras, que la combinación de ambos factores mantienen un equilibrio entre dichas hormonas. Para corroborar dicha información, evidentemente, en nuestro trabajo nos hace falta la parte molecular.

Con respecto al contenido de triglicéridos gonadal, no fueron afectados por la dieta alta en sacarosa ni por el estrés crónico por restricción de movimiento. Sin embargo, la gónada de la rata que consumió azúcar muestra una tendencia a aumentar el contenido de triglicéridos. Dicho aumento posiblemente altere los receptores (GLUT 1 y GLUT 3) como de los transportadores monocarboxilados (MCT 1 y MCT 4) en las gónadas (Padron y cols. 1989) que induce una mayor permeabilidad de la barrera testicular por parte de las células de Sertoli y que facilita el paso de los triglicéridos a las células germinales (Forte y cols. 1981; Maboundou y cols. 1995) e induce un aumento en el peso testicular, daño en la espermatogénesis, baja calidad espermática y alteraciones en los niveles de testosterona (Ergün y cols. 2007; Monfared. 2011). Ruíz-Ramírez y cols., reportó que los niveles elevados de lípidos alteran la expresión de los transportadores de glucosa, como el GLUT 1 y GLUT 3 (Ruíz-Ramírez y cols. 2011). Por lo tanto, estos resultados sugieren que un periodo prolongado de consumo de sacarosa pudiera incrementar el contenido de triglicéridos gonadales.

Como no hubo un aumento en el contenido de triglicéridos gonadales, tampoco se encontró un aumento de estrés oxidativo en la gónada de los animales que consumieron la dieta alta en sacarosa. De manera sorprendente los resultados muestran que el estrés oxidativo fue

disminuido por el estrés crónico, por lo tanto, podríamos sugerir que el estrés, de alguna manera, atenúa el efecto de la sacarosa sobre el estrés oxidativo, esto concuerda con datos reportados por Suárez y Juárez (Suárez y cols. 1996; Juárez y cols. 2015), donde sugieren que aun cuándo una dieta rica en sacarosa aumenta los niveles de triglicéridos en plasma, no causa obesidad, además el estrés parece mejorar la tolerancia del organismo a la elevada ingesta de sacarosa. Ha sido reportado que la exposición prolongado de estrés causa daño oxidativo en muchos tejidos (Caro y cols. 2007; Long y cols. 2008; Sahin y Gumuslu 2007; Zafir y Banu 2009), incluyendo el testículo (Nirupama y cols. 2013; Priya y Reddy 2012). Además, se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) es incrementado en animales expuestas a estrés crónico desde 20 a 50 días (García-Díaz y cols. 2015), lo que sugiere que la corticosterona puede causar un estado redox alterado en el testículo, lo que permite una condición de estrés oxidativo (Nayanatara 2005). La posible relación entre el aumento de corticosterona y el decremento del estrés oxidativo podría estar relacionado con el decremento de la actividad de enzimas antioxidantes, así se presenta un aumento de ROS y daña los lípidos en el testículo, afectando la esteroidogénesis testicular (García-Díaz y cols. 2015).

10. CONCLUSIÓN

En conclusión se sugiere que la presencia de los dos estímulos por un largo periodo podría exacerbar un daño que pudiera afectar la fertilidad. Debido a que ambos estímulos por separado generan un daño, ya sea el estrés que induce un daño metabólico o el consumo de sacarosa que induce a un daño histológico irreversible. Del mismo modo, el aumento de estrés oxidativo en el testículo puede disminuir aún más la fertilidad. Es relevante para nosotros mostrar que el consumo de sacarosa afecta la organización histológica del testículo a pesar de que los niveles de testosterona y de triglicéridos no fueron afectados. Probablemente estas modificaciones histológicas son relevantes para la maduración espermatogénica.

11. GLOSARIO:

Gonocitos o Espermatogónios: Son células troncales o madre a partir de las cuales se generan los gametos al final de la espermatogénesis. Los espermatogónios son células diploides que se dividen por mitosis, ya sea para regenerarse a sí mismos o para producir por especialización celular una serie de células iniciadoras llamadas espermatocitos primarios.

Espermatocitos: Célula germinal masculina que deriva de la espermatogonia y que da lugar a las espermátidas, a partir de las cuales se originan los espermatozoides.

Leptotenos: Los cromosomas individuales se condensan en largos filamentos y se empiezan hacer visibles. Cada uno de ellos está formado por un armazón proteico unido a la envoltura nuclear. En ellos se observan las dos cromátidas estrechamente unidas, que no se distinguen hasta el final de la profase I.

Cigotenos: En esta etapa, los dos cromosomas homólogos de cada pareja se aparean longitudinalmente gen a gen. A este proceso se le denomina sinapsis y se realiza mediante una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico. A cada pareja de cromosomas homólogos apareados se le denomina bivalente o tétrada (contiene 4 cromátidas).

Paquitenos: En este período se produce el sobrecruzamiento, entrecruzamiento o crossing-over entre cromátidas homólogas, es decir cromátidas no hermanas pertenecientes a la misma pareja de cromosomas homólogos. Durante el entrecruzamiento, un fragmento de una cromátida puede separarse e intercambiarse por otro fragmento de su correspondiente homólogo y, como consecuencia, se produce un intercambio de genes o recombinación genética, con ello aumenta la variabilidad.

Prolactina (PRL): Es el nombre que recibe una hormona que segrega la hipófisis. Dicha hormona es liberada por las células lactotropas, que se hallan en la adenohipófisis (el lóbulo anterior de la mencionada glándula). En los hombres, la prolactina está relacionada con funciones de los testículos, las vesículas seminales y la próstata.

Hormona luteinizante (LH): Es una hormona gonadotropina producida por la glándula pituitaria anterior. En los hombres, estimula a las células de Leydig para que produzcan

testosterona (por lo que se conoce también como hormona estimulante de las células intersticiales, ICSH).

Hormona folículo estimulante (FSH): Es una hormona gonadotropina sintetizada y secretada por las células gonadotropas en la glándula pituitaria anterior. La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración en la pubertad y los procesos reproductivos del cuerpo humano. La FSH y la hormona luteinizante (LH) actúan de forma sinérgica en la reproducción.

Testosterona (T): Hormona androgénica producida en los testículos y que desarrolla caracteres masculinos. Estimula la producción de espermatozoides y promueve características sexuales secundarias como un mayor desarrollo muscular, vello facial y corporal.

11. REFERENCIAS

Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hausen CH and Bonde JP. (2008). Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and Sterility* 90:619–626.

Akingbemi BT. (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:51; DOI: 10.1186/1477-7827-3-51.

Alexander AA, Hernandez DG, Lara BM, Angulo G and Oliart RR. (2004). Effects of fish oil on hypertension, LPasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *Journal of Nutrition Biochemistry* 15:350 -357.

Almeida SA, Kempinas WG, Lamano G and Carvalho TL. (2000). Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 1105–1109.

Alves MG, Oliveira PF, Socorro S and Moreira PI. (2012a). Impact of diabetes in blood-testis and blood-brain barriers: resemblances and differences. *Current Diabetes Reviews* 8: 401–412.

Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S and Oliveira PF. (2012b). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Science* 70: 777–793.

Alves MG, Socorro S, Silva J, Barros A, Sousa M, Cavaco JE et al. (2012c). In vitro cultured human Sertoli cells secrete high amounts of acetate that is stimulated by 17 β -estradiol and suppressed by insulin deprivation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 1389–1394.

Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S and Oliveira PF. (2013). Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1832:626-635.

Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R and Ramalho-Santos J. (2006). Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 66: 2056–2067.

Amatruda JM, Harman SM, Pourmotabbed G and Lockwood DH. (1978). Depressed plasma testosterone and fractional binding of testosterone in obese males. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 47: 268-271.

Andrea MI, Massimiliano C, Felice S, Costanzo M, Gaetano F, Aldo I and Andrea F (1999). Leptin and androgens in male obesity: Evidence for Leptin Contribution to Reduce Androgen Levels. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:3673-3680.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M and Jouannet P. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human Reproduction* 16: 2710–2717.

Bauche F, Fouchard MH and Jegou B. (1994). Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters* 349: 392–396.

Barat P, Gayard-Cros M, Andrew R, Corcuff JB, Jouret B, Barthe N, Perez P, Germain C, Tauber M, Walker BR, Mormede P and Duclos M. 2007. Truncal distribution of fat mass, metabolic profile and hypothalamic-pituitary adrenal axis activity in prepubertal obese children. *The Journal of Pediatrics* 150:535-539.

Barquera S, Hernandez-Barrera L, Tolentino-Mayo ML, Espinosa J, Ng SW, Rivera JA and Popkin B. (2008). Dynamics of adolescent and adult beverage intake patterns in Mexico. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:461-464.

Barrow PC, Barbellion S and Stadler J. (2011). Preclinical evaluation of juvenile toxicity. *Methods in Molecular Biology* 691: 17–35.

Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Diaz-Torga GS and Libertun C. (1992). Ontogenic studies of the neural control of adenohipophyseal hormones in the rat. II. Prolactin. *Cellular and Molecular Neurobiology* 12: 1–19.

Berndtson WE and Thompson TL. (1990). Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague Dawley rats. *Journal of Andrology* 11: 429–35.

Boussouar F and Benahmed M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology Metabolism* 15: 345–350.

Bjorntorp P. (2001) Do stress reaction cause abdominal obesity and comorbidities? *Obesity Reviews* 2:73-86.

Bleisch VR, Mayer J and Dickie MM. (1952). Familial diabetes mellitus in mice associated with insulin resistance, obesity and hyperplasia of the islands of Langerhans. *American Journal of Pathology* 28: 369-385.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D and Kahn CR. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.

Carla Fernández, Fernanda FB, Glaura SA, Juliana EP, Ana Paula AF, André FN, Antonio CC and Wilma DG. (2011). Diet-Induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:32, DOI: 10.1186/1477-7827-9-32.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N and Skakkebaek NE. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 305:609-613.

Chaloupka FJ, Wang CY, Powell ML, Andreyeva T, Chriqui EJ and Rimkus ML. (2011). Estimating the potential of taxes on sugar-sweetened beverages to reduce consumption and generate revenue. *Preventive Medicine* 52: 413-6.

Charmandari E, Tsigos C and Chrousos GP. (2005). Endocrinology of the stress response. *The Annual Review of Physiology* 67: 259–284.

Chemes HE, Podesta E and Rivarola MA. (1976). Action of testosterone, dihydrotestosterone and 5alpha androstane 3alpha, 17beta diol on the spermatogenesis of immature rats. *Biology of Reproduction* 14: 332–38.

Chen Y, Wang Q and Wang FF. (2012). Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. *Stress: The International Journal on the Biology of the Stress* 15:74-84.

Chen YI, Payne AH and Kelch RP. (1976). FSH stimulation of Leydig cell function in the hypophysectomized immature rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 153: 473–75.

Cheng CY and Mruk DD. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews* 64: 16–64.

Chrousos GP and Gold PW. (1998). A healthy body in a healthy mind-and vice versa-the damaging power of uncontrollable stress. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 83: 1842-5.

Chrousos GP. (2007). Organization and integration of the endocrine system. *Sleep Medicine Clinics* 2, 125–145.

Collodel G, Moretti E, Fontani V, Rinaldi S, Aravagli L, Saragò G, Capitani S and Anichini C. (2008). Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian Journal of Medical Research* 128: 254–261.

Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Soto-Rodríguez I, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Castelán F, Rodríguez-Antolín J and Nicolás-Toledo L. (2015). High Sucrose Intake Ameliorates the Accumulation of Hepatic Triacylglycerol Promoted by Restraint Stress in Young Rats. *Lipids* 50: 1103 – 1113. DOI 10.1007/s11745-015-4066-0.

Corona G, Mannucci E, Schulman, Schulman C, Petrone L, Mansani R, Cilotti A, Balercia G, Chiarini V, Forti G and Maggi M. (2006). Psychobiologic Correlates of the Metabolic Syndrome and Associated Sexual Dysfunction. *European Urology*. 50:595-604.

Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R and Badaru A (2014). Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *The Journal of the American Medical Association*. 311:1778-1786.

Desjardins C. (1978). Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *Journal of Animal Science* 47: 56–79.

Diaz-Aguila Y, Castelán F, Cuevas E, Zambrano E, Martínez-Gómez M, Muñoz A, Rodríguez-Antolín J and Nicolás-Toledo L. (2016). Consumption of sucrose from infancy increases the visceral fat accumulation, concentration of triglycerides, insulin and leptin, and generates abnormalities in the adrenal gland. *Anatomical Science International* 91: 151-62.

Dohler KD and Wuttke W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898–907.

Eccles WA, Long MS, Eng FRCS. (1902). Anatomy, physiology and pathology of the imperfectly descended testes. *The British Medical Journal* 2168: 570-578.

El Hafidi M, Cuellar A, Ramírez J and Baños G. (2001). Effect of sucrosa addition to the drink water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal $\Omega 9$ and $\Omega 5$ –desaturase activity. *Journal of Nutrition Biochemistry* 12:65-71.

Elvira Estrada Flores. (2002). Atlas de Histología de Vertebrados UNAM, 1era Edición. Pp 133-147.

ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición). (2012).

Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B and Sahin S. (2012). The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Actas Urológicas Españolas* 36: 153-159.

Euromonitor International. (2009). Who drinks what: identifying international drinks consumption trends. *Euromonitor International*. 1-101.

Fernandez CD, Bellentani FF, Fernández GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC and Kempinas WD. (2011). Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 32.

Filler R. (1993). Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology. In: Male reproductive toxicology (R. E. Chapin and J. Heindel, Eds) 93: 334-343. Academic Press, San Diego, CA.

Fowden AL, Giussani DA and Forhead AJ. (2005). Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Human Development* 81:723-734.

Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S and Ishii T. (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology* 5: 231–242.

Fukuda M, Fukuda K, Shimizu T, Yomura W and Shimizu S. (1996). Kobe earthquake and reduced sperm motility. *Human Reproduction: Oxford Journals* 11: 1244–1246.

Gaytan F, Lucena MC, Muñoz E and Paniagua R. (1986). Morphometric aspects of rat testis development. *Journal of Anatomy* 145: 155–59.

G. Corona, E Mannucib, R Mansania, L Petronea, M Bartolinic, R Giommid, G Fortia and M Maggia. (2004). Organic, Relational and Psychological Factors in Erectile Dysfunction in Men with Diabetes Mellitus. *European Urology* 46: 222–228.

Guerrero-Bosgna C and Skinner Michael K. (2014). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Current Opinion in Genetics and Development.* 26: 79-88.

Giagulli VA, Kaufman JM and Vermeulen A. (1994). Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 997-1000.

Gore AC, Attardi B and De Franco DB. (2006). Glucocorticoid repression of the reproductive axis: effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Molecular and Cellular Endocrinology* 256: 40–48.

Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK and Ali K. (2003). Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biology of Reproduction* 68:2081-2091.

Gerra G, Zaimovic A, Zambelli U, Timpano M, Reali N, Bernasconi F and Brambilla F. (2000). Neuroendocrine responses to psychological stress in adolescents with anxiety disorder. *Neuropsychobiology Journal.* 42:82-92.

Haffner SM, Valdez RA, Stern MP and Katz MS. (1993). Obesity, body fat distribution and sex hormones in men. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 17:643-649.

Hagiuda J, Ishikawa H, Furuuchi T, Hanawa Y and Marumo K. (2014). Relationship between dyslipidemia and semen quality and serum sex hormone levels: an infertility study of 176 Japanese patients. *First International Journal of Andrología* 46: 131-135.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW and Carrell DT. (2008a). Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertility and Sterility* 90:897–904.

Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT and Meikle AW. (2008b). Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertility and Sterility* 90:2222–2225.

Hari Priya P and Reddy PS.(2012). Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. *Journal of the Experimental Zoology Part A* 317: 455–465.

Herman–Oron M, Kamari Y, Grossman E, Yeager G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A and Sharabi Y. (2008). Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *American Journal of Hypertension* 21:1018-1022.

Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel-D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG and Mostafa T. (2010). Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertility and Sterility* 94:581-584.

Hoppe PC. (1976). Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biology of Reproduction* 15: 39–45.

Huckins C and Clermont Y. (1968). Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Archives d’anatomie, d’histologie et d’embryologie normales et expérimentales* 51: 341–54.

Hjollund NHI, Bonde JPE, Henriksen TB, Giwercman A and Olsen J. (2004). The Danish First Pregnancy L Paneer Study Team. Reproductive effects of male psychologic stress. *The Journal of Clinical Epidemiology* 15: 21–27.

Ichiyanagi K, Li Y, Watanabe T, Ichiyanagi T, Fukuda K, Kitayama J, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Yabuta Y, Seki Y, Saitou M and Sasaki H. (2011). Locus- and domain- dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. *Genome Research* 21:2058-2066.

Isasi CR, Parrinello CM, Jung MM, Carnethon MR, Birnbaum-Weitzman O, Espinoza RA, Penedo FJ, Perreira KM, Schneiderman N, Sotres- Alvarez D, Van Horn L and Gallo LC. (2015). Psychosocial stress is associated with obesity and diet quality in Hispanic/Latino adults. *Annals of Epidemiology* 25: 84-89.

Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A and Fabbri A. (1999). Leptin and androgens in male obesity evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *The Journal and Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 3673–3680.

Jayo JM, Shively CA, Kaplan JR and Manuck SB. (1993). Effects of exercise and stress on body fat distribution in male cynomolgus monkeys. *The International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 17: 597-604.

Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH and Skakkebaek NE. (2004). Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and Sterility* 82:863-870.

Juarez-Rojas L, García-Lorenzana M, Aragón-Martínez A, Gómez-Quíroz LE and Retana-Márquez Medel S. (2015). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 61: 211-21.

Kahn BB and Flier SJ. (2000). Obesity and insulin resistance. *The journal of clinical investigation* 106: 473-481.

Kaufman JM and Vermeulen A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocrine Reviews* 26:833–836.

Ketelslegers JM, Hetzel WD, Sherins RJ and Catt KJ. (1978). Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: Plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology* 103: 212–22.

Kim JM, Ghosh SR, Weil AC and Zirkin BR. (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Journal of Endocrinology* 142, 3809–3816.

Korenbrott CC, Huhtaniemi IT and Weiner RI. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction* 17: 298–303.

Kley HK, Deseleares T, Peerenboom H and Kruskemper HL. (1980). Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51:1128-1132.

Kyrou I and Tsigos C. (2008). Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones* 7: 287-293.

Lee VW, de Kretser DM, Hudson B and Wang C. (1975). Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility* 42: 121–6.

Lenzi A, Lombardo F, Salacone P, Gandinin L and Jannini EA. (2003). Stress, sexual dysfunctions, and male infertility. *Journal of Endocrinology Investigation* 26: 72–76.

Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ and Seckl JR. (1996). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 39: 1299-305.

Lichtenstein MJ, Yarnell JWG, Elwood PC, Beswick AD, Sweetnam PM, Marks V, Teale D and Riad-Fahmy D. (1987). Sex hormones, insulin, lipids, and prevalent ischemic heart disease. *American Journal of Epidemiology* 126: 647–657.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W and Torres IL. (2012). Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38:189-96.

Mallidis C, Green B, Rogers D, Agbaje I, Hollis J, Migaud M et al. (2009). Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin induced type 1 diabetes mellitus. *International Journal of Andrology* 32: 156–165.

Marques DS, Gombar FV, Alves Pereira JL, Barcellos-Sampaio FJ and Da Fonte Ramos C. (2010). Metabolic programming of lipid profile and reproductive organs weight by leptin treatment on early life. *Acta Cirúrgica Brasileira* 46:131-5.

Marseglia Lucia, Sara Manti, Gabriella D'Angelo, Antonio Nicotera , Eleonora Parisi, Gabriella Di Rosa, Eloisa Gitto and Teresa Arrigo. (2015). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International Journal of Molecular Science* 16: 378-400.

Martini L, Celotti F, Massa R and Motta M. (1978). Studies on the mode of action of androgens in the neuroendocrine tissues. *Journal of Steroid Biochemistry* 9: 411–17.

McNeilly AS, de Kretser DM and Sharpe RM. (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. *Biology of Reproduction* 21: 141–47.

M. Kjaergaard, C. Nilsson, A. Rosendal, M.O. Nielsen and K. Raun. (2014). Maternal Chocolate And Sucrose Soft Drink Intake Induces Hepatic Steatosis In Rat Offspring Associated With Altered Lipid Gene Expression Profile. *Acta Physiological Scandinavica* 210: 142-153.

Negro-Vilar A, Krulich L and McCann SM. (1973). Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology* 93: 660–64.

Nirupama M, Devaki M, Nirupama R and Yajurvedi HN. (2012). Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *The Journal of Physiology and Biochemistry* 69: 59–68.

Nseir W, Nassar F and Assy N. (2010). Soft drinks consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 21: 2579-2588

Nohara K, Liu S, Meyers MS, Waget A, Ferron M and Karsenty G. (2013). Developmental androgen excess disrupts reproduction and energy homeostasis in adult male mice. *Journal of Endocrinology* 219:259-68.

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A and Seckl JR. (1998). Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *The Journal of Clinical Investigation* 101: 2174-81.

Ojeda SR, Advis JP and Andrews WW. (1980). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proceedings Journal* 39: 2365–71.

Ojeda SR and Skinner MK. (2006). Puberty in the rat. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (J. D. Neill, T. M. Plant, D. W. Pfaff, J. R. G. Challis, D. M. de Kretser, J. S. Richards, and P. M. Wassarman, eds.). Vol. 2, 3rd ed., pp. 2061–126.

Oliva A, Spira A and Multigner L. (2001). Contribution of environmental factors the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16:1768-1776.

Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cardenas M, Tovar A, Perera –Marín G and Ulloa-Aguirre A. (2010). Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *General and Comparative Endocrinology* 166:356-364.

Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Laurentino S, Silva J, Sa R et al. (2012). Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820: 84–89.

Oliver G and Wardle J. (1999). Perceived effects of stress on food choice. *Physiological Behavior* 66:511-515.

Orth JM. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *The Anatomical Record* 203: 485–92.

Ozanne SE and Hales CN. (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:368-73.

Pasquali R, Patton L and Gambineri A. (2007). *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. *Obesity and infertility* 14:482-487.

Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Melchionda N, Labate AMM, Fabbri E, Capelli M and Bortoluzzi L. (1991). Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 40:101–104.

Pauli EM, Legros RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC and Lee PA. (2008). Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertility and Sterility* 90: 346-351.

Pérez-Sánchez E. (2011). Restricción proteínica en la rata madre gestante: consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la progenie que en su etapa adulta consume cantidades elevadas de carbohidratos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala 3-60.

Pérez-Torres I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E and Baños G. (2009). Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome: Influence of gender. *Free Radical Research* 43: 761-771.

Pervanidou P and Chrousos GP (2011). Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. *International Journal of Pediatric Obesity* 1: 21-8.

Pervanidou P and Chrousos GP (2012). Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* 61:611-619.

Picut CA, Remick AK, de Rijk EPCT, Simons ML, Stump DG and Parker GA. (2014). Postnatal development of the testis in the rat: I. Morphologic study and II. Correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic Pathology* 20: 1 – 17.

Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, Hardin M, Lee H, Eriksson KF, Tripathy D, Groop L, Yialamas M, Elahi D and Hayes FJ. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care* 28:1636-42.

Potemina TE. (2008). Impairment of spermatogenesis in male rats during stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 145: 700–702.

Qin D, Yuan W, Zhou W, Cui Y, Wu J and Gao E. (2007). Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian Journal of Andrology* 9: 827–834.

Rai J, Pandey SN and Srivastava RK. (2003). Effect of immobilization stress on spermatogenesis of albino rats. *Journal of the Anatomical Society of India* 52: 55–57.

Rajender S, Avery K and Agarwal A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 727: 62-71.

Rato L, Alves M, Socorro S, Carvalho RA, Cavaco JE and Oliveira PF. (2012a). Metabolic modulation induced by Estradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. *Bioscience Reports* 32: 61–69.

Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE and Oliveira PF. (2012b). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews of Urology* 9: 330–338.

Retana-Márquez S, Domínguez-Salazar E and Velázquez-Moctezuma J. (1996). Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 21, 39–50.

Rey Rodolfo. (2001). Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. *Revista chilena de anatomía*, 19:75-82.

Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM and Willet WC. (2000). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Publica México* 50:172-194.

Rossi P and Dolci S. (2013). Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 4, 181.

Santos Marques D, Meireles Gombar F, Alves Pereira JL, Barcellos Sampaio FJ and Da Fonte Ramos C. (2010). Metabolic programming of lipid profile and reproductive organs weight by leptin treatment on early life. *Experimental Urology: Acta Cirúrgica Brasileira*. 25:55-58.

Sanjay S. Kasturi, Justin Tannir and Robert E. Brannigan. (2008). The metabolic syndrome and review male infertility. *Journal of Andrology* 29: 251 – 259.

Seidell JC, Bjorntop P, Sjostrom L, Kvist H and Sannerstedt R. (1990). Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* 39:897–901.

Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 6: 117–231.

Setchell BP and Hinks NT. (1967). The importance of glucose in the oxidative metabolism of the testis of the conscious ram and the role of the pentose cycle. *Biochemistry Journal* 102: 623–630.

Seung WA, Gil-Tae G, Yong DK, Ryun-Sup A, Robert AH, Chul-Ho and Hueng-Sik C. (2013). Insuline Directly Regulates Steroidogenesis Via Induction Of The Orphan Nuclear Receptor DAX-1 in Testicular Leydig Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 15937-15946.

Simon D, Preziosi P, Barrett-Connor E, Roger M, Saint-Paul M, Nahoul K and Papoz L. (1992). Interrelationship between plasma testosterone and plasma insulin in healthy adult men: the Telecom Study. *Diabetologia* 35: 173–177.

Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R and Ertel NH. (1979). Increased estrogen production in obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 48: 633-638.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C and Fisher JS. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769–84.

Sheiner EK, Shiner E, Hammen R, Potashnik G and Carel R. 2003. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Industrial Health* 41: 55–62.

Shively CA and Clarkson TB. (1988). Regional obesity and coronary artery atherosclerosis in females: a non-human primate model. *Acta Medica Scandinavica: Supplementum* 723: 71-8.

Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F and Patel MS. (2003). Programming of Islet Functions in the Progeny of Hyperinsulinemic/Obese Rats. *Diabetes* 52: 984–90.

Strain GW, Zumooff B, Kream J, Strain JJ, Deucher R, Rosenfeld RS, Levin J and Fukushima DK. (1982). Mild Hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism* 31: 871-875.

Stoker TE, Parks LG, Gray LE and Cooper RL. (2000). Endocrine disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. Critical Reviews in Toxicology* 30: 197–252.

Stoker TE, Robinette CL, Britt BH, Laws SC and Cooper RL. (1999). Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat: Effects on the adult prostate. *Biology of Reproduction* 61: 1636–43.

Suárez M, Fiol de Cuneo M, Vincenti L and Ruiz RD. (1996). Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 104: 351-6.

Swerdloff RS and Walsh PC. (1973). Testosterone and oestradiol suppression of LH and FSH in adult male rats: Duration of castration, duration of treatment and combined treatment. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 73: 11–21.

Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI and Moran TH. (2009). Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58:1116–1125.

Tamashiro KL. (2011). Metabolic syndrome: links to social stress and socioeconomic status. *Annals of the New York Academy of Sciences*. *Diabetes* 1231:46–55.

Takafumi S, Michiaki F, Hiroshi O, Yusuke M, Masahiro Y, Muneo T, Goji H, Jo K, Hiroshi O and Naoto N. (2013). Testosterone deficiency induces markedly decreased serum triglycerides, increased small dense LDL, and hepatic steatosis mediated by dysregulation of lipid assembly and secretion in mice fed a high-fat diet. *Metabolism Clinical and Experimental* 62:851–860.

Tchernof A, Desre's JP, Be' langer A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, Lupien PJ and Labrie F. (1995). Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism* 44:513–519.

Torres SJ and Nowson CA. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23: 887–894.

Tsai EC, Matsumoto AM, Fujimoto WY and Boyko EJ. (2004). Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care* 27: 861–868.

Tsuchiya T and Horii I. (1995a). Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology* 20:95–102.

Tsuchiya T and Horii I. (1995b). Immobilization-induced stress decreases lipogenesis in sebaceous glands as well as plasma testosterone levels in male syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology* 20:221–230.

Tuner TT and Lysiak JJ. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 29: 488–498.

Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, Van Hooren DC, Figueiredo HF, Mueller NK, Choi DC, Herman JP. (2007). Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 148: 1823–1834.

Vanaelst B, De Vriendt T, Huybrechts I, Rinaldi S and De Henauw S. (2012). Epidemiological approaches to measure childhood stress. *Pediatric and Perinatal Epidemiology* 26:280-297.

Vigueras-Villaseñor RM , Rojas–Castañeda JC, Chávez–Saldaña M, Gutiérrez–Pérez O, García–Cruz ME, Cuevas–AlpucheO, Reyes–Romero MM and Zambrano E. (2011). Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica* 113: 214-220.

Wingfield JC and Sapolsky RM. (2003). Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 711–724.

Witorsch RJ and Kitay JI. (1972). Pituitary hormones affecting adrenal 5 alpha-reductase activity: ACTH, growth hormone, and prolactin. *Endocrinology* 91: 764–69.

Whirledge S and Cidlowski JA. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica* 35:109–125.

World Health Organization. Obesity and overweight. Fact Sheet 2006; N8311.

Zumoff B, Strain GW, Miller LK, Rosner W, Senie R, Seres DS and Rosenfeld RS. (1990). Plasma Free and non-sex-hormone-binding-globulin-boundtestosterone are decreased in obese men in proportion to their degree of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71: 929-931.

12. PUBLICACIONES



XL REUNIÓN ANUAL

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

Del 20 al 23 de Mayo
de 2015 Hotel Emporio,
Ixtapa, Guerrero.

El consumo elevado de sacarosa modifica el arreglo histológico gonadal y los niveles séricos de leptina y testosterona en ratas infantiles.

De León Ramírez Yeimy Mar¹, Morimoto S², Corona-Pérez A³, Díaz-Aguilar Y³,
Martínez-Gómez M^{4,5}, Rodríguez-Antolín J⁴, Nicolás L⁴.

¹ Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

² Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México DF, México.

³ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

⁴ Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

⁵ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

En humanos, con sobrepeso y/o obesidad, se ha reportado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad y baja concentración de testosterona. Por otro lado, la deficiencia en la producción de andrógenos testicular está relacionada con la cantidad de grasa corporal y los niveles de leptina. En modelos animales, se ha mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, incrementa las concentraciones de leptina y disminuye la testosterona, promoviendo diferencias histológicas en túbulos seminíferos, afectando la fertilidad, además los niveles de FSH y LH aumentan cuando las ratas reciben 10 y 30 µg/kg de leptina e induce estrés oxidativo y anomalías anatómicas en el espermatozoide. Sin embargo, no está claro el papel de la leptina en la reproducción, además, no hay trabajos donde se evalué el efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre la concentración de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas jóvenes. Metodología: Ratas machos Wistar de 21 días de edad (n=16) fueron divididas en dos grupos experimentales: ratas que consumieron agua simple (C) y ratas que consumieron agua azucarada al 30% (S30) durante un mes. Al final del periodo experimental, se midió la glucosa. Inmediatamente las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se extrajo y pesaron los testículos y el tejido adiposo total. El testículo derecho fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplást. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los niveles de leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante la prueba Student-t. Resultados preliminares: Las ratas que consumieron agua azucarada muestran aumento en los niveles de leptina y en el peso testicular, acompañado de modificaciones histológicas en el citoplasma, epitelio germinativo y lumen. Por otro lado, los datos indican una tendencia en aumentar los niveles de testosterona. Conclusiones: El presente estudio muestra que el consumo de una dieta rica en sacarosa, modifica el arreglo histológico gonadal y posiblemente aumenta los niveles de testosterona durante la infancia a diferencia de lo que se ha reportado en edad adulta y con dieta alta en grasa.

Financiamiento: CONACYT a YMDLR (631998)



LVIII CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
6-10 de septiembre, San Miguel de Allende, Gto.

www.smcf.org.mx

1Maestría en Ciencias Biológicas, UAT

2Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ

3Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT

4Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La sacarosa pero no el estrés inducen cambios histológicos del testículo en ratas infantiles

De León Ramírez Yeimy Mar (Estudiante de Posgrado) ¹, Sumiko Morimoto Lidya ², Martínez Gómez Margarita ^{3,4}, Rodríguez Antolín Jorge ³, Nicolás Toledo Leticia ³

El aumento de corticosterona durante el estrés afecta la función gonadal, por otro lado, la corticosterona ha sido asociada con el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. En pacientes con sobrepeso u obesidad se ha encontrado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad y bajos niveles de testosterona. En modelos animales se ha mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, incrementa las concentraciones de leptina y disminuye la testosterona, promoviendo diferencias histológicas en los túbulos seminífero, afectando la fertilidad. Sin embargo, no ha sido evaluado el efecto del estrés y una dieta alta en sacarosa sobre los niveles de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas infantiles. Ratas machos wistar de 21 días de edad (n=32) divididas en cuatro grupos experimentales: ratas que consumen agua simple (C), agua simple + estrés (E), agua azucarada 30% (A30) y agua azucarada + estrés (A30/E). Los animales fueron sometidos a estrés crónico mediante restricción durante 1 hora diaria, 5 veces a la semana por cuatro semanas. Al sacrificio fueron extraídos y pesados el tejido adiposo y testículos para su análisis histológico. La concentración de corticosterona, leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y Newman-Keuls como prueba post hoc. Los animales S30 mostraron aumento en los niveles de leptina y peso testicular y lumen por lo que disminuye el epitelio germinativo sin afectar el tejido adiposo gonadal y los niveles de testosterona. El presente estudio muestra que una dieta rica en sacarosa afecta los componentes histológicos del testículo sin que la corticosterona afecte el arreglo testicular. CONACYT a YMDLR (331678)



**XLI Reunión Anual
Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A. C.
Tequisquiapan, Querétaro
Mayo 22 al 25, 2016**

12. EL CONSUMO DE AGUA AZUCARADA Y EL ESTRÉS SE RELACIONAN CON CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL TESTÍCULO EN LA RATA AL DESTETE.

De León Ramírez Yeimy Mar (Estudiante de Posgrado) ¹, Castelán Francisco^{2,3}, Morimoto Sumiko ⁴, Martínez Gómez Margarita^{2,3}, Rodríguez Antolín Jorge³, Nicolás Toledo Leticia³

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

³Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

⁴Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México DF, México

La infancia es un periodo de continuo crecimiento y desarrollo, donde factores ambientales como la dieta y el estrés, pueden tener efectos a largo plazo sobre el metabolismo y la reproducción. La exposición a eventos estresantes a edades tempranas favorece la secreción crónica de glucocorticoides afectando el arreglo histológico testicular. El aumento de corticosterona inducido por el estrés afecta la función gonadal, por otro lado, la corticosterona ha sido asociada con el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. En pacientes con sobrepeso u obesidad se ha encontrado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad y bajos niveles de testosterona. En modelos animales se ha mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, incrementa las concentraciones de leptina y disminuye la testosterona, promoviendo diferencias histológicas en los túbulos seminífero, afectando la fertilidad. Sin embargo, no ha sido evaluado el efecto del estrés y una dieta alta en sacarosa sobre los niveles de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas al destete. Ratas machos Wistar de 21 días de edad (n=32) divididas en cuatro grupos experimentales: ratas que consumen agua simple (C), agua simple + estrés (E), agua azucarada 30% (A30) y agua azucarada + estrés (A30/E). Los animales fueron sometidos a estrés crónico mediante restricción durante 1 hora diaria, 5 veces a la semana por cuatro semanas. Al sacrificio los testículos fueron extraídos y pesados para su análisis histológico. La concentración de corticosterona, leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y Newman-Keuls como prueba post hoc. Los animales A30 mostraron aumento en los niveles de leptina. Además, un aumento en el peso testicular, en el diámetro del lumen y una disminución en el epitelio germinativo. Los niveles de testosterona sanguínea y triglicérido gonadal no se modifican. El presente estudio muestra que una dieta rica en sacarosa a una temprana edad tiene un mayor impacto sobre el arreglo testicular y que la presencia de la corticosterona inducida por el estrés no afecta el arreglo testicular. CONACYT a YMDLR (331678) M



Cambios en la histología gonadal y el estrés oxidativo inducido por consumo elevado de sacarosa

De León Ramírez Yeimy Mar (Estudiante de Posgrado) ¹, Sumiko Morimoto Lidya ², Martínez Gómez Margarita ^{3,4}, Rodríguez Antolín Jorge ³, Nicolás Toledo Leticia ³

1Maestría en Ciencias Biológicas, UAT

2Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ

3Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT

4Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Estudios epidemiológicos han asociado la acumulación de grasa visceral con el estrés oxidativo. En pacientes con sobrepeso u obesidad se ha asociado el aumento en los niveles de triglicéridos con una disminución de la libido, disfunción eréctil y bajos niveles de testosterona afectando la fertilidad. Por otro lado, el estrés oxidativo provoca daño en las células de Sertoli, que resulta en una alteración en la espermatogénesis y alteraciones en la calidad espermática, esto podría ser asociado a la disfunción eréctil. En ratas adultas se ha mostrado que una dieta alta en grasa aumenta los niveles de triglicéridos con un aumento de las reacciones pro-oxidantes, disminuye los niveles de testosterona, induciendo diferencias histológicas en los túbulos seminíferos, afectando la fertilidad. Sin embargo, una dieta rica en carbohidratos incrementa la síntesis de *novo* de ácidos grasos y estrés oxidativo en hígado, un aumento en la concentración sérica de triglicéridos y una disminución en la concentración de testosterona. Pero se desconoce su efecto sobre el arreglo histológico gonadal. Para estudiarlo, utilizamos ratas machos Wistar de 21 días de edad (n=8/grupo): ratas que consumen agua simple (C) y agua azucarada 30% (A30) durante un mes. Al sacrificio se extraen los testículos para el análisis histológico, determinación de triglicéridos y estrés oxidativo. La concentración de testosterona se midió por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante una *t*-student. Los animales A30 mostraron un aumento del peso testicular y diámetro del lumen con una disminución del epitelio germinativo, sin afectar, la concentración de testosterona ni los niveles de triglicéridos gonadales. Sin embargo, se induce estrés oxidativo. El presente estudio sugiere que el consumo elevado de sacarosa afecta el arreglo histológico y el estrés oxidativo gonadal.

CONACYT a YMDLR (331678)

