



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del estrés crónico variable sobre el arreglo  
histológico e inflamación testicular y estrés  
oxidativo espermático epididimal en ratas jóvenes  
adultas

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño

Directora: Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2023





**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del estrés crónico variable sobre el arreglo  
histológico e inflamación testicular y estrés  
oxidativo espermático epididimal en ratas jóvenes  
adultas

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño

**Comité Tutorial**

Director: Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tutores: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Dra. Yeimy Mar De León Ramírez

## **Financiamiento**

Este proyecto se realizó con el apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante una beca, cuya clave es 802284. Realizado 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. La maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC). Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido al proyecto de investigación (287762) de la Dra. Leticia Nicolás Toledo.



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño 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 “Efecto del estrés crónico variable sobre el arreglo histológico e inflamación testicular y estrés oxidativo espermático epididimal en ratas jóvenes adultas”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
TLAXCALA, TLAX., A 25 DE AGOSTO DEL 2023

DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO

DRA. LETICIA NICOLAS TOLEDO

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. YEIMY MAR DE LEÓN RAMÍREZ

## Oficio de autorización del comité de bioética

### COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis titulada “Efecto del estrés crónico variable sobre el arreglo histológico e inflamación testicular y estrés oxidativo espermático epididimal en ratas jóvenes adultas” realizada por la estudiante Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño para optar por su grado de Maestra en Ciencias Biológicas.

El documento de la tesis de Vanessa Guadalupe Nolasco Garduño fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de agosto, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (10%). Los textos detectados con similitud están marcados en palabras técnica comúnmente utilizadas en la metodología, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

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

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE  
Tlaxcala, Tlax., a 23 de agosto de 2023



Dra. Leticia Nicolás Toledo  
Directora de tesis

## **Agradecimientos**

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por darme la oportunidad de ser parte del posgrado, por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto en sus instalaciones y al cuerpo académico que lo conforma.

Al apoyo otorgado por CONACyT con la beca (802284) que permitió el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo perteneciente al cuerpo académico de este posgrado, por haberme permitido ser parte de su grupo de investigación durante este tiempo, su dedicación y exigencia en este trabajo y sobre todo para mi desarrollo profesional. Muchas gracias Dra. Lety.

A mi comité: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y Dra. Yeimy Mar de León Ramírez, gracias por el tiempo y dedicación que le dieron a la evaluación de este trabajo durante todas sus etapas, cada comentario, corrección y crítica fueron importantes para nutrir y mejorar este estudio.

## **Agradecimientos personales**



**Dedicado a...**

## Resumen

La infertilidad se ha definido como una problemática médica y social que afecta al 15% de parejas en el mundo, el hombre es considerado como factor único del problema en un 50% de los casos. Existen múltiples factores que pueden generar infertilidad masculina, entre ellos, el estrés crónico. Los estímulos estresores activan el eje hipotálamo hipófisis adrenal, que sintetiza corticosterona en ratas y cortisol en humanos. Sin embargo, la corticosterona no es la única hormona que aumenta ante un evento estresante. En ratas jóvenes hemos mostrado que la aldosterona aumenta con el estrés crónico, no así la corticosterona. Se desconocen los efectos del estrés crónico variable sobre la organización histológica e inflamación testicular y el estrés oxidativo espermático. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar si el estrés crónico variable afecta la actividad de enzimas antioxidantes epididimales, la organización histológica e inflamación testicular, y con ello, evaluar sus efectos sobre la calidad espermática y las concentraciones de testosterona en ratas jóvenes. Se distribuyeron 14 ratas machos Wistar de 21 días de edad, en dos grupos: control (C) y estrés crónico variable (ECV), los cuales tuvieron acceso libre a agua simple y dieta Chow 5001 purina. A los 51 días de edad fue aplicado el estrés crónico durante 4 semanas, éste consistió en exponer a la rata a 5 diferentes tipos de estrés en diferentes horarios: reducción del espacio con caja limpia (5 horas), nado forzado en agua caliente (28 °C/ 10 min), reducción del espacio con caja sucia (5 horas), nado forzado en agua fría (18 °C/ 10 min) y restricción (3 horas). Al día 81 de edad los animales fueron sacrificados, se evaluó la calidad espermática, la medición de testosterona y se obtuvo el testículo izquierdo para la evaluación histológica. Para el estrés oxidativo se evaluaron SOD, CAT y TBARS. Se realizó un Western Blot para la semicuantificación de TNF- $\alpha$  en tejido testicular. Todos los datos se evaluaron mediante una t de student. En el análisis histológico no hubo cambios en ninguno de los parámetros evaluados. En el grupo ECV, disminuyó la concentración de testosterona sérica, la concentración espermática, movilidad, viabilidad y cambios en la morfología espermática comparado al grupo control. La expresión de TNF- $\alpha$  fue mayor en el grupo ECV tanto en la inmunohistoquímica como en la semicuantificación con Western Blot. Las enzimas antioxidantes como CAT y SOD así como TBARS, fueron disminuidas en el grupo de ECV con respecto al control. En conclusión, el estrés crónico altera la calidad espermática, el estado antioxidante en el epidídimo y la generación de inflamación testicular, el cual puede influir en la fertilidad masculina.

## Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Anatomía y celularidad testicular</b> .....	2
<b>1.2 Fisiología del testículo</b> .....	7
<b>1.2.1 Esteroidogénesis</b> .....	7
<b>1.2.2 Espermatogénesis</b> .....	8
<b>1.3 Estrés</b> .....	9
<b>1.3.1 Modelo de estrés crónico variable</b> .....	13
<b>1.4 Estrés oxidativo</b> .....	14
<b>1.5 Inflamación y apoptosis</b> .....	16
<b>1.6 Aldosterona y testículo</b> .....	17
<b>ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	21
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
<b>METODOLOGÍA</b> .....	22
<b>7.1 Diseño experimental</b> .....	22
<b>7.2 Estímulo de estrés crónico variable</b> .....	23
<b>7.3 Obtención de los testículos</b> .....	24
<b>7.4 Calidad espermática</b> .....	24
<b>7.5 Testosterona sérica</b> .....	25
<b>7.6 Análisis histológico del testículo</b> .....	26
<b>7.6.1 Índice de Johnson</b> .....	27
<b>7.7 Técnica de TNF- <math>\alpha</math> (Inmunohistoquímica)</b> .....	27
<b>7.8 Western Blot</b> .....	28
<b>7.9 Extractos de espermatozoides de cauda epididimal</b> .....	29
<b>7.10 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	29
<b>7.11 Actividad de superóxido dismutasa</b> .....	29
<b>7.12 Actividad de catalasa</b> .....	29
<b>7.13 Análisis estadístico</b> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	31

<b>8.1 Mediciones metabólicas .....</b>	<b>31</b>
<b>8.2 Calidad espermática.....</b>	<b>31</b>
<b>8.3 Testosterona sérica.....</b>	<b>34</b>
<b>8.4 Análisis histológico.....</b>	<b>35</b>
<b>8.5 Inmunohistoquímica .....</b>	<b>37</b>
<b>8.6 Western Blot .....</b>	<b>38</b>
<b>8.7 Estrés oxidativo .....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 1. Protocolo de deshidratación del testículo.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 2. Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina.....</b>	<b>63</b>

## INTRODUCCIÓN

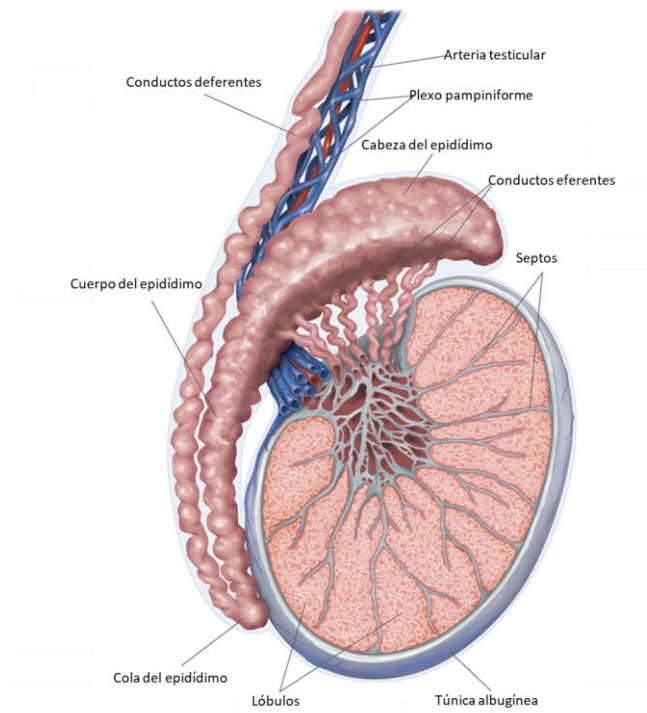
La infertilidad es un problema médico y social que afecta al 15% de parejas en el mundo y puede afectar tanto a hombres como a mujeres (Sharlip y cols. 2002). La infertilidad se refiere a la incapacidad de lograr un embarazo en el lapso de un año, en parejas con vida sexual activa y sin el uso de métodos anticonceptivos (Katz y cols. 2017). El hombre es considerado como factor único del problema de infertilidad en el 50% de los casos, de los 186 millones de personas infértiles en el mundo, más de la mitad son pacientes masculinos (Inhorn y Patrizio, 2015; Winters y Walsh, 2017). Muchos procesos fisiológicos son requeridos para que los individuos sean fértiles. En tales procesos participan diferentes sistemas, por ejemplo, endocrino, nervioso, e inmunológico, etc., los cuales ayudan a llevar a cabo la espermatogénesis de manera correcta y por ende observar una buena calidad espermática. Existen diversos factores que pueden alterar la calidad del semen y con ello, disminuir la fertilidad masculina. Uno de ellos, que ha sido poco estudiado es el estrés crónico, el cual afecta directamente a la espermatogénesis debido a que las células germinales son susceptibles a factores estresantes (Shen y cols. 2020).

Los estímulos estresores activan el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA), que sintetiza glucocorticoides específicamente corticosterona en las ratas y cortisol en humanos. Al aumentar su concentración pueden iniciar un proceso de apoptosis en las células de Leydig en la rata adulta, además de que el estrés crónico disminuye el área del túbulo seminífero, alterando así la espermatogénesis (Retana-Márquez y cols. 2014). El estrés es un conjunto de alteraciones físicas y/o psicológicas que desequilibran el balance homeostático, dependiendo del tiempo de exposición a éste se clasifica en agudo o crónico. El estrés agudo es de exposición corta mientras que el estrés crónico es de exposición larga y trae consecuencias a diferentes niveles en el organismo a largo plazo. Uno de ellos es la generación de estrés oxidativo definido como el conjunto de alteraciones en el equilibrio pro-/antioxidante (Daenen y cols. 2019) que a su vez afecta los niveles de enzimas antioxidantes. De esta forma se genera daño oxidativo en la membrana lipídica de las células germinales y espermatozoides, debido a que son vulnerables por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de su membrana (Nirupama y cols. 2013).

Sin embargo, la corticosterona no es la única hormona que aumenta ante un evento estresante. En ratas jóvenes hemos mostrado que la aldosterona aumenta con el estrés crónico (Sánchez-Sólis y cols. 2020). La aldosterona es una hormona que ha sido estudiada con mayor precisión para entender su participación fisiológica y fisiopatológica renal. Sin embargo, se sabe que la aldosterona regula el equilibrio de líquidos y electrolitos en el epidídimo (Roy y cols. 2013). Al utilizar un modelo de estrés crónico variable en ratas jóvenes hemos encontrado que aumenta significativamente la aldosterona no así los niveles de corticosterona. A su vez observamos la disminución en la viabilidad, motilidad y concentración espermática sin efectos sobre el estrés oxidativo testicular (Hernández-Cano, 2021). Esos hallazgos sugieren que el estrés crónico variable afecta la calidad espermática posiblemente regulado por la aldosterona. Sin embargo, los efectos del estrés crónico variable, sobre la organización histológica e inflamación testicular y el estrés oxidativo espermático se desconoce. Dicho esto, el objetivo de este trabajo es evaluar si el estrés crónico variable afecta la actividad de enzimas antioxidantes en los espermatozoides epididimales, la inflamación testicular, los niveles de testosterona y la organización histológica.

### **1.1 Anatomía y celularidad testicular**

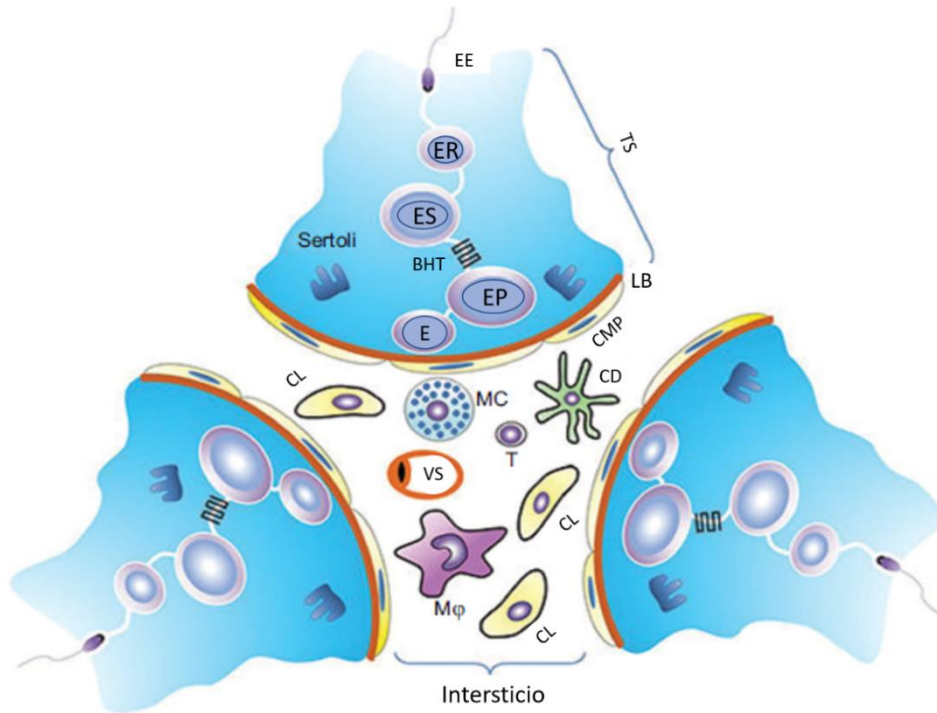
Los testículos son las gónadas masculinas en hombres (Figura 1), son estructuras reproductivas que tienen funciones tanto endocrinas como exocrinas y prácticamente no difieren en cuanto a la anatomía de los testículos de la rata, se encuentran cubiertos por la bolsa escrotal y están separados por el tabique escrotal, su tamaño varía considerablemente entre individuos, aunque el promedio se encuentra entre los 3 a 5 cm de longitud y de 2 a 3 cm de ancho en el humano y en la rata entre los 2 cm de longitud y 1.4 cm de ancho (Enciclopedia Británica, 2010; Tiwana y Leslie, 2021; Vaamonde y cols. 2022).



**Figura 1.** Anatomía del testículo. Se muestran los diferentes componentes anatómicos del testículo. Modificado de Enciclopedia Británica (2010).

El testículo se encuentra cubierto por la túnica albugínea, es una cápsula de tejido conjuntivo que emite tabiques que convergen hacia el centro para finalmente unirse en el mediastino testicular, dichos tabiques dividen al testículo en lóbulos, en el interior de estos lóbulos se encuentra el parénquima testicular, el cual contiene dos espacios o compartimientos, el intersticial y el espacio de los túbulos seminíferos. En el intersticio se encuentran las células de Leydig que producen testosterona, también hay macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y fibroblastos (Figura 2) (Mori y Cristensen, 1980). Por otro lado, los túbulos seminíferos se encuentran limitados por las células mioides peritubulares, el endotelio linfático y otros elementos acelulares que en conjunto forman una lámina la cual rodea a los túbulos. La función de las células mioides peritubulares se desconoce, aunque se ha descrito que su principal función es la contractilidad, generando un tipo de fuerza motriz que ayuda a la propulsión de los espermatozoides hacia el lumen de los túbulos seminíferos. Sin embargo, investigaciones

recientes han mostrado que participan en el crecimiento testicular postnatal (Holstein y cols. 1996; Nurmio y cols. 2012).

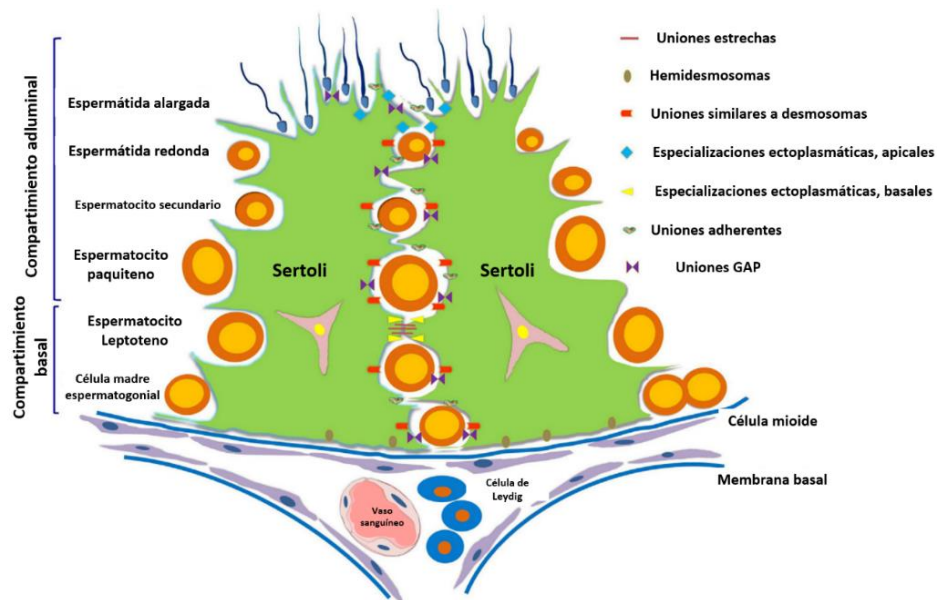


**Figura 2.** Estructura testicular. Se muestran los diferentes componentes celulares del testículo. BL, lámina basal; BHT, barrera hematotesticular; EE, espermátida elongada; CMP, células mioideas peritubulares; EP, espermatocito primario; ER, espermátida redonda; E, espermatogonia; ES, espermatocito secundario; TS, túbulo seminífero; CL, célula de Leydig; MC, mastocito; CD, célula dendrítica; T, célula T; Mφ, macrófago y VS, vaso sanguíneo. Modificado de Zhao y cols. 2014.

Los túbulos seminíferos son la unidad funcional del testículo, están formados principalmente por las células de Sertoli y las células germinales en sus diferentes etapas las cuales dan origen a los espermatozoides (Mruk y Cheng, 2015; Nakata y cols. 2015). A las células de Sertoli se les atribuye varias funciones, entre ellas, la secreción de glicoproteínas como inhibina B y la hormona antimülleriana (AMH), de proteínas de unión a andrógenos y otras sustancias de acción endocrina y/o paracrina, así como funciones de apoyo y tróficas para las células del epitelio seminífero, el transporte de espermátidas maduras hacia el lumen, fagocitosis, entre otras (Iliadou y cols. 2015). Otra estructura importante en el túbulo seminífero es la barrera



hematotesticular (BHT) la cual divide al epitelio seminífero en dos compartimentos denominados basal y adluminal, en cada uno se encuentran distintos estadios de células germinales, por ejemplo, en la parte basal residen las espermatogonias y los espermatocitos preleptotenos, en cambio en la parte adluminal se encuentran los espermatocitos primarios y secundarios, espermatidas redondas y espermatidas alargadas. La principal función de la BHT es mantener separadas a las células germinales de la parte adluminal del sistema circulatorio y linfático. Además, de proporcionar los nutrientes, mitógenos y factores de diferenciación, así como, un ambiente inmunosupresor para que se lleve a cabo el correcto desarrollo de las células germinales (Yan y cols. 2008; Mruk y Cheng, 2015). Cabe mencionar que la BHT está conformada por distintos tipos de uniones celulares que la mantienen íntegra para llevar a cabo el proceso de la espermatogénesis. Entre ellas se encuentran las uniones estrechas, especializaciones ectoplásmicas, uniones tipo desmosoma y las uniones tipo GAP (Figura 3) (Mruk y Cheng, 2015).



**Figura 3.** Diagrama esquemático del túbulo seminífero. El túbulo seminífero está conformado por las células de Sertoli ubicadas en la membrana basal, las adyacentes forman uniones estrechas separando de esta forma el epitelio seminífero en dos compartimentos, adluminal y basal. Modificado de Hai y cols. 2014.

Finalmente, en la parte superior del testículo se ubica la cabeza del epidídimo, que se dispone a lo largo del testículo, éste es un túbulo contorneado largo conformado por epitelio epididimario que secreta diversas proteínas que ayudan a crear un ambiente óptimo para la maduración de los espermatozoides. Una vez que finaliza el proceso de espermatogénesis, los espermatozoides pasan a través del lumen del túbulo seminífero hacia el epidídimo donde son almacenados y debido a que estos espermatozoides testiculares son inmaduros ahí adquieren motilidad y capacidad de fertilización (Cornwall y cols. 2019). El epidídimo es un órgano compuesto por cuatro zonas, el segmento inicial, caput, corpus y la cauda, las cuales son importantes para la maduración de los espermatozoides, ya que estos adquieren ciertas características durante el tránsito por estas regiones y su interacción con el entorno luminal, por ello, el epidídimo es responsable de la concentración, maduración, protección y el almacenamiento de los espermatozoides (James y cols. 2020). Cada una de las regiones del epidídimo está conformado por 6 tipos de células que a su vez tienen distintas funciones. Las células principales se ubican a lo largo de todo el epidídimo, aproximadamente ocupan entre el 65% y el 80% del epitelio epididimal. Estas tienen actividad secretora y endocítica al llevar a cabo la absorción y secreción de distintos productos, así como la producción y liberación de epididimosomas (Cornwall, 2009; Robaire y cols. 2006). Las células apicales se disponen en mayor proporción en el segmento inicial con funciones fagocíticas, por otro lado, las células estrechas se encuentran solo en el segmento inicial, se encargan de la secreción de hidrógeno y de funciones endocíticas. Las células claras ubicadas en todas las regiones a excepción del segmento inicial eliminan las gotas citoplasmáticas del espermatozoide durante su paso por esta zona. Además, junto con las células estrechas regulan el pH luminal (Cornwall, 2009). Las células halo están presentes en todo el epitelio y tienen actividades inmunológicas, por último, las células basales se presentan a lo largo del túbulo y ejercen actividades sobre el entorno luminal (Robaire y cols. 2006).

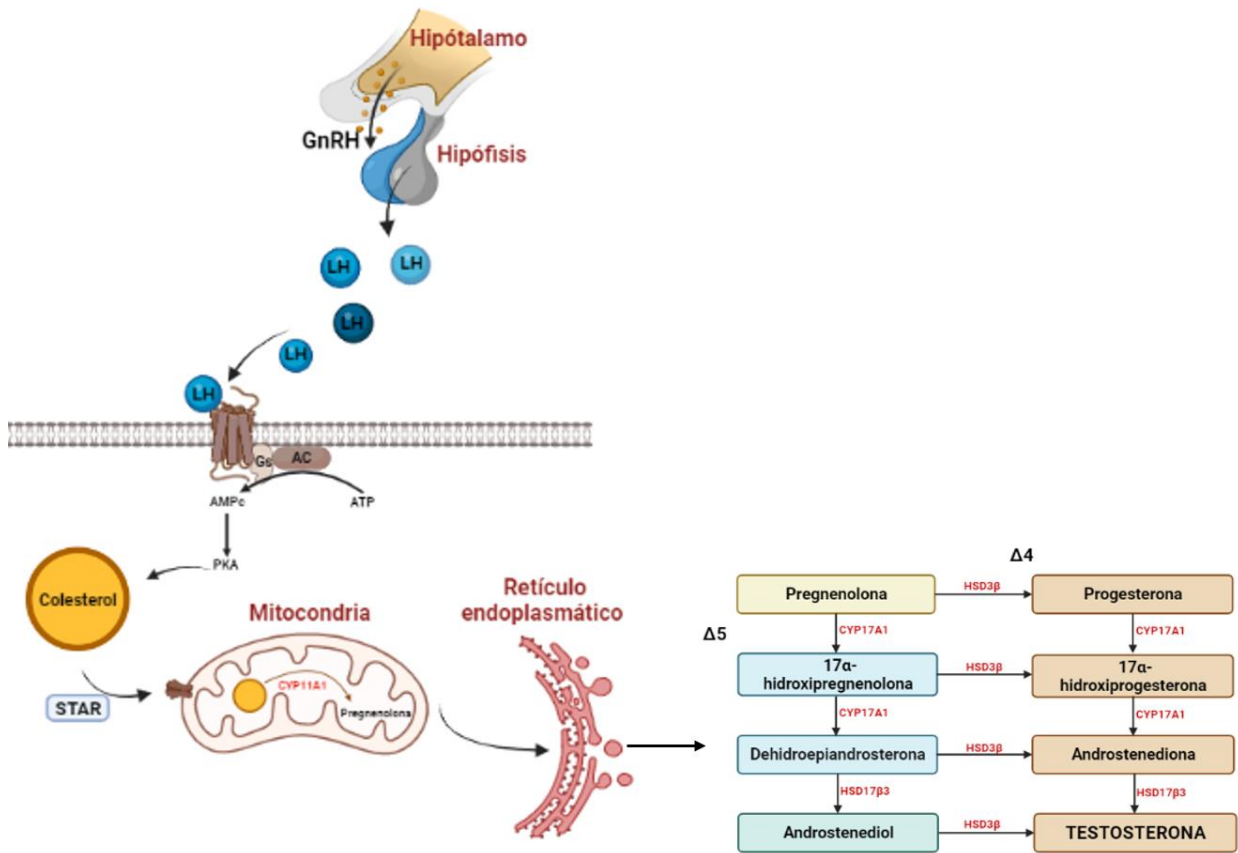
El epidídimo mediante contracciones musculares transporta a los espermatozoides entre 10 y 15 días, para almacenar del 50 al 80% de estos en la cauda hasta el momento de la eyaculación (Robaire y cols. 2006). Durante este proceso de transporte se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides y dependiendo de la zona del epidídimo adquieren motilidad, así como factores

que le ayudan a la fertilización. Por ejemplo, factores para unirse y penetrar al ovocito, gracias a la adquisición de proteínas y cambios en la membrana (James y cols. 2020).

## **1.2 Fisiología del testículo**

### **1.2.1 Esteroidogénesis**

El testículo tiene dos funciones, una de ellas es la síntesis de hormonas esteroideas, testosterona y la producción de los espermatozoides. La esteroidogénesis es la síntesis de hormonas esteroideas a partir de moléculas de colesterol (Figura 4). En condiciones normales en el hombre, el hipotálamo sintetiza y libera la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula a la hipófisis para liberar la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). La LH inicia la esteroidogénesis al unirse a su receptor (LHR) acoplado a proteínas G en la membrana de las células de Leydig. Una vez que se une el ligando a su receptor, se activa la proteína G provocando la activación de la adenilciclase que incrementa el AMPc intracelular y la fosforilación de proteínas mediante la proteína quinasa (PKA). Posteriormente, aumenta la translocación de colesterol hacia las mitocondrias, donde el colesterol es convertido en pregnenolona mediante la enzima CYP11A1. La pregnenolona es metabolizada para su conversión a testosterona mediante reacciones enzimáticas en el retículo endoplásmico liso como la 3 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$  HSD), la CYP17A1 y la 17 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 $\beta$  HSD3) (Wang y cols. 2017).



**Figura 4.** Síntesis de testosterona. Mecanismo por el cual se lleva a cabo la producción de testosterona a partir de moléculas de colesterol. Modificado de Ayas y Howlett, 2015.

### 1.2.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que ocurre de forma cronológica para formar a los gametos masculinos. En el hombre dura 74 días y en la rata 54. Las fases son tres: mitosis, meiosis y espermiogénesis (Perrard y cols. 2016). Además de la secreción de LH por la hipófisis para la producción de testosterona en las células de Leydig, también se libera hormona folículo estimulante (FSH), que se une a sus receptores ubicados en las células de Sertoli, proceso importante para sintetizar factores de crecimiento necesarios para la espermatogénesis (Shiraishi y Matsuyama, 2017).

Las espermatogonias son células germinales que inician la espermatogénesis y tienen la capacidad de autorrenovarse para mantener el número de espermatogonias ideal en el túbulo

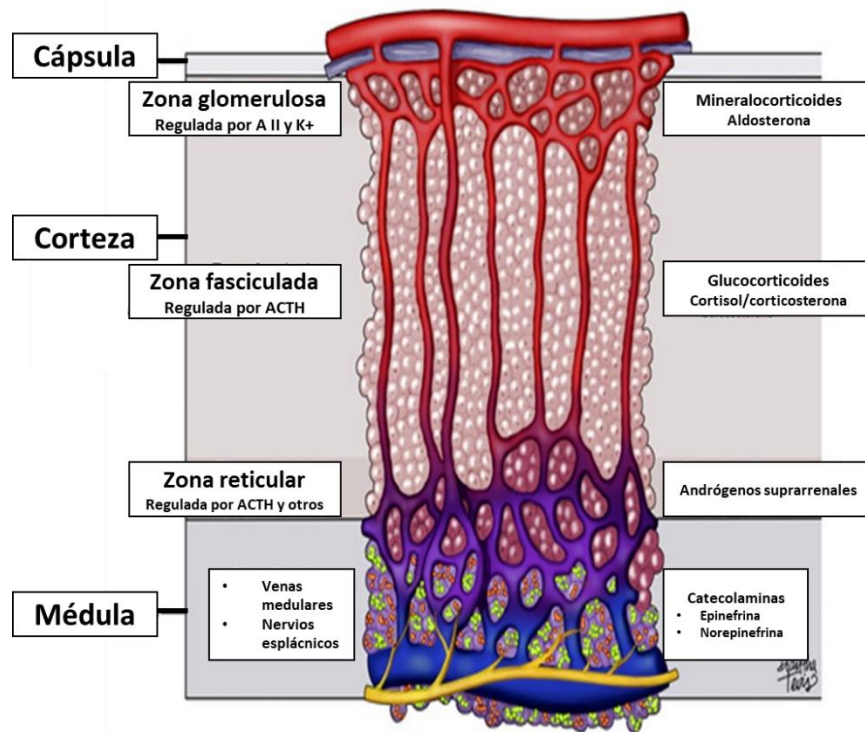
seminífero y otras se diferencian en espermatogonias pares (Ap) y a su vez en alineadas (Aal), posteriormente, estas pasan a ser Aal en A1 en dónde el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) es necesario para este cambio (Chen y Liu, 2015). Las A1 se transforman a A2, A3, A4 y B; las espermatogonias tipo B que ya son diferenciadas dan lugar a los espermatocitos preleptoteno o primarios y son transportados a través de la BHT dónde sufren la primera división meiótica. Es importante recalcar que durante la profase de la primera meiosis ocurre el emparejamiento de los cromosomas homólogos e intercambian fragmentos de estos mismos, dando paso a los espermatocitos leptoteno, cigoteno y paquíteno. Luego ocurre la división cromosómica de los homólogos generando los espermatocitos secundarios (Sironen y cols. 2011; Wu y cols. 2020). Ya formados los espermatocitos secundarios ocurre una segunda división meiótica en dónde las cromátidas hermanas se dividen y generan las espermátidas redondas haploides. Seguido de esto ocurre el último paso de la espermatogénesis conocida como espermiogénesis, que tiene como objetivo la formación de acrosomas, piezas intermedias, flagelos y la expulsión del citoplasma además del empaquetamiento del ADN, obteniendo finalmente una estructura del espermatozoide totalmente formada (Canarella y cols. 2020).

### **1.3 Estrés**

El estrés se puede definir como alteraciones físicas y psicológicas que desequilibran el balance homeostático. Los factores que cambian o afectan dicha homeostasis se llaman estresores y dependiendo de su intensidad se generara una respuesta ante dicho estímulo (Chu y cols, 2022). El estrés puede ser agudo o crónico, el agudo es único y la exposición es en tiempo limitado, mientras que el estrés crónico es prolongado o de exposición continua durante un largo periodo (Koolhaas y cols. 2011; Paccak y cols. 1998). Se ha considerado al estrés agudo como un estrés “bueno” o adaptativo ya que se refiere a aquellas respuestas fisiológicas de experiencias relacionadas a enfrentar un desafío o asumir un riesgo que resuelve de manera exitosa una situación. El estrés crónico es un estrés “malo” o mal adaptativo debido a que al estar expuesto a estos estímulos durante un largo periodo desencadenan diversos tipos de respuestas que si no se controlan pueden afectar directamente a distintos órganos o alterar ciertas funciones en el organismo (McEwen, 2007). Durante la exposición ante un evento estresor se lleva a cabo la activación de diversos ejes para adaptar al organismo a este estímulo, entre ellas el eje

hipotálamo hipófisis adrenal (HPA) caracterizado por ejercer una respuesta larga y el sistema simpático adrenal de respuesta corta (Joëls y Baram, 2009; Tank y Lee Wong, 2015). De manera regular la activación del eje HPA se ejerce de forma rítmica dividida en 3 patrones de secreción diferentes, ultradiana y circadiana en ausencia de estímulos que alteren este eje e inducida por factores estresantes. En el ritmo ultradiano la liberación de hormonas ocurre cada 60 minutos en promedio (Spiga y cols. 2014). En cuanto al circadiano se alcanzan niveles basales máximos de estas hormonas durante el comienzo de este ritmo, es decir, en ratas este pico basal se alcanza en la noche, mientras que en los humanos se alcanza en las mañanas. Por último, en el inducido por factores estresantes dependerá de la naturaleza del factor, el tiempo e incluso de factores como el sexo o cepa de la rata (Spencer y Deak, 2017.)

En cuanto al eje HPA, la respuesta comienza a nivel del hipotálamo, dónde se encuentran las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), este se localiza en el diencéfalo ventral adyacente al tercer ventrículo, conformado por 3 tipos de neuronas, magnocelulares, parvocelulares y de proyección larga, encargadas de la secreción y expresión de distintas hormonas (Cheng y cols. 2018). Las neuronas parvocelulares surgen de la eminencia media del hipotálamo y al ser estimuladas liberan hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula a la hipófisis anterior mediante la unión a sus receptores (CRH-R1 y CRH-R2) ubicados en las células corticotropas para la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) mediante exocitosis hacia la circulación (Bale y Vale, 2004). ACTH se une a sus receptores de melanocortina 2 (MC2R) en la corteza adrenal aumentando la síntesis y liberación del glucocorticoide cortisol (en humanos) o de corticosterona (en ratas) específicamente en la zona fasciculada, además del mineralocorticoide aldosterona en la zona glomerulosa (Figura 5). Cabe destacar que la aldosterona es una hormona poco estudiada en relación con el estrés en comparación de la corticosterona/cortisol.



**Figura 5.** Glándula adrenal. Diferentes zonas de la glándula adrenal y sus principales productos. Tomado de georgiahealth.edu

En el caso del sistema simpático adrenal están implicadas las neuronas catecolaminérgicas del tronco cerebral que convergen en las neuronas simpáticas preganglionares para activar el sistema nervioso simpático y la médula adrenal en donde se liberan catecolaminas como adrenalina y noradrenalina por parte de nervios simpáticos (Tank y Lee Wong, 2015). La secreción de aldosterona por este eje se lleva a cabo en primer lugar por las catecolaminas que inducen la secreción de renina por medio de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos situados en las células yuxtglomerulares en riñón, activando así el sistema renina-angiotensina-aldosterona que secreta aldosterona (Connell y Davies, 2005). ACTH regula también directamente la producción de aldosterona (Inoue y cols. 2021), incrementa los niveles angiotensina II (Yang y cols. 1993) el cual regula la biosíntesis de aldosterona en el sistema aldosterona-renina-angiotensina (Inoue y cols. 2021).

La síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides ocurre mediante la esteroidogénesis a partir de moléculas de colesterol, en el cual se activan numerosas proteínas enzimáticas que regulan este proceso. La proteína quinasa A se encarga de la regulación de proteínas esteroidogénicas como la lipasa sensible a hormonas quien aumenta las concentraciones de colesterol en la célula. También se encuentra la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) que moviliza el colesterol específicamente hacia las mitocondrias en donde en conjunto con el retículo endoplásmico metabolizan este colesterol hasta su conversión ya sea a glucocorticoides y/o mineralocorticoides. Ya sintetizados se liberan a la circulación y se dirigen a sus órganos diana para ejercer sus mecanismos de acción mediante la unión a sus receptores intracelulares como lo son el receptor de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR) (John y Buckingham, 2003; Miller y Auchus, 2011; Ramamoorthy y Cidlowski, 2016).

Los glucocorticoides pueden ejercer dos tipos de mecanismos de acción, genómico y no genómico. En cuanto a las acciones genómicas se refiere a la unión del ligando al receptor citosólico en donde una vez unido se disocia y se transloca hacia el núcleo para llevar a cabo la transactivación y/o transrepresión de genes al unirse a la cromatina de las células de diferentes tejidos. Un ejemplo de transrepresión de glucocorticoides, es la disminución de la expresión de CRH y ACTH (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016; Kubin y cols 2017). Las acciones genómicas de los glucocorticoides son las respuestas mediante la unión a su receptor nuclear. Durante este proceso participan numerosas quinasas como la fosfoinositido 3-quinasa, AKT, entre otras, además de la activación de diferentes vías de señalización secundarias haciendo de este mecanismo algo complejo y diverso. En diferentes órganos estas acciones juegan un papel central en el metabolismo con la movilización de reservas de energía promoviendo la glucogenólisis y la lipólisis, reacciones inmunes (inflamación), función cardiovascular, reproducción, etc. (Herman y cols. 2016; Ramamoorthy y Cidlowski, 2016; Kubin y cols. 2017).

Los mineralocorticoides también ejercen mecanismos de acción genómicos y no genómicos, la aldosterona es la principal molécula de este grupo, el cual se une a sus receptores correspondientes que trabajan en conjunto con la enzima 11  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2). Debido a que el receptor no es específico de mineralocorticoides, es decir,



puede ser activado por glucocorticoides, la acción de  $11\beta$ -HSD2 en humanos es prevenir la activación de este receptor por glucocorticoides, convirtiendo el cortisol (activo) en cortisona (inactivo), en ratas es la conversión de corticosterona en 11-deoxicorticosterona (Wang y cols. 2020; Roy y cols. 2013). Los mecanismos genómicos de la aldosterona comienzan con la traslocación del complejo aldosterona-receptor hacia el núcleo de la célula, iniciando la regulación de la transcripción génica, por ejemplo, del canal de sodio epitelial (ENaC), algunas quinasas, así como diversas proteínas de señalización que tienen efecto sobre la reabsorción de sodio y agua. Los efectos no genómicos de aldosterona se basan en la unión de éste a su receptor de membrana en la que se activan diferentes vías de señalización como las de PKA y PKC que intervienen en el cotransporte de cloruro de sodio (NCC), reabsorción de bicarbonato, natriuresis, etc. (Cheng y cols. 2019; Fuller y Young, 2005; Takagi y cols. 1986).

Como ya se describió, tanto los mineralocorticoides como los glucocorticoides junto con la expresión de su receptor inducen cambios químicos para contrarrestar los efectos negativos del estrés. Sin embargo, en un proceso de estrés crónico estos mecanismos pueden desencadenar patologías, por ejemplo, la aldosterona puede inducir inflamación, estrés oxidativo, ansiedad, depresión, lesiones vasculares y con ello enfermedades renales y cardíacas, entre otras (Kubzansky y Adler, 2010). En el caso de cortisol/corticosterona un exceso de ésta puede alterar la respuesta inmune o privar de recursos energéticos a diversos tejidos además de generar estrés oxidativo (Marasco y cols. 2017; Costantini y Møller, 2011; Conrad, 2008).

### **1.3.1 Modelo de estrés crónico variable**

El estrés crónico puede alterar distintas funciones del organismo, se ha mostrado en diversos estudios que la exposición crónica a distintos factores estresantes puede repercutir en la reproducción del individuo y el metabolismo de distintos órganos y/o sistemas. Desde el año 1946 Hans Selye propuso que la actividad del eje HPA podría aumentarse tras la exposición crónica a diversos estresores. Posteriormente, Kats y cols. (1981) comenzaron con la aplicación de un modelo de estrés crónico en ratas mediante el uso de diferentes factores estresantes severos para el estudio de cambios en el comportamiento y con ello evaluar la eficacia de tratamientos antidepressivos. Este modelo fue modificado debido a razones éticas implementadas en esa época

por la Ley de animales, por ende, los factores estresantes severos fueron eliminados, finalmente Paul Willner desarrolló el modelo de estrés crónico leve en el cual los roedores son expuestos a factores estresantes leves durante un tiempo prolongado, este modelo es uno de los más usados en la actualidad (Khan y cols. 2020).

#### **1.4 Estrés oxidativo**

Uno de los efectos negativos de la exposición crónica al estrés es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando así un proceso de estrés oxidativo en las células. Esta es una condición generada por el desequilibrio del sistema antioxidante debido al exceso en la generación ROS y nitrógeno que superan la capacidad de enzimas antioxidantes de la célula, desencadenando así una serie de alteraciones en distintos tejidos (Daenen y cols. 2019). Cabe mencionar que las ROS no son necesariamente dañinas ya que estas desempeñan un papel importante en muchas vías de señalización intracelular (Dröge, 2002). Bandegi y cols. (2014) realizaron una investigación en donde evaluaron los efectos protectores de *Crocus Sativus* contra el estrés oxidativo, para ello, aplicaron un modelo de estrés crónico en ratas y observaron que tras la aplicación de este modelo hubo un aumento de ROS en cerebro, hígado y riñones. En el hombre, las ROS tienen efectos tanto positivos como negativos sobre la función reproductiva. Las ROS, específicamente  $H_2O_2$  son necesarias para la capacitación de los espermatozoides mediante la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que inhibe la tirosina fosfatasa provocando así la fosforilación de la tirosina. De esta forma se estimula la capacitación espermática, este mecanismo también modula la reacción acrosomal, la hiperactivación, además de promover la unión de la membrana del espermatozoide a la proteína ZP-3 de la zona pelúcida necesaria para la fusión del espermatozoide con el ovocito, por lo tanto, las ROS desempeñan mecanismos importantes para el proceso de fertilización y reproducción en el hombre (Aitken y cols. 1995; de Lamirande, y cols. 1998; O'Flaherty y cols. 2006).

Debido a que la membrana de los espermatozoides es rica en ácidos grasos poliinsaturados, los espermatozoides se vuelven aún más susceptibles al ataque de ROS. Los ácidos grasos poliinsaturados contienen dobles enlaces que al ser atacados por un radical libre generan un

radical peróxido que reacciona con otra molécula lipídica, generando así una reacción en cadena, aumentando la oxidación en la membrana de los espermatozoides. Algunos de los productos generados por este proceso oxidativo son el malondialdehído (MDA), la 4 hidroxí-nonenal (4-HNE) y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kothari y cols. 2010). La producción excesiva de ROS puede desencadenar apoptosis mediante la activación de caspasas o causar daños directamente en el ADN de los espermatozoides mediante el ataque de radicales libres a las bases de purina y pirimidina, generando fragmentación del ADN, enlaces cruzados y/o reordenamientos cromosómicos causando infertilidad o defectos genéticos hereditarios (Geva y cols. 1998; Tremellen, 2008; Bisht y cols. 2017). Mientras que, las enzimas antioxidantes tienen la función de proporcionar un equilibrio mediante la reducción de ROS, es decir, son una defensa contra el estrés oxidativo.

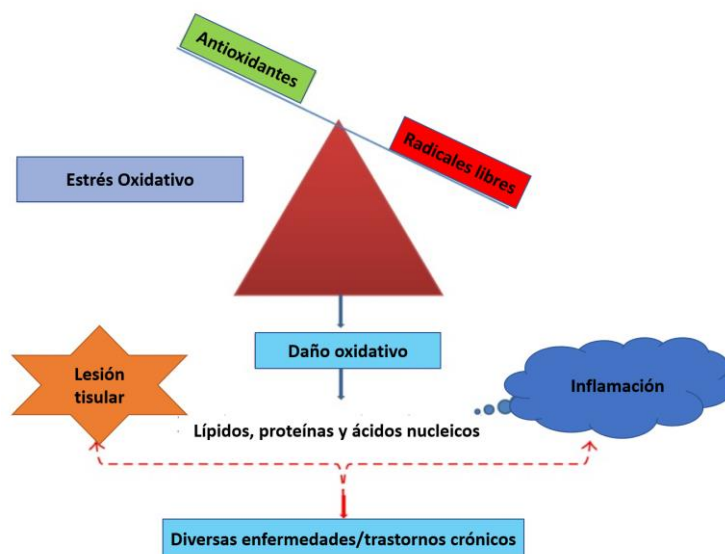
Las enzimas antioxidantes se clasifican en enzimáticas y no enzimáticas (endógenos y adquiridos a través de la dieta), las enzimas de mayor relevancia en la reproducción masculina de tipo enzimático son el superóxido dismutasa (SOD), el glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). La SOD se ha encontrado en diferentes sitios, por ejemplo, en los túbulos seminíferos específicamente en las células de Sertoli, el epidídimo y en el plasma seminal, su función es la de actuar sobre el anión superóxido el cual cataliza su conversión a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , proporcionando de esta manera una protección contra la peroxidación lipídica, daño al ADN, además de un aumento en la movilidad de los espermatozoides. CAT tiene la función de convertir el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  mejorando el equilibrio oxidante en las células reproductivas (Kobayashi y cols. 1991; Bauché y cols. 1994; Chen y cols. 2003; Tavalani y cols. 2008). A pesar del amplio papel protector de las enzimas antioxidantes ante el estrés oxidativo, debido al consumo no regulado de éstas, también se han descrito diversos efectos negativos en la reproducción a través de la inhibición de mecanismos como la capacitación espermática y la reacción acrosomal, esto gracias al exceso de enzimas como CAT y SOD (Aitken y cols. 1995; de Lamirande y cols. 1998; Wagner y cols. 2017).

## 1.5 Inflamación y apoptosis

La inflamación se define como el mecanismo de defensa contra un gran número de patógenos o daños físicos (Hänsel y cols. 2010). Existen numerosas vías por las cuales se puede promover el desarrollo de un proceso inflamatorio en un estado de estrés crónico. La inflamación es un proceso regulado de manera local y sistémica, sin embargo, una inflamación crónica puede tener efectos negativos hasta el desarrollo de daños o patologías en el organismo, entre los mediadores proinflamatorios más comunes son la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . (Dolsen y cols.2019). Se ha mostrado en diversos estudios que la exposición a diversos factores estresantes ya sea de manera crónica o aguda se asocia con la activación de mecanismos de inflamación que finalmente desencadenan problemas de salud a largo plazo (Chiang y cols. 2018). También se ha reportado que el estrés leve crónico se asocia con la activación de distintas vías y factores proinflamatorios como la producción de prostaglandinas, factor nuclear K $\beta$ , etc., así como del aumento de mecanismos apoptóticos asociados a Bcl-2 (Kubera y cols.2011). Es importante mencionar que IL-1, IL-6 y TNF-  $\alpha$  son citocinas depresogénicas y ansiogénicas (Maes y cols. 2011).

El estrés oxidativo puede generar a su vez un proceso de inflamación crónica, activando diversas citoquinas proinflamatorias como las antes mencionadas mediante la activación de diversos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF-1 $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -catenina / Wnt y Nrf2 quienes expresan diferentes genes para citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, entre otros, todos relacionados a la respuesta inflamatoria. La producción de ROS durante tiempos prolongados puede inducir mutaciones somáticas y transformación neoplásicas, generando procesos carcinogénicos y/o apoptóticos (Figura 6) (Fang y Maeda, 2009; Reuter y cols. 2010; Hussain y cols. 2016). Los factores estresantes aumentan la IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de la reducción de componentes antiinflamatorios, esto debido a que el estrés causa una hiperactividad del eje HPA, además de un aumento de catecolaminas, el sistema inmune percibe este estrés activando una respuesta de tipo psico-neuroendocrino a través de la producción de estas citoquinas con la finalidad de mitigar los factores estresantes (Maes y cols. 1998). Sin embargo, una respuesta inflamatoria continua (como en el caso del estrés crónico) puede provocar daño celular debido a la sobreproducción de ROS por parte de las citocinas

inflamatorias. Por ejemplo, TNF- $\alpha$  induce la producción de ROS por parte de los neutrófilos, a su vez IL-1, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  aumentan la síntesis de óxido nítrico sintasa en células inflamatorias y epiteliales. Durante el proceso inflamatorio las ROS interactúan con las cadenas de ADN causando mutaciones, deleción y reordenamiento de genes (Federico y cols. 2007). Se sabe que la inflamación es una de las causas de infertilidad masculina, debido a que las citocinas proinflamatorias aumentan en el testículo durante este proceso (Dutta y cols. 2021). En investigaciones previas se ha observado que niveles bajos de testosterona se relacionan con altos niveles de inflamación a raíz de distintas condiciones clínicas como obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc. (Bianchi, 2018).



**Figura 6.** Estrés oxidativo. Desarrollo del proceso inflamatorio mediante estrés oxidativo. Tomado de Arulselvan y cols. 2016.

## 1.6 Aldosterona y testículo

Se ha descrito que el testículo contiene receptores de mineralocorticoides (NR3C2), específicamente en las células de Leydig (Zhang y cols.2018). En los primeros estudios sobre la participación de aldosterona en el testículo se encontró que la aldosterona bloqueaba el desarrollo y la diferenciación de las células de Leydig. Sin embargo, la razón no estaba del todo clara (Kar y cols.1958). Posteriormente se realizó un estudio en ratas nefrectomizadas en dónde

se observó que los niveles de aldosterona eran altos y que a su vez, los niveles plasmáticos de testosterona eran bajos, sugiriendo que el sistema renina angiotensina aldosterona podría estar implicada en alteraciones testiculares por la disminución de esta hormona (Adachi y Nakada, 1999). En un estudio más reciente realizado por Zhang y colaboradores (2018) encontraron datos interesantes al respecto, debido a que aldosterona disminuyó la proliferación de células madre de Leydig, lo que provocó menor número de células de Leydig y, por ende, la disminución en la concentración de testosterona, sin embargo, los resultados con respecto a células adultas difieren, ya que en éstas la aldosterona estimuló la síntesis de testosterona.

## **ANTECEDENTES**

En los mamíferos, el hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula a la hipófisis para liberar la LH y FSH. La hormona LH estimula a los testículos para sintetizar testosterona y FSH que estimula la producción de espermatozoides. Con la presencia de un estresor, todo el sistema se inhibe al liberarse endorfinas y encefalinas (neurotransmisores producidos por el sistema nervioso central), que se encargan de bloquear la liberación de GnRH en el hipotálamo. Además, la presencia de glucocorticoides bloquea la respuesta de los testículos a LH. A consecuencia de esto, disminuye la testosterona (Rivier y Rivest 1991). La calidad espermática puede ser afectada por factores ambientales propios del estilo de vida de cada individuo, los cuales se han señalado como los causantes de alteraciones testiculares y problemas reproductivos afectando la fertilidad (Lalinde-Acevedo y cols. 2014). Algunos estudios han rechazado que el estrés sea el único factor en la etiología de la infertilidad; pero con el paso del tiempo se comprueba que el estrés es un factor de riesgo adicional. Un ejemplo de esto, es que después de un desastre natural se altera la calidad espermática (disminuye el número de espermatozoides, así como en el volumen del semen y la motilidad espermática) (Collodel y cols. 2008). Recientemente, se demostró un aumento de las actividades de la enzima superóxido dismutasa y los niveles de óxido nítrico en el líquido seminal de hombres en condiciones de estrés (Collodel y cols. 2008). En ratas, Tian y colaboradores (2019) observaron que tras un estímulo de estrés crónico de diferente duración tiene efectos perjudiciales sobre la proliferación de células espermáticas. Un efecto similar ha sido observado en ratas

estresadas crónicamente, mostrando alteraciones en la espermatogénesis y el estado antioxidante en los testículos (Nirupama y cols. 2013).

La apoptosis regulada por el receptor de glucocorticoides y la inhibición de la síntesis de testosterona en las células de Leydig, forma parte de los principales mecanismos de alteración de espermatogénesis inducida por estrés (Zou y cols. 2019). En la rata adulta, el estrés por inmovilización aumenta los niveles de corticosterona y disminuye la testosterona sanguínea (Murthy y cols. 1988). Se conoce el efecto que tiene el estrés sobre los niveles de aldosterona. Se cree que el estrés físico o psicológico continuo podría generar aldosterona mediada por la ACTH, angiotensina II u otros estímulos de la zona glomerulosa. Estos resultados sugieren que la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal es estimulada por la secreción de ACTH inducida por estrés, lo que provoca una sensibilidad elevada para la síntesis en los niveles de aldosterona como sucede en los eventos físicos o psicológicos crónicos estresantes (Markou y cols. 2015). Sin embargo, se desconoce la participación de la aldosterona sobre los espermatozoides. Durante la espermatogénesis y la esteroidogénesis, las células de Leydig son vulnerables al estrés oxidativo, como consecuencia de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. El estrés oxidativo en bajas concentraciones en el semen juega un papel indispensable en sus funciones biológicas durante la capacitación espermática, la fosforilación de la tirosina, la reacción acrosómica que sirve para la fertilización del ovocito y la maduración espermática. Estos mecanismos se encuentran regulados por la defensa de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Cuando se rompe el equilibrio entre los radicales libres y el sistema de defensa antioxidante, se observan daños en los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos presentes en la membrana del esperma, generando pérdida de movilidad, alteración de la pieza intermedia el cual causa una disminución en la calidad seminal o la muerte del espermatozoide (Córdova-Izquierdo y cols. 2020). La gran composición de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de los espermatozoides los hace muy susceptibles a la lipoperoxidación, convirtiéndolos en vulnerables al estrés oxidativo. Aunado a esto, las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes (dismutasa, glutatión reductasa, peroxidasa y catalasa) en la membrana plasmática convierten al espermatozoide en un blanco fácil para el ataque de radicales libres en toda la región post-acrosomal reduciendo la movilidad, daño en proteínas y lípidos, alteraciones en el

DNA, anomalías en la morfología, problemas de fertilidad y la muerte celular (Córdova-Izquierdo y cols. 2020). A través de diversos estudios se ha mostrado que en el testículo se encuentra un gran número de receptores de mineralocorticoides tanto en las células de Leydig como en el epidídimo, los cuales a través de la unión de aldosterona estimulan la síntesis de andrógenos en las células de Leydig y el control de la reabsorción de agua en el epidídimo (Turner y Cesarini, 1983; Zhang y cols. 2018). Con relación a esto, recientemente, en nuestro grupo de trabajo hemos mostrado en ratas jóvenes adultas expuestas a estrés crónico variable, un aumento significativo de la aldosterona y una disminución en la viabilidad, motilidad y concentración espermática sin efectos sobre el estrés oxidativo testicular (Hernández-Cano, 2021). Ahora pretendemos adicionar otros indicadores que permitan ampliar el conocimiento en este contexto.

## **JUSTIFICACIÓN**

El estrés se puede definir como un estímulo agresivo, percibido como amenazante para mantener la homeostasis. Dicho estímulo activará una serie de reacciones que involucran respuestas conductuales y fisiológicas (nerviosas, metabólicas y neuroendocrinas) que permite al organismo responder frente al estresor lo mejor posible (Duval y cols. 2010). Estudios realizados en hombres con altos niveles de estrés de diferente tipo (estrés laboral, estrés percibido y eventos estresantes de la vida) presentan parámetros de semen alterados a excepción del estrés relacionado con el trabajo en el que no se encontró una asociación (Javenic y cols. 2014). En la rata adulta, expuestas a estrés por inmovilización, se induce bajos niveles de testosterona (Demura y cols. 1989). Así, las células de Leydig se consideran las primeras en sufrir alteraciones inducida por estrés, dado que aumenta los niveles de glucocorticoides y disminuye la testosterona. Sin embargo, la corticosterona no es la única hormona que aumenta en un evento estresante (Sánchez-Solís y cols. 2020). La aldosterona es una hormona que ha sido estudiada con mayor precisión para entender su participación en la excreción de minerales (Gutiérrez y cols. 2016). En particular, la aldosterona regula el equilibrio de líquidos y electrolitos en el epidídimo y recientemente se ha demostrado su influencia sobre las células de Leydig (Roy y cols. 2013), estos datos sugieren que la aldosterona participa en la regulación de la



espermatogénesis y en la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. Lo que ya hemos analizado es que el estrés crónico variable aumenta la aldosterona y disminuye la viabilidad, motilidad y concentración espermática sin efectos sobre el estrés oxidativo testicular. Se desconoce si los testículos presentan a) alteración morfológica, b) inflamación, c) estrés oxidativo espermático.

## **HIPÓTESIS**

El estrés crónico variable induce desarreglo histológico, inflamación testicular, estrés oxidativo espermático epididimal y disminuye la concentración de testosterona y la calidad espermática en ratas jóvenes adultas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el estrés crónico variable induce desarreglo histológico, inflamación testicular, estrés oxidativo espermático epididimal y disminuye la concentración de testosterona y la calidad espermática en ratas jóvenes adultas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

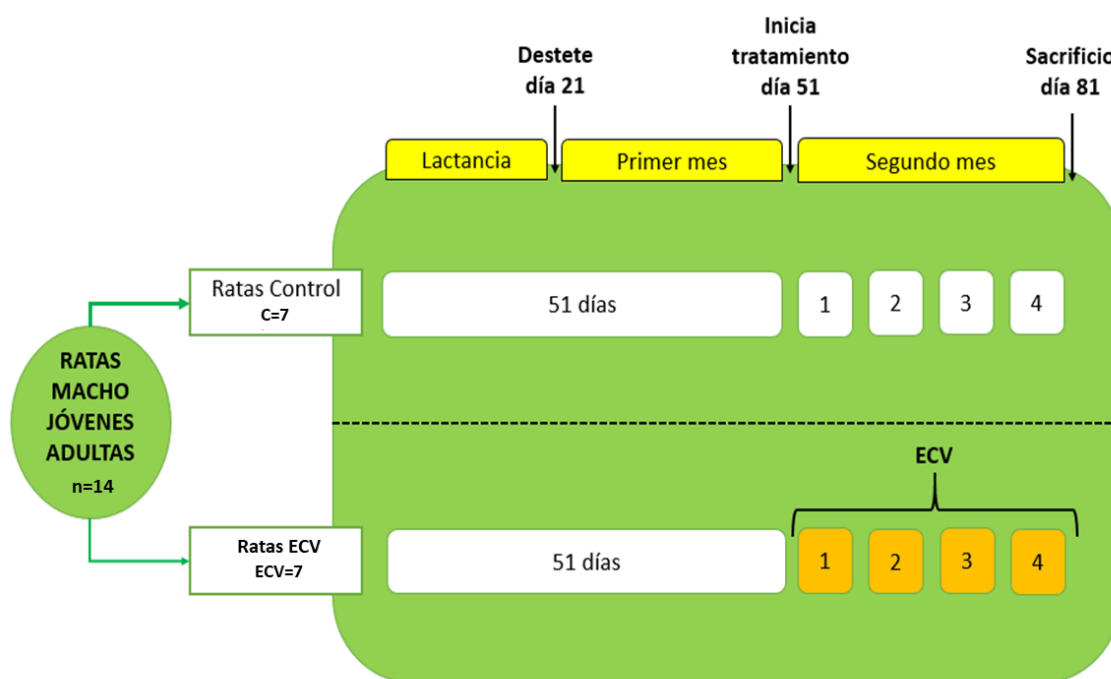
En ratas macho Wistar jóvenes y adultas con estrés crónico variable:

- ✓ Determinar cambios histológicos en el testículo mediante la tinción de tricrómica de Masson
- ✓ Identificar la presencia de TNF- $\alpha$  como indicador de inflamación en el testículo mediante western blot e inmunohistoquímica.
- ✓ Medir la concentración sérica de testosterona mediante ELISA.
- ✓ Determinar el estado oxidativo y antioxidante en extractos testicular mediante espectrofotometría
- ✓ Determinar la calidad espermática epididimal

## METODOLOGÍA

### 7.1 Diseño experimental

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad procedentes de madres diferentes. Se mantuvieron en cajas individuales de acrílico (37 X 27 X 16 cm), bajo condiciones controladas de bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta con un ciclo de luz oscuridad invertido (12 horas luz/oscuridad iniciando a las 8 am), temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de  $60 \pm 5\%$ , alimentadas con dieta Chow 5001 Purina y agua ad libitum. El consumo de alimento y agua fue registrado diariamente. Se formaron 2 grupos: grupo control (C, n= 7) y grupo estrés crónico variable (ECV, n=7). El estímulo de estrés fue aplicado a partir del día 51 de edad durante 4 semanas (Figura 7).




**Figura 7.** Diseño experimental. Se formaron dos grupos de ratas macho jóvenes, el grupo 1 de ratas macho jóvenes controles sin someterse a estrés crónico variable (ECV) y mantenidas en condiciones de bioterio durante el proceso experimental (C, n= 7), ratas macho jóvenes sometidas a ECV durante 4 semanas (ECV, n=7).

## 7.2 Estímulo de estrés crónico variable

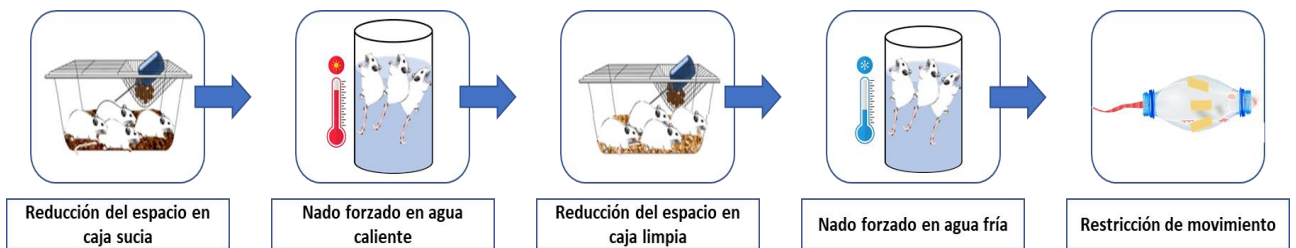
Este estudio se basó en la aplicación de un modelo de estrés crónico variable modificado de Zeeni y colaboradores (2013) conforme a la Figuras 8 y 9.

El estrés crónico variable consistió en exponer a la rata a cinco tipos diferentes de estrés y en diferentes horarios durante cuatro semanas seguidas. Durante la primera semana y las siguientes, se expuso a la rata al estrés sin repetirse en la misma semana para evitar su habituación. El estrés se aplicó a la rata a los 51 días de vida postnatal durante 4 semanas como sigue: reducción del espacio en caja (50 cm x 40 cm x 21 cm) limpia durante 5 horas, se colocan 8 ratas, nado forzado en agua caliente (28 °C) durante 10 minutos, reducción del espacio en caja (50 cm x 40 cm x 21 cm) sucia durante 5 horas, se colocan 8 ratas, nado forzado en agua fría (18 °C) durante 10 minutos y restricción de movimiento durante 3 horas (tubo de 6 cm X 20 cm) tal como se muestra en la figura 8 (Zeeni y cols. 2013).



Semana	Día	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
1		Reducción de espacio en caja limpia 5 horas (8:00 am – 1:00 pm)	Restricción de movimiento 3 horas (2:00 pm- 5:00 pm)	Nado forzado frío (18°C) 10 minutos (1:00 pm – 1:10 pm)	Nado forzado caliente (28° C) 10 minutos (3:00 pm – 3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia 5 horas (10:00 am – 3:00 pm)
2		Nado forzado caliente (28° C) 10 minutos (3:00 pm – 3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia 5 horas (10:00 am – 3:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia 5 horas (8:00 am – 1:00 pm)	Nado forzado frío (18°C) 10 minutos (1:00 pm – 1:10 pm)	Restricción de movimiento 3 horas (2:00 pm- 5:00 pm)
3		Reducción de espacio en caja sucia 5 horas (10:00 am – 3:00 pm)	Nado forzado frío (18°C) 10 minutos (1:00 pm – 1:10 pm)	Restricción de movimiento 3 horas (2:00 pm- 5:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia 5 horas (8:00 am – 1:00 pm)	Nado forzado caliente (28° C) 10 minutos (3:00 pm – 3:10 pm)
4		Nado forzado frío (18°C) 10 minutos (1:00 pm – 1:10 pm)	Nado forzado caliente (28° C) 10 minutos (3:00 pm – 3:10 pm)	Reducción de espacio en caja sucia 5 horas (10:00 am – 3:00 pm)	Restricción de movimiento 3 horas (2:00 pm- 5:00 pm)	Reducción de espacio en caja limpia 5 horas (8:00 am – 1:00 pm)

**Figura 8.** Estresores y horarios aplicados al grupo ECV en este estudio.



**Figura 9.** Estresores empleados en el modelo de estrés crónico.

### 7.3 Obtención de los testículos

Al término del periodo experimental, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (ARANDA 60 mg/kg, via intraperitoneal) y posteriormente se realizó la eutanasia por decapitación. Inmediatamente, la rata fue colocada en posición supina y se le realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral en la pared abdominal, para extraer los testículos y pesarlos en una balanza (ACCURIS W3300-500). Ambos testículos fueron congelados en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### 7.4 Calidad

Se tomó una muestra de la cauda del epidídimo para obtener los espermatozoides (300 mg,  $n=7/\text{grupo}$ ) y se colocó en un tubo de microcentrífuga Eppendorf que contenía 2 mL de solución salina con buffer de fosfato (PBS) previamente calentada y mantenida a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María (PREMIERE XH-1001). Una vez en el tubo se realizaron varios cortes a la muestra de tejido usando una hoja de bisturí (# 20) para facilitar la difusión de los espermatozoides dentro de la solución e inmediatamente evaluar la motilidad y viabilidad de los espermatozoides y posteriormente determinar su concentración y morfología.

**MOVILIDAD:** Número total de espermatozoides progresivamente móviles en la muestra de espermatozoides (OMS, 2021). La evaluación de la motilidad se realizó usando un frotis de esperma y bajo microscopía óptica a 400x (NIKON ECLIPSE E200LED MV R) se contaron los espermatozoides en movimiento (solo se consideraron células completas), contando 200

espermatozoides. Los valores se expresaron en porcentaje considerando a 200 espermatozoides como el 100%.

**VIABILIDAD:** Número de espermatozoides vivos estimada por la integridad de la membrana de los espermatozoides (OMS, 2021). La prueba de viabilidad se realizó mediante el procedimiento de tinción con eosina-nigrosina (Agarwal y cols. 2016), este procedimiento identificó espermatozoides vivos y muertos en un frotis de esperma que también fueron cuantificados. Los valores se expresaron en porcentaje considerando a 200 espermatozoides como el 100%.

**CONCENTRACIÓN:** Número de espermatozoides en 1 mL. Se realizó un primer conteo de 3 campos y se obtuvo la media de esos 3 conteos, con base en la media obtenida, se realizó la dilución recomendada en el manual para el análisis de semen (OMS, 2021). Se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, se sumó el conteo de las dos cuadrículas y se dividió por un factor determinado por la dilución y el número de cuadros evaluados en la cámara de Neubauer. Los valores se expresaron en millones de espermatozoides por mL.

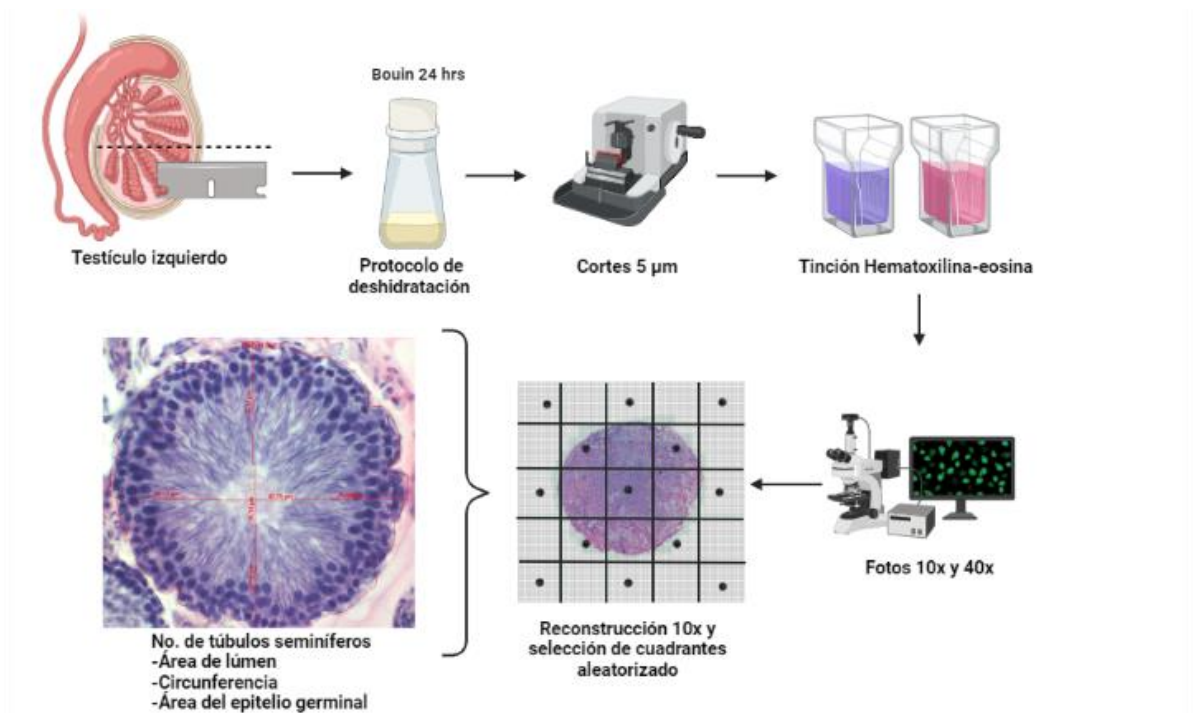
**MORFOLOGÍA:** Evaluación de la morfología específica de cabeza, cuello/pieza intermedia y cola de los espermatozoides. Se realizó un frotis de los espermatozoides para posteriormente teñirlo con Hematoxilina-eosina. Se hizo un conteo de 200 espermatozoides los cuales se clasificaron en normales y anormales, a partir de este conteo se hizo la evaluación por tipo de defecto que presentaban los espermatozoides anormales. Los valores se expresaron en porcentaje considerando a 200 espermatozoides como el 100%.

## **7.5 Testosterona sérica**

La concentración de testosterona sérica se midió mediante inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA) usando un kit comercial (Testosterona ELISA Kit Cayman Chemical), la prueba se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras y estándares se realizaron por duplicado y se leyeron en una placa de ELISA entre 405 y 420 nm.

## 7.6 Análisis histológico del testículo

El testículo derecho fue fijado con Bouin durante 24hrs. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%), y aclarado con xilol e incluido en Paraplast Plus (anexo 2). Se obtuvieron cortes histológicos transversales de 5µm de espesor con un micrótopo de parafina (Leica RM 2135) de los cuales fueron colocados de 6 a 8 por portaobjetos gelatinizados. Las laminillas fueron teñidas con hematoxilina eosina (anexo 3). Se tomaron fotomicrografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 megapíxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 100 aumentos totales). Con el programa Adobe Photoshop CS se realizaron reconstrucciones de las imágenes tomadas a 10x para muestrear aleatoriamente los cuadrantes a analizar. Se utilizó un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007), para evaluar en los cuadrantes elegidos el número total de túbulos, la circunferencia, el diámetro del lumen y altura del epitelio germinativo de dichos túbulos (Figura 10).



**Figura 10.** Metodología para el análisis histológico del testículo.

### 7.6.1 Índice de Johnsen

El índice de Johnsen (1970) es un método que evalúa la progresión de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos según la ausencia o presencia de los diferentes tipos de células espermatogénicas. Se evaluaron 100 túbulos al azar por animal mediante fotomicrografía de los cortes histológicos con el objetivo de 40x en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1, cada túbulo recibió un puntaje del 1 al 10 bajo los criterios histológicos descritos en la tabla 1 (Yoshida y cols.1997; Dohle y cols.2005; Cesur y cols. 2013 y Zhang y cols. 2014).

**Tabla 1.** Criterios histológicos del puntaje de Johnson

<b>Puntaje</b>	<b>Criterio histológico</b>
<b>1</b>	Sin epitelio seminífero.
<b>2</b>	Sin células germinales, solo células de Sertoli.
<b>3</b>	Solo espermatogonias.
<b>4</b>	Sin espermatozoides ni espermátidas, pocos espermatoцитos.
<b>5</b>	Sin espermatozoides ni espermátidas, muchos espermatoцитos.
<b>6</b>	Sin espermatozoides, sin espermátidas tardías, pocas espermátidas tempranas.
<b>7</b>	Sin espermatozoides, sin espermátidas tardías, muchas espermátidas tempranas.
<b>8</b>	Menos de cinco espermatozoides por túbulo, pocas espermátidas tardías.
<b>9</b>	Espermatogénesis levemente alterada, muchas espermátidas tardías, epitelio desorganizado.
<b>10</b>	Espermatogénesis completa.

### 7.7 Técnica de TNF- $\alpha$ (Inmunohistoquímica)

Se utilizaron cortes histológicos de testículo de 5  $\mu$ m de espesor. Se dejaron en una solución de citrato de sodio 10 mM con pH 6 durante 3 noches a 4°C. Posteriormente, fueron incubadas en un horno de microondas por 10 minutos para recuperar los antígenos. Después, las peroxidasa fueron agotadas con una solución de peróxido de hidrogeno al 3% durante 30 minutos. Se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas usando suero de rata al 3%, gelatina bovina al 0.25 % y

BSA al 4 % todo disuelto en una solución de fosfatos salina tritón X 100 (PBS-T) al 0.3 % durante una hora. A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Policlonal de conejo anti-TNF- $\alpha$ , 1:500 ab9739 de abcam) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, los cortes histológicos fueron lavados y después incubados con el anticuerpo secundario (anti-conejo de ratón IgG-HRP, sc-2357 de Santa Cruz biotechnology) a temperatura ambiente por 2 horas. Se realizó el lavado con PBS-T. Finalmente, se realizó el revelado mediante kit de sustrato de peroxidasa DAB (Vector Labs USA, No. Cat. Sk-4100). Las laminillas fueron lavadas y contrateñidas con hematoxilina de mayer's, deshidratadas y cubiertas con un portaobjeto con resina de grado histológico.

### **7.8 Western Blot**

Se prepararon los extractos de testículo, para esto se pesó 0.5 g del tejido y fue macerado en buffer de lisis (0.02M tris-HCL. pH 7.4, 0.1 m NaCl, 0.1M glicina y Tx 0.1%) con un homogeneizador electrónico, adicionando a las muestras un inhibidor de proteasas (SIGMA), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1mM ditioneitol. Posteriormente, fue centrifugada la muestra durante 30 minutos a 15000 rev/min a 4° C para obtener el sobrenadante y determinar la concentración de proteínas totales mediante método de Bradford. Las proteínas se separaron por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% de acrilamida, además se utilizó un marcador molecular de peso conocido (Thermo Scientific) y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Después las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (Leche al 7%). Posteriormente fueron incubados con el anticuerpo primario (1:300; anti. TNF- $\alpha$ ) durante una noche a 4°C. Terminado el tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-TWEEN al 0.2% y se incuban con el anticuerpo secundario (1:1500; Goat anti-rabbit) durante 2 horas. Las bandas inmunorreactivas se revelan utilizando un kit de quimioluminiscencia y mediante la exposición de placas radiográficas a las membranas. Se midió mediante densitometría con el programa Image J. Finalmente los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias con la previa normalización contra las bandas teñidas con colorante de rojo de Ponceau.



### **7.9 Extractos de espermatozoides de cauda epididimal**

Se obtuvieron 10 mL de la muestra de espermatozoides, se le agregó aproximadamente 500 µL de buffer de lisis radioimmunoprecipitación (RIPA) (“RIPA Lysis Buffer” 2017) para ser homogenizado. La muestra fue centrifugada a 10000 rpm durante 2 min a 4°C y se separó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó una dilución del extracto con una concentración de 1:100 en agua destilada. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford.

### **7.10 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

En tubos de 2 mL se agregó 70 µL de Tris 150 mM pH 7.5, 300 µL de ácido tiobarbitúrico al 0.4% y 90 µL de cada muestra. Se agitó en vortex y fue incubada 45 minutos a 100 °C. Posteriormente, la muestra enfriada en hielo durante 2 minutos y se le agregaron 200 µL de KCl al 1.2 %, enseguida centrifugada a 7000 rpm durante 3 minutos. La curva de calibración se realizó mediante la dilución de una solución stock de malondialdehido 30 µM como sigue 0, 90, 180 y 300 µL en volumen final de 300 µL. Finalmente se colocó 180 µL del sobrenadante en una microplaca para realizar la lectura en un lector de placa BioTec modelo Elx800 a 532 nm.

### **7.11 Actividad de superóxido dismutasa**

En una microplaca fue agregado 20 µL de muestra en 80 µL de agua destilada, luego se agrega 8 µL de pirogalol 2 mM, 10 µL de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 5 mg de MTT en 1 mL de PBS 1X). La muestra fue incubada a temperatura ambiente en agitación continua cubiertas de la luz durante 5 minutos. Finalmente, se le agregó 100 µL de dimetilsulfoxido. La curva de calibración se realizó con diluciones de ácido úrico a partir de una solución stock de 2mM como sigue 0, 15.62, 31.2, 62.5, 125,250, 500 µL en volumen final de 1000 µL. Se realizó la lectura en un lector de placa BioTec modelo Elx800 a 550 nm.

### **7.12 Actividad de catalasa**

En tubos de 2 mL se colocaron 5 µg de proteína de los extractos en un volumen final de 250 µL de agua miliQ, se ajustó el volumen de acuerdo con cada muestra. Posteriormente a cada tubo se le agregó 500 µL de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al 0.1 M, 50 µL de Tris 25

Mm pH 7.5, 250  $\mu$ L de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2 M y finalmente una solución de dicromato de potasio al 0.16 M y ácido acético glacial en una concentración de 1:3. La curva de calibración se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 160 nM. Se incubaron los tubos a 97°C, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se le adicionó 200  $\mu$ L en una microplaca para leer en lector de placa BioTec modelo Elx800 a 550 nm.

### **7.13 Análisis estadístico**

Los datos son expresados de acuerdo como la media  $\pm$  SEM a menos que se indique lo contrario. Se usó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Se realizó la prueba t de Student en el programa GraphPad Prism 5.01 (Graphpath Software, USA) para determinar las diferencias significativas entre los dos grupos. En todos los casos  $p \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### 8.1 Mediciones metabólicas

El estrés crónico variable no afectó la ganancia de peso corporal ( $t= 0.8969$ ,  $p <0.05$ ), la ingesta de alimento ( $t= 0.6614$ ,  $p <0.05$ ) y agua ( $t= 0.8708$ ,  $p <0.05$ ) y el peso testicular ( $t= 1.007$ ,  $p <0.05$ ) (Tabla 2).

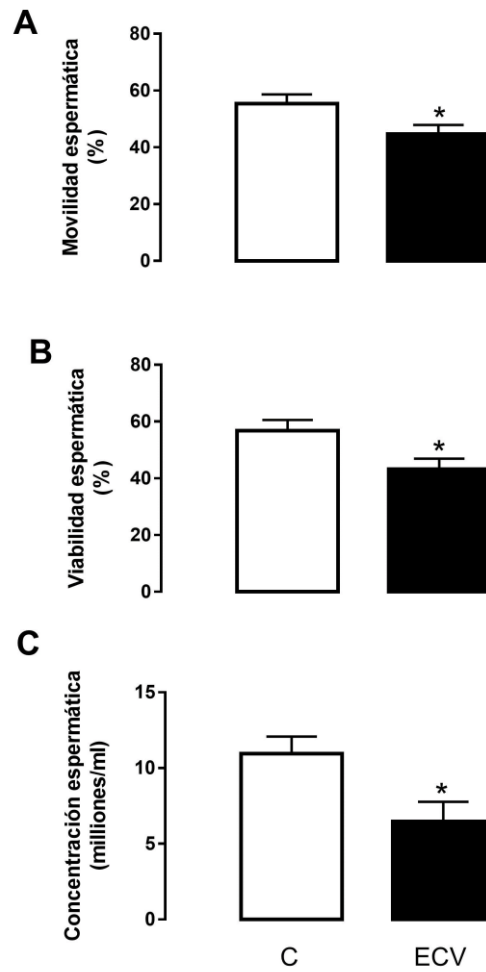
**Tabla 2.** Ganancia de peso, consumo de alimento, agua y peso del testículo.

Parámetros	Control	ECV	Valor de t	p
Ganancia de peso corporal del segundo mes	83.49 ± 7.341	75.94 ± 4.104	t(14)=0.8969	0.3874
Ingesta de alimento (g/día)	9.629 ± 0.2909	9.371 ± 0.2579	t(14)=0.6614	0.5209
Ingesta de agua (mL/día)	20.41 ± 0.6364	19.47 ± 0.8761	t(14)=0.8708	0.4010
Peso del testículo	0.7571 ± 0.09584	0.8571 ± 0.02616	t(14)=1.007	0.3340

Los datos muestran la media ± e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student* ( $p <0.05$ ).

### 8.2 Calidad espermática

Todos los parámetros de calidad espermática disminuyeron por el estrés crónico variable: movilidad progresiva ( $t= 2.337$ ,  $p=0.0376$ ) viabilidad ( $t=2.567$ ,  $p=0.0247$ ), concentración ( $t=2.613$ ,  $p=0.0227$ ) y morfología ( $t= 7.55$ ,  $p=0.0001$ ) comparado al grupo control (Figura 11).



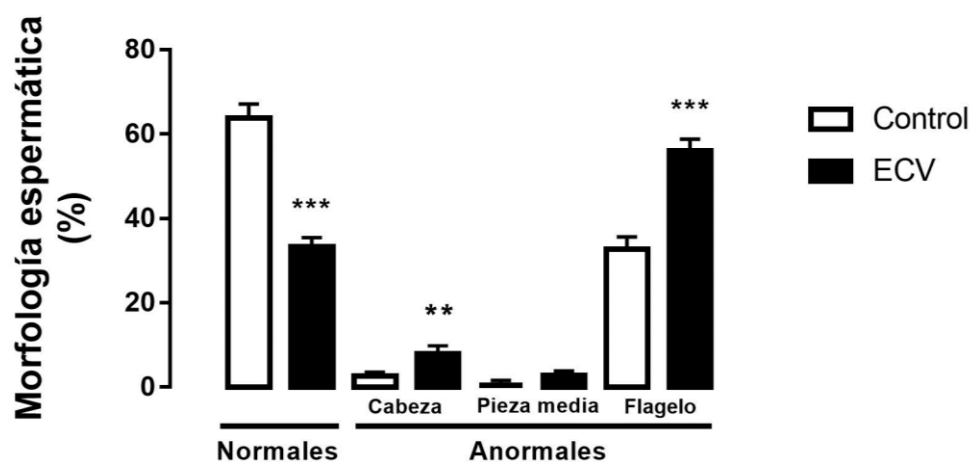
**Figura 11.** Evaluación de la movilidad(A), viabilidad (B) y concentración (C) espermática. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). C: grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student* ( $p < 0.05$ ).

En el análisis diferencial por defectos morfológicos de los espermatozoides se observó que los defectos de cola fueron los más predominantes entre los espermatozoides anormales (Tabla 3, Figura 12 y 13).

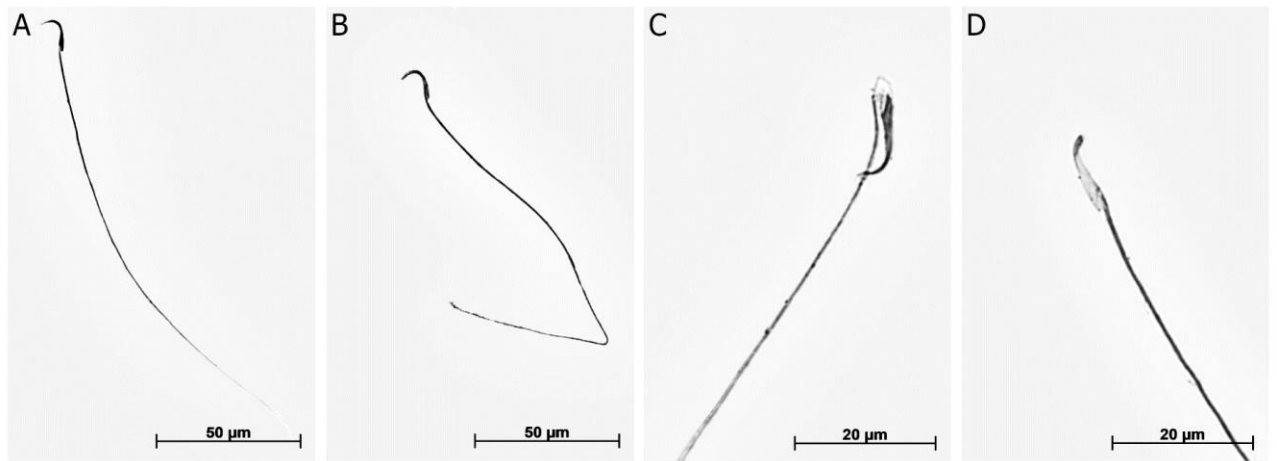
**Tabla 3.** Evaluación de defectos morfológicos de los espermatozoides.

Grupos	Conteo de espermatozoides normales	Conteo de espermatozoides anormales				p
		Defectos de cabeza	Defectos de cola	Defectos de pieza media	Total anormales	
Control	63.79 ± 3.389	2.643 ± 0.8845	32.64 ± 3.019	0.9286 ± 0.6213	36.21 ± 3.389	<0.0001
ECV	33.29 ± 2.198	7.857 ± 2.017	56.07 ± 2.698	2.786 ± 1.096	66.71 ± 2.198	

Los datos muestran la media ± e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-student* para el análisis de los datos.



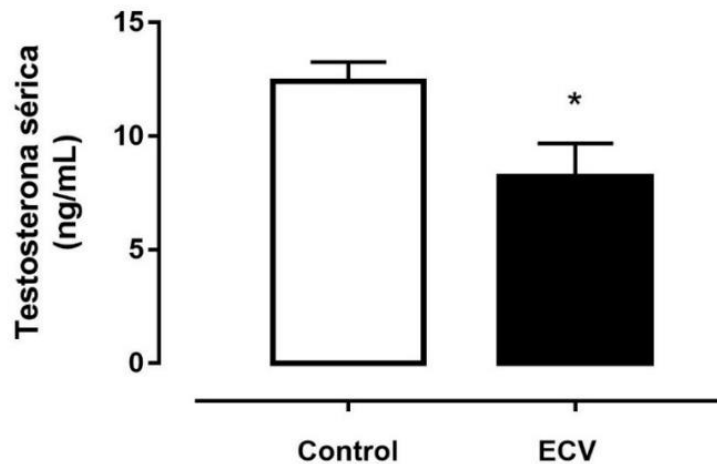
**Figura 12.** Histograma evaluación morfología espermática epididimal de rata macho. Los datos muestran la media ± e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable.



**Figura 13.** Morfología espermática epididimal de rata macho. A) Espermatozoide normal, B) Defecto de flagelo, C) Defecto de pieza media, D) Defecto de cabeza. A y B (40x), B y C (100x).

### 8.3 Testosterona sérica

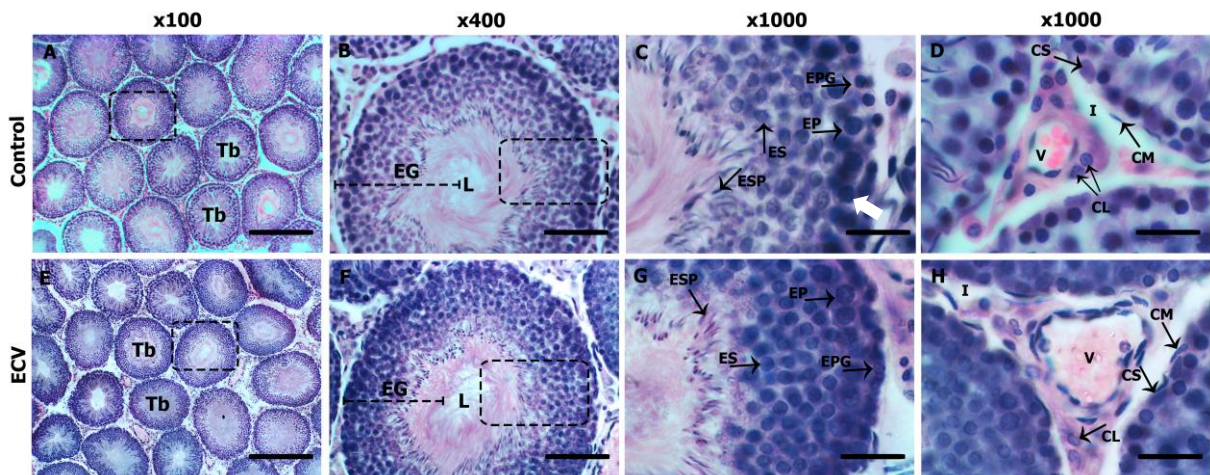
La concentración de testosterona sérica disminuyó significativamente en el grupo ECV comparado al grupo control ( $t=4.637$ ,  $p= 0.0006$ ) (Figura 14).



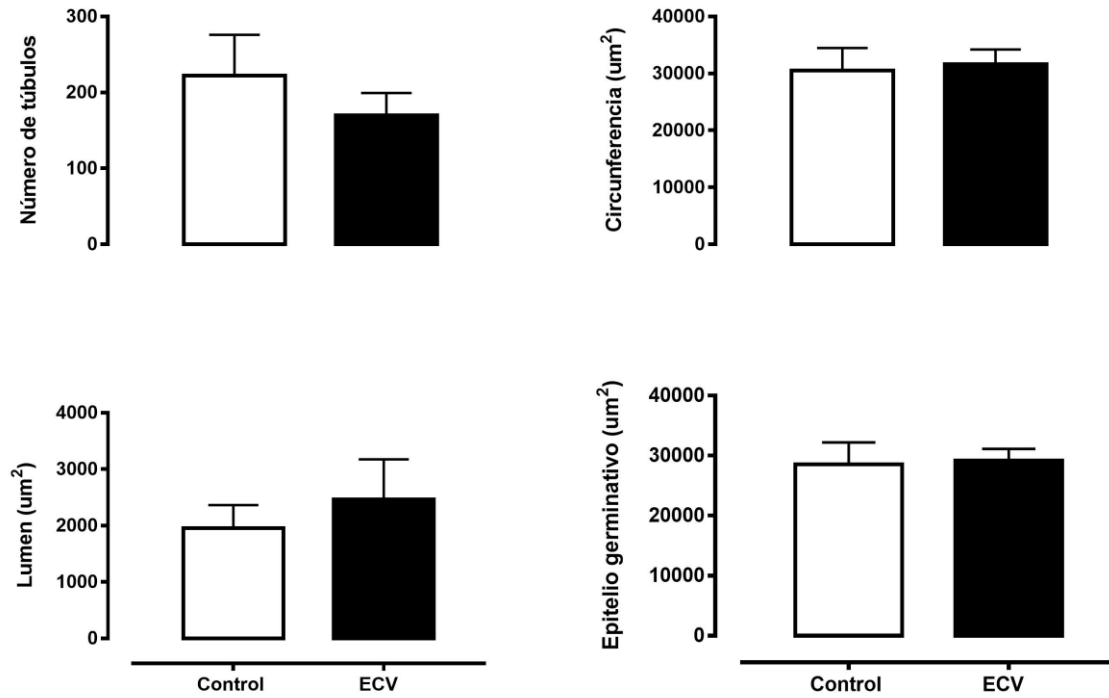
**Figura 14.** Concentración de testosterona sérica. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student*  $p < 0.05$ .

## 8.4 Análisis histológico

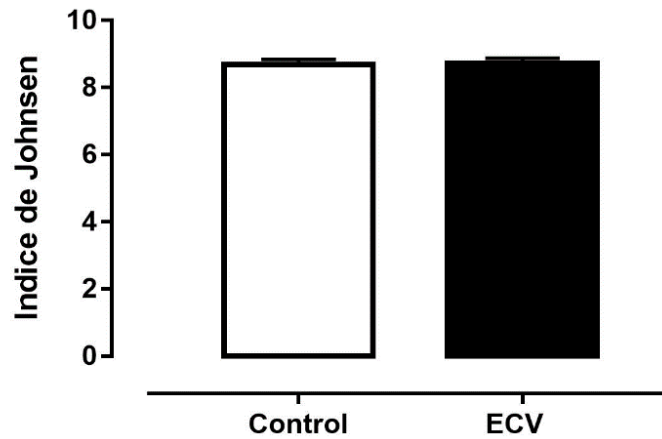
Tanto en el grupo control como en el ECV podemos observar túbulos seminíferos bien delimitados, con un lumen adecuado y revestidos con epitelio germinal de apariencia normal, las células germinales que se disponen alrededor de la pared de los túbulos se observan correctamente alineadas además de la presencia de abundantes espermatozoides (Figura 15-B y F). En el intersticio se encuentran vasos sanguíneos y algunas células de Leydig de estructura normal en el grupo control (Figura 15- D) a comparación de las células de Leydig del grupo ECV las cuales se observan anormales (Figura 15- H). En la cuantificación histológica no se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados, el número de túbulos ( $t=0.422$ ,  $p>0.05$ ), la circunferencia ( $t=0.6521$ ,  $p=0.5266$ ), el epitelio germinativo ( $t=0.3988$ ,  $p=0.6971$ ) y el lumen ( $t=1.997$ ,  $p=0.0691$ ) no fueron alterados por el ECV (Figura 16). En cuanto al índice de Johnsen, no se muestran diferencias con respecto a la progresión de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos de ambos grupos ( $t=0.5364$ ,  $p=0.6015$ ) (Figura 17).



**Figura 15.** Organización histológica de túbulos seminíferos de ratas. Grupo control (A, B, C, D) y Grupo ECV (E, F, G, H). Tb: Túbulo, EG: Epitelio germinal, L: Lumen, EPG: Espermatogonia, EP: Espermatocito primario, ES: Espermatocito secundario, ESP: Espermátida, CS: Célula de Sertoli, CM: Célula mioide, CL: Célula de Leydig, V: Vaso e I: Intersticio.



**Figura 16.** Cuantificación histológica. A) Número de túbulos, B) Circunferencia tubular, C) Lumen tubular; D) Epitelio germinativo. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student* ( $p < 0.05$ ).

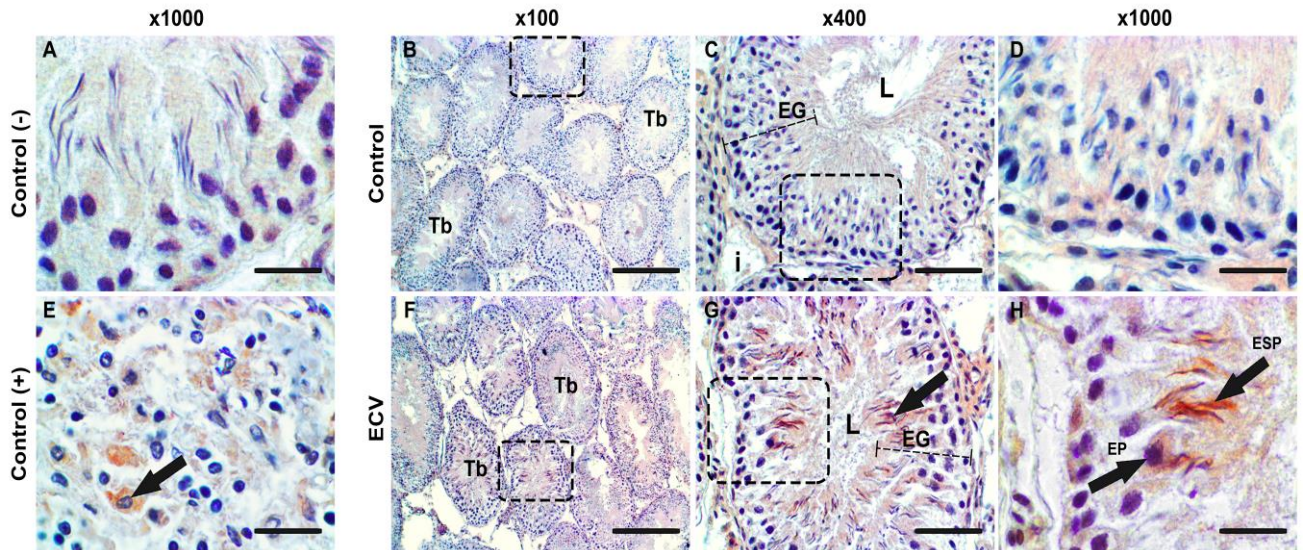


**Figura 17.** Índice de Johnsen. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student* ( $p < 0.05$ ).



## 8.5 Inmunohistoquímica

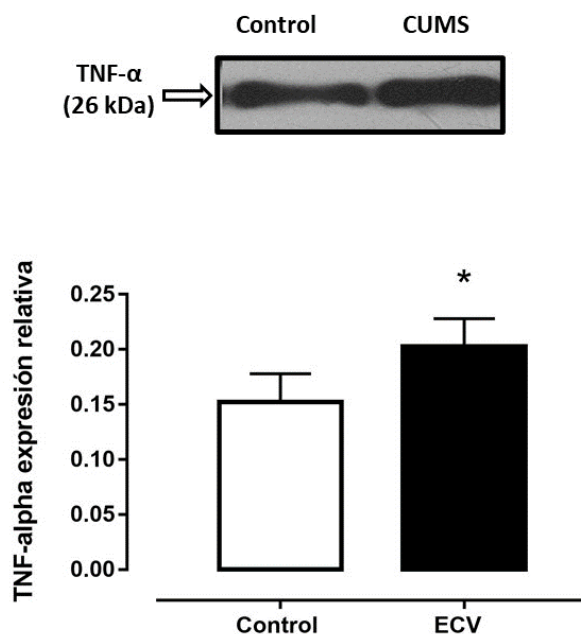
Histológicamente la expresión de TNF- $\alpha$  se observó en distintos estadios de las células germinales del grupo ECV comparado con el grupo control en donde no se observa marcaje (Figura 18), debido a la alta expresión del factor, se optó por cuantificar mediante Western Blot (Figura 19).



**Figura 18.** Fotomicrografías de inmunohistoquímicas para la detección de TNF- $\alpha$  en testículo en el grupo Control (B, C y D) y grupo ECV (F, G y H), Control negativo- Testículo (A) y Control positivo- Bazo (E). Contraintinción con Hematoxilina de Harris. Las flechas negras indican la expresión de TNF-  $\alpha$  en distintas células. Tb: Túbulo, EG: Epitelio germinal, L: Lumen, ESP: Espermátida, y EP: Espermatocito primario.

## 8.6 Western Blot

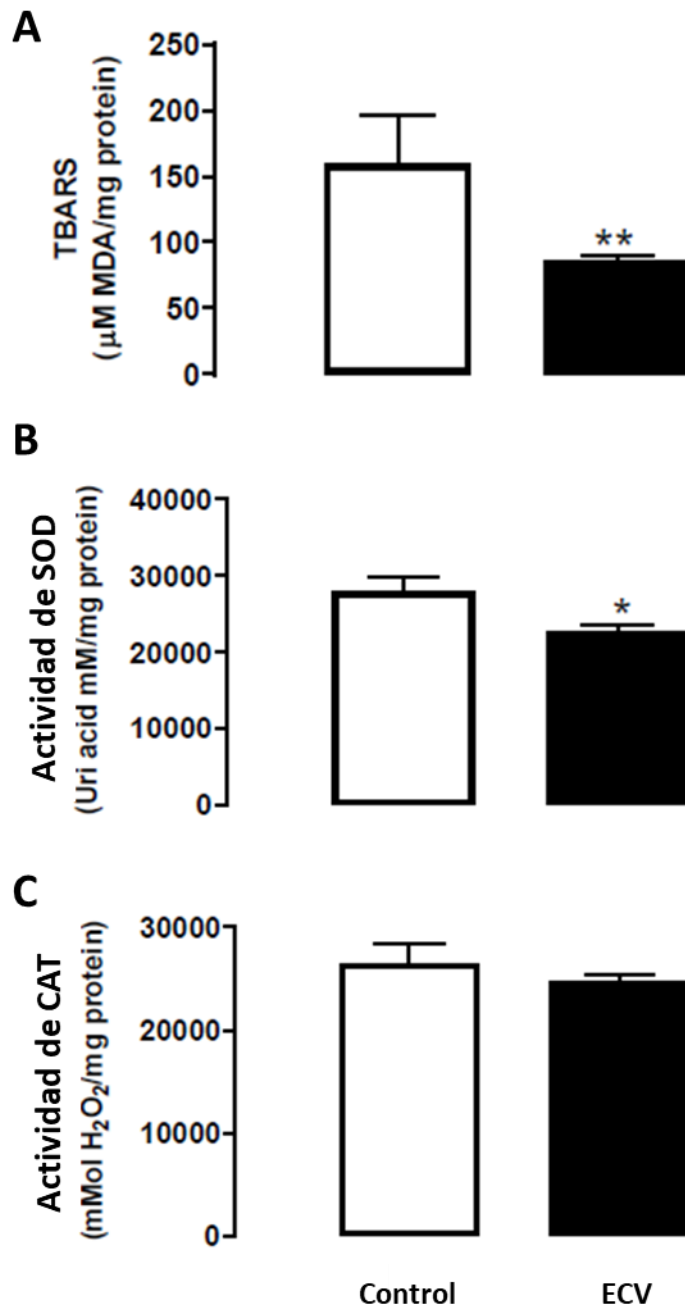
Los resultados muestran que el ECV promovió el aumento de la expresión del TNF- $\alpha$  en los testículos comparado con el grupo control (Figura19).



**Figura 19.** Expresión relativa de TNF- $\alpha$  en testículos. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin ningún estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-Student* para el análisis de los datos. Se muestran diferencias significativas ( $t=3.788$ ,  $p=0.0026$ ).

## 8.7 Estrés oxidativo

Los datos muestran que el ECV influyó en las concentraciones de SOD ( $t= 2.598$ ,  $p<0.05$ ) y TBARS ( $t= 2.674$ ,  $p<0.05$ ) ya que estas se vieron disminuidas en el grupo estresado a diferencia del grupo control (Figura 20- A y B). Por otro lado, los niveles de CAT no se alteraron con el estrés ( $t= 0.6545$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 20-C).



**Figura 20.** A) TBARS, B) SOD y C) CAT. Los datos muestran la media  $\pm$  e.e (n=7 por grupo). Grupo control (sin estímulo); ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Se realizó una prueba *t-student* para el análisis de los datos. Se muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que el estrés crónico variable no afecta el peso corporal, la ingesta de alimento, agua, ni el peso testicular. Resultados similares hemos mostrado en ratas jóvenes expuestas a estrés por restricción de movimiento por 4 semanas (Corona-Pérez y cols. 2015) y estos resultados están de acuerdo con otros estudios (Bruder-Nascimento y cols. 2013; de Oliveira y cols. 2014). Sin embargo, también han sido reportados resultados contradictorios. Por ejemplo, nosotros hemos mostrado en ratas jóvenes adultas expuestas a estrés por restricción de movimiento durante 4 semanas, que comen menos alimento y pesan menos sin diferencias en el consumo de agua (Corona-Pérez y cols. 2017). Sequeira-Cordero y colaboradores (2019) mostraron una disminución en la ganancia de peso corporal en ratas púberas (30 días de edad) sometidas a un modelo de estrés crónico impredecible por 30 días. Datos similares obtuvieron Simas y colaboradores (2018) indicando la disminución del peso corporal en ratas (60 días de edad) tras un modelo de estrés crónico variable. Sin embargo, la ingesta de alimento no se modificó. Otro grupo de investigadores no encontró diferencias en el índice de masa corporal ni en el peso testicular (Demirci y Sahin, 2019). Es posible que, estos datos contradictorios se deban al tipo de estrés aplicado, tiempo y edad de las ratas. En nuestro grupo de trabajo mostró que el modelo de ECV en ratas jóvenes adultas modifica las concentraciones de aldosterona, provocando un aumento de ésta, no así corticosterona. Dicho esto, se ha asociado a la aldosterona con el aumento de peso corporal tanto en ratas macho como en hembras, jugando un papel importante en el metabolismo energético (Devenport, Torres y Murray, 1983; Devenport, Goodwin y Hopkins, 1985).

Histológicamente no hubo diferencias en todos los parámetros evaluados, número de túbulos, circunferencia, lumen y epitelio germinativo en el grupo ECV comparado al grupo control. El puntaje de Johnsen tampoco indicó alguna diferencia entre grupos. Resultados diferentes obtuvieron Demirci y Sahin (2019), quienes reportaron daño testicular conformado por hialinización y vacuolización del intersticio, disminución del grosor de la pared de los túbulos seminíferos y aumento del lumen de los mismos al haber aplicado un modelo de estrés crónico leve en ratas adultas por 4 semanas. Hou y colaboradores (2014) mostraron resultados similares después de 5 semanas de exposición a estrés crónico variable en ratas adultas, observando

disminución en el número y diámetro de los túbulos seminíferos, así como, en el tamaño y número de células de Leydig. La edad es un factor determinante para observar distintos cambios en la histología testicular. Ribeiro y colaboradores (2018), observaron cambios histológicos en testículo tanto en ratas jóvenes como en adultas, el grupo con 6 semanas de estrés (efectos inmediatos) tanto en las ratas jóvenes como en las adultas hubo una disminución del diámetro tubular, en el grupo de estrés más otras 6 semanas sin estímulo (efectos tardíos) las ratas jóvenes presentaron disminución de las densidades volumétrica y absoluta del compartimento tubular y aumento del compartimento intertubular, mientras que las ratas adultas no presentaron cambios. Como se puede observar, se han investigado distintos efectos del estrés sobre el testículo, tanto a nivel morfológico como funcional, los cuales sugieren que, dependiendo del tipo, intensidad y duración del estímulo estresante, pueden generar diferentes efectos sobre el testículo.

El estrés crónico variable disminuye la concentración de testosterona sérica. Estos datos coinciden con lo reportado por Xiong y colaboradores (2022), donde muestran que los niveles de testosterona fueron disminuidos tras la exposición a estrés por 21 días en ratas adultas. Las células de Leydig de rata expresan mRNA y proteína del MR y contienen sitios de unión al MR. Esto apoya la hipótesis de que la aldosterona se une específicamente a los MR en las células de Leydig y estimula la producción basal de testosterona en las células de Leydig de una manera dependiente de la dosis (Ge y cols. 2005). Sin embargo, la aldosterona bloquea el desarrollo de los testículos prepuberal y la diferenciación de las células de Leydig sin causar cambios atróficos en los elementos intersticiales (Kar y cols. 1958), aunque el mecanismo exacto no está claro. Clínicamente, la disfunción gonadal, como un recuento bajo de espermatozoides y motilidad reducida, impotencia, disminución de la libido e infertilidad, se observaron ocasionalmente en pacientes sometidos a hemodiálisis a largo plazo, cuya testosterona sérica era muy baja (Lin y Fang, 1975). Usando un cultivo de los túbulos seminíferos de testículos mostraron que la aldosterona inhibe la proliferación de células madre de Leydig a través de su receptor NR3C2, lo que condujo a la reducción del número de células de Leydig y la producción de testosterona (Zhang y cols. 2018).

Nuestros resultados muestran una disminución de los parámetros de calidad espermática, movilidad, concentración y viabilidad, así como de la morfología normal de los

espermatozoides, en su mayoría defectos de flagelo tal y como se ha informado en otros estudios (García-Díaz y cols, 2015). Se ha estudiado que el estrés fisiológico disminuye las concentraciones de espermatozoides, la motilidad, además del aumento en el número de espermatozoides anormales (Li y cols. 2011). Esto ha sido estudiado tanto en hombres como en modelos animales. El número de espermatozoides anormales en muestras de semen de hombres durante la posguerra fue significativo (Abu-Musa y cols. 2007), por otro lado, Wang y colaboradores (2017) afirman que la concentración y el número de espermatozoides con morfología normal se veía disminuida tras la aplicación de un modelo de estrés por derrota social en ratas adultas. Se ha comprobado que el estrés crónico deteriora la espermatogénesis mediante la detención del ciclo celular de las células germinales, además de un aumento de la apoptosis de las espermátidas, provocando una disminución de espermatozoides maduros (Zou y cols. 2019). Ribeiro y colaboradores (2018), por otro lado, encontraron una disminución en la viabilidad y motilidad espermática en ratas adultas tratadas con un modelo de estrés crónico por inmovilización durante 6 semanas, no así en ratas prepuberales tratadas bajo el mismo modelo. Las alteraciones de la calidad pueden relacionarse a su vez con la baja concentración de testosterona reportada en este trabajo. La existencia de estrés crónico puede estimular la activación del eje HPA, éste inhibe al eje gonadal, provocando una disminución de testosterona y/o estradiol. Es bien sabido que el epidídimo es un órgano por donde los gametos transitan y van adquiriendo capacidad fertilizante, maduración y donde finalmente se almacenan antes de su expulsión (Cooper y Yeung, 2006). El epidídimo tiene receptores de testosterona a lo largo de cada sección, sin embargo, estos se encuentran en su mayoría en las células principales, basales y apicales, las células principales son más sensibles a la ausencia de testosterona, lo cual hace que este órgano sea dependiente de andrógenos y la ausencia de estos puede alterar la composición del epidídimo y con ello, influir en la maduración de los gametos que transiten por él (Zhou y cols, 2002; Zhu y cols. 2000; Moore y Bedford, 1979). El tiempo de tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo en humanos es de 2 a 4 días, en animales domésticos y de laboratorio es de 10 a 12 días. Las bajas concentraciones de testosterona se han asociado con la disminución de tiempo del paso de los espermatozoides a lo largo del epidídimo perjudicando su maduración, calidad y capacidad de fertilización (Fernández y cols. 2008). Se ha visto que los efectos negativos del estrés sobre la función reproductiva en machos como motilidad y

viabilidad espermática, concentración de testosterona sérica y morfometría testicular, son más pronunciados en ratas prepuberales en comparación con ratas adultas. Ribeiro y colaboradores (2018) evaluaron si los efectos de un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento eran reversibles tras 6 semanas de recuperación tanto en ratas prepuberales como en ratas adultas. Ellos observaron que los efectos negativos del estrés en ratas prepuberales fueron más notorios, tras las 6 semanas de recuperación en comparación con los efectos observados inmediatamente terminada la aplicación de estrés, no así en las ratas adultas, donde los cambios fueron observados mayormente al término del estrés, ya que después del tiempo de recuperación dichos efectos se vieron revertidos y, por lo tanto, hubo una mejoría en la mayoría de los parámetros evaluados. Estos datos sugieren que altos niveles de estrés desde la infancia y/o pubertad pueden generar problemas irreversibles sobre la fertilidad en el futuro, disminuyendo así la probabilidad de concepción.

El estrés crónico variable aumentó el nivel relativo de la expresión de TNF- $\alpha$  tanto en la inmunohistoquímica como en la semicuantificación mediante western blot. De la misma manera que el proceso inflamatorio puede causar estrés oxidativo, este último también puede causar inflamación al activar varias vías de señalización diferentes. Han demostrado que las especies reactivas a oxígeno, el peróxido de hidrógeno, pueden causar inflamación al activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Anderson y cols. 1994; Flohé y cols. 1997). Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la activación del inflamasoma de la proteína 3 del receptor similar a NOD (NLRP3) (Shimada y cols. 2012). El inflamasoma NLRP3 es un complejo molecular oligomérico que activa las respuestas inmunitarias innatas mediante la generación de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL1 e IL18 (Schroder y Tschopp, 2010). En el testículo el receptor del TNF- $\alpha$  (TNFR-1) se encuentra en las células de Leydig y de Sertoli, el TNF- $\alpha$  es producido por las espermátidas redondas, los espermatoцитos paquitenos y los macrófagos testiculares (De y cols.1993). Cuando existe un estímulo que de inicio a la producción de TNF- $\alpha$  como el estrés, la forma transmembrana de TNF- $\alpha$  que es la molécula precursora (26kDa) sufre una escisión proteolítica en el dominio extracelular por enzimas metaloproteinasas, dando lugar a un monómero soluble (17kDa) formando homotrímeros que son biológicamente activos. Cabe resaltar que tanto los homotrímeros de TNF- $\alpha$  soluble y la

transmembrana que ya es inescindible, son capaces de activar los receptores de membrana de TNF- $\alpha$ , en especial el TNFR tipo 1 (Smith y cols. 1990; Hehlhans y Mannel, 2002). Es importante mencionar que esta citosina participa en la homeostasis del testículo, sin embargo, un aumento puede generar problemas. De manera normal, TNF- $\alpha$  en el testículo promueve la expresión de aromatasa del citocromo p450 que tiene la función de sintetizar estradiol mediante el uso de testosterona (Bourguiba y cols. 2003). También se ha demostrado que TNF- $\alpha$  estimula la unión de NF $\kappa$ B al promotor del receptor de andrógenos aumentando de manera endógena este receptor en células de Sertoli (Delfino y cols. 2003). TNF- $\alpha$  regula la síntesis de transferrina por las células de Sertoli específicamente en las etapas IX-XI y XIII del ciclo del epitelio seminífero, en la síntesis de lactato deshidrogenasa también en las células de Sertoli, la inhibición del ligando FAS para promover la supervivencia de las células germinales al regular la apoptosis mediante este ligando (Boockfor y Schwarz, 1991; Boussouar y cols. 1999; Pentikainen y cols. 2001). TNF- $\alpha$  regula la dinámica de la BHT testicular, afecta la adhesión de las células germinales y Sertoli, tras evaluar una disminución del grosor del epitelio seminífero, túbulos dañados en donde se observaron espermátidas y espermatoцитos en el lumen tubular, además de una disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos (Li y cols. 2006). El TNF- $\alpha$  es capaz de inhibir proteínas de membrana integrales en el epitelio seminífero, tales como claudina y ocludina provocando una interrupción de la BHT (Li y cols. 2006). La señalización de TNF- $\alpha$  mediante su unión al TNFR-1 puede iniciar un proceso apoptótico al activar la caspasa 8 que a su vez induce a otras pro caspasas que pueden destruir a las células en este caso a las células germinales (Zimmermann y cols. 2001; Theas y cols. 2006). Por último, se ha asociado al TNF- $\alpha$  en la disminución de las concentraciones de testosterona por las células de Leydig (Xiong y Hales, 1993). Esto es apoyado por la disminución en la concentración de testosterona descrito en nuestros resultados.

La concentración de TBARS espermática disminuyó por el estrés crónico variable. Esto puede ser el resultado de la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, el cual fue disminuido en el grupo estresado, lo que sugiere que disminuyó para mantener el equilibrio del estrés oxidativo. Varios estudios afirman que durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo sufren cambios tanto morfológicos como bioquímicos y debido a esto pueden sufrir daño



oxidativo. Por eso, durante este proceso los espermatozoides adquieren enzimas antioxidantes que les ayuda para hacer frente a posibles ROS (O'Flaherty, 2019). Nirupama y colaboradores (2013) demostraron una alteración en el sistema antioxidante con el aumento de MDA y una disminución de SOD, CAT, GPx y GST en testículos tras la aplicación de un modelo de estrés crónico y que dichos efectos no se revierten a corto plazo. También observaron alteraciones en la concentración y número de espermatozoides normales en el semen de ratas, por lo que sugieren que el estrés oxidativo daña el ADN del espermatozoide induciendo anomalías en los espermatozoides. Esto explica por qué las protaminas quienes reemplazan a las histonas durante el proceso de espermatogénesis ayudan a que la cromatina se compacte de manera adecuada. Cuando los espermatozoides pasan por el epidídimo estas protaminas se oxidan y de esta manera forman puentes disulfuro entre ellas, así la cromatina se vuelve más compacta, bajas proporciones de protamina se relacionan con el daño al ADN en las células, lo que sugiere que la compactación de la cromatina protege al ADN de los espermatozoides en este caso. Dichos datos se encontraron en pacientes infértiles (Bedford, Bent y Calvin, 1973; Wykes y Krawetz, 2003; Castillo y cols. 2011). Las enzimas antioxidantes de mayor importancia biológica en el epidídimo incluyen SOD, CAT, GPx, GPs, peroxirredoxina, tioredoxinas y tioredoxina reductasa, todas ellas trabajan en conjunto para mantener los niveles óptimos de ROS, se ha demostrado que la ausencia de dichas enzimas influye negativamente en la calidad de los espermatozoides específicamente en la motilidad, la capacidad de fertilización e induce fragmentación en el ADN (O'Flaherty, 2019). Ha sido relacionado que, los niveles bajos de testosterona pueden influir negativamente en los niveles de ARNm de enzimas antioxidantes como catalasa y SOD en testículo de ratas, conduciendo a una menor síntesis de dichas enzimas, tal y como se observa en este estudio en el caso de SOD. Aunque aquí las enzimas antioxidantes se midieron en epidídimo, al ser un órgano dependiente de testosterona se puede asumir un efecto similar (Zini y Schlegel, 2003). En particular ha sido reportado que el estrés puede generar una lesión mitocondrial a través de la regulación a la baja de la proteína Atp5a1, la cual está involucrada en la generación de ROS y en el metabolismo energético mitocondrial. Atp5a1 disminuye su expresión en células de Leydig tras un proceso de estrés crónico, en el que a su vez proteínas mitocondriales como StAR, 17 B-HSD y CYP11A1 también se vieron disminuidas, lo cual sugiere que la disminución de testosterona podría estar asociada a la

regulación a la baja de esta proteína (Xiong y cols. 2022). De igual forma el estrés crónico causa apoptosis en las células de Leydig provocando una disminución en la síntesis de testosterona (Hou y cols 2014).

En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que el estrés crónico variable aumenta la concentración de aldosterona sérica, pero no la de corticosterona (Pérez-Sánchez en revisión). Poco se ha estudiado de la influencia de aldosterona sobre las concentraciones de testosterona. Hace falta bloquear la unión de aldosterona con su receptor para sugerir un posible mecanismo que relacione el estrés con la aldosterona y los efectos negativos en la calidad espermática.

## **CONCLUSIÓN**

En conclusión, el modelo de estrés crónico variable aplicado en este estudio afectó el epidídimo. El epidídimo ha sido poco estudiado en el contexto de la fertilidad. Nuestros resultados sugieren que la aldosterona y el epidídimo podrían ser considerados como factores involucrados en la infertilidad.

## **PERSPECTIVAS**

- Analizar la histomorfología epididimal en los grupo control y estresado.
- Para corroborar que la aldosterona está participando de manera negativa en el epidídimo, bloquear el receptor de aldosterona podría confirmar la propuesta. Así, bloquear los receptores mineralocorticoides con el uso de la eplerona específico para este receptor y analizar la histomorfología epididimal y la calidad espermática.

## REFERENCIAS

- Abu-Musa, A. A., Nassar, A. H., Hannoun, A. B., & Usta, I. M. (2007). Effect of the Lebanese civil war on sperm parameters. *Fertility and Sterility*, 88(6), 1579–1582. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.067>
- Adachi, Y., & Nakada, T. (1999). Effect of experimentally induced renal failure on testicular testosterone synthesis in rats. *Archives of Andrology*, 43(1), 37–45. <https://doi.org/10.1080/014850199262715>
- Agasse, F., Mendez-David, I., Christaller, W., Carpentier, R., Braz, B. Y., David, D. J., Saudou, F., & Humbert, S. (2020). Chronic Corticosterone Elevation Suppresses Adult Hippocampal Neurogenesis by Hyperphosphorylating Huntingtin. *Cell Reports*, 32(1), 107865. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107865>
- Aitken R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 659–668. <https://doi.org/10.1071/rd9950659>
- Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., & van Duin, M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, 108 ( Pt 5), 2017–2025.
- Anderson, M. T., Staal, F. J., Gitler, C., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1994). Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11527–11531. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11527>
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5276130. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>
- Ayaz, O., & Howlett, S. E. (2015). Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biology of Sex Differences*, 6, 9. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0027-9>
- Bauché, F., Fouchard, M. H., & Jégou, B. (1994). Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters*, 349(3), 392–396. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00709-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00709-8)

- Bedford, J. M., Bent, M. J., & Calvin, H. (1973). Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33(1), 19–29. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0330019>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 14(8), 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Boockfor, F. R., & Schwarz, L. K. (1991). Effects of interleukin-6, interleukin-2, and tumor necrosis factor on transferrin release from Sertoli cells in culture. *Endocrinology*, 129(1), 256–262. <https://doi.org/10.1210/endo-129-1-256>
- Bourguiba, S., Chater, S., Delalande, C., Benahmed, M., & Carreau, S. (2003). Regulation of aromatase gene expression in purified germ cells of adult male rats: effects of transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biology of Reproduction*, 69(2), 592–601. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013961>
- Boussouar, F., Grataroli, R., Ji, J., & Benahmed, M. (1999). Tumor necrosis factor-alpha stimulates lactate dehydrogenase A expression in porcine cultured Sertoli cells: mechanisms of action. *Endocrinology*, 140(7), 3054–3062. <https://doi.org/10.1210/endo.140.7.6798>
- Bruder-Nascimento, T., Campos, D. H., Alves, C., Thomaz, S., Cicogna, A. C., & Cordellini, S. (2013). Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 57(8), 642–649. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302013000800010>
- Cannarella, R., Condorelli, RA, Mongioì, LM, La Vignera, S. y Calogero, AE (2020). Biología molecular de la espermatogénesis: nuevos objetivos de la infertilidad masculina aparentemente idiopática. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 21 (5), 1728. <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>
- Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., & Oliva, R. (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *Journal of Andrology*, 32(3), 324–332. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011015>

- Chen, H., Chow, P. H., Cheng, S. K., Cheung, A. L., Cheng, L. Y., & O, W. S. (2003). Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology*, 24(5), 704–711. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02730.x>
- Chen, S. R., & Liu, Y. X. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction (Cambridge, England)*, 149(4), R159–R167. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0481>
- Cheng, L., Poulsen, S. B., Wu, Q., Esteva-Font, C., Olesen, E., Peng, L., Olde, B., Leeb-Lundberg, L., Pisitkun, T., Rieg, T., Dimke, H., & Fenton, R. A. (2019). Rapid Aldosterone-Mediated Signaling in the DCT Increases Activity of the Thiazide-Sensitive NaCl Cotransporter. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 30(8), 1454–1470. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018101025>
- Collodel, G., Moretti, E., Fontani, V., Rinaldi, S., Aravagli, L., Saragò, G., Capitani, S., & Anichini, C. (2008). Effect of emotional stress on sperm quality. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(3), 254–261.
- Connell, J. M., & Davies, E. (2005). The new biology of aldosterone. *The Journal of Endocrinology*, 186(1), 1–20. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06017>
- Conrad CD (2008). Vulnerabilidad hipocampal inducida por estrés crónico: la hipótesis de vulnerabilidad a los glucocorticoides. *Reseñas en Neurociencias*, 19 (6), 395–411. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2008.19.6.395>
- De Jonge, C. J., & Barratt, C. (Eds.). (2006). *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511545115
- Córdova, A., Iglesias, A. E., Ortiz, A. R., Juárez, M.D., Guevara, J.A., Guerra, J.E., Ruiz, G., Huerta, R., Villa, A.E., Sánchez, P. & Sánchez, R. (2000). Effect of Oxidative Stress on Sperm Cells. Glutathione Syst Oxidative, *Stress Heal Dis*. DOI: 10.5772 / intechopen.88499
- Cornwall, GA, Do, HQ, Hewetson, A., Muthusubramanian, A. y Myers, C. (2019). La matriz amiloide del epidídimo: estructura y funciones putativas. *Andrología*, 7 (5), 603–609. <https://doi.org/10.1111/andr.12586>

- Cornwall G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Corona-Pérez, A., Díaz-Muñoz, M., Rodríguez, I. S., Cuevas, E., Martínez-Gómez, M., Castelán, F., Rodríguez-Antolín, J., & Nicolás-Toledo, L. (2015). High Sucrose Intake Ameliorates the Accumulation of Hepatic Triacylglycerol Promoted by Restraint Stress in Young Rats. *Lipids*, 50(11), 1103–1113. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4066-0>
- Costantini, D., Marasco, V., & Møller, A. P. (2011). A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 181(4), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0566-2>
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 34(6), 975–991. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>
- De, S. K., Chen, H. L., Pace, J. L., Hunt, J. S., Terranova, P. F., & Enders, G. C. (1993). Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology*, 133(1), 389–396. <https://doi.org/10.1210/endo.133.1.8319585>
- de Lamirande, E., Tsai, C., Harakat, A., & Gagnon, C. (1998). Involvement of reactive oxygen species in human sperm ~~areosome~~ reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *Journal of Andrology*, 19(5), 585–594.
- De Oliveira, C., Scarabelot, V. L., de Souza, A., de Oliveira, C. M., Medeiros, L. F., de Macedo, I. C., Marques Filho, P. R., Cioato, S. G., Caumo, W., & Torres, I. L. (2014). Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides*, 51, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.024>
- Delfino, F. J., Boustead, J. N., Fix, C., & Walker, W. H. (2003). NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor ~~expression~~ in Sertoli cells. *Molecular and cellular Endocrinology*, 201(1-2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(03\)00005-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(03)00005-4)

- Demirci, T., & Sahin, E. (2019). The effect of chronic stress and obesity on sperm quality and testis histology in male rats; a morphometric and immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 34(3), 287–302. <https://doi.org/10.14670/HH-18-077>
- Devenport, L. D., Torres, A., & Murray, C. G. (1983). Effects of aldosterone and deoxycorticosterone on food intake and body weight. *Behavioral Neuroscience*, 97(4), 667–669. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.97.4.667>
- Devenport, L. D., Goodwin, K. G., & Hopkins, P. M. (1985). Continuous infusion of aldosterone: Correlates of body weight gain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(5), 707–709. doi:10.1016/0091-3057(85)90517-9
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duval, F., González, F. & Rabia, H. (2010). Neurobiology of stress. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*, 48(4), 307-318.
- Fainberg, J. y Kashanian, JA (2019). Avances recientes en la comprensión y el manejo de la infertilidad masculina. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-670. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Fang, J., Seki, T., & Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(4), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.005>
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381–2386. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>
- Fernandez, C. D., Porto, E. M., Arena, A. C., & Kempinas, W. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, 31(4), 427–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x>
- Fuller, P. J., & Young, M. J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 46(6), 1227–1235. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000193502.77417.17>
- García, J. A., & Hurlé, J. M. (Eds.). (2005). *Anatomía Humana*. McGRAW-HILL.

- Ge, R. S., Dong, Q., Sottas, C. M., Latif, S. A., Morris, D. J., & Hardy, M. P. (2005). Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 243(1-2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.08.004>
- Geva, E., Lessing, J. B., Lerner-Geva, L., & Amit, A. (1998). Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1422–1424. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019709>
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.007>
- Hänsel, A., Hong, S., Cámara, R. J. A., & von Känel, R. (2010). Inflammation as a psychophysiological biomarker in chronic psychosocial stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(1), 115–121. Doi:10.1016/j.neubiorev.2009.12.
- Hehlgans, T., & Männel, D. N. (2002). The TNF-TNF Receptor System. *Biological Chemistry*, 383(10). Doi:10.1515/bc.2002.178
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Hernández-Cano A E. (2021). El hiperaldosteronismo induce estrés oxidativo y disminuye la calidad espermática en ratas machos jóvenes. Tesis de la Licenciatura de Química Clínica. Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana.
- Holstein, A. F., Maekawa, M., Nagano, T., & Davidoff, M. S. (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Archives of Histology and Cytology*, 59(2), 109–125. <https://doi.org/10.1679/aohc.59.109>
- Hong, C. Y., Park, J. H., Seo, K. H., Kim, J. M., Im, S. Y., Lee, J. W., Choi, H. S., & Lee, K. (2003). Expression of MIS in the testis is downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$  through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-kappa B. *Molecular and*



- cellular Biology*, 23(17), 6000–6012. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6000-6012.2003>
- Hou, G., Xiong, W., Wang, M., Chen, X., & Yuan, T. (2014). Chronic Stress Influences Sexual Motivation and Causes Damage to Testicular Cells in Male Rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 11(3), 653–663. doi:10.1111/jsm.12416 10.1111/jsm.12416
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21<sup>st</sup> century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Inoue, K., Kitamoto, T., Tsurutani, Y., Saito, J., Omura, M., & Nishikawa, T. (2021). Cortisol co-secretion and clinical usefulness of acth stimulation test in primary aldosteronism: a systematic review and biases in epidemiological studies. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 645488. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.645488>
- Iliadou, P. K., Tsametis, C., Kaprara, A., Papadimas, I., & Goulis, D. G. (2015). The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens, Greece)*, 14(4), 504–514. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1648>
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5377. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 459–466. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>
- John, C. D., & Buckingham, J. C. (2003). Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(1), 78–84. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(02\)00009-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(02)00009-7)
- Johnsen S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2–25. <https://doi.org/10.1159/000178170>

- Kar, A. B., & Das, R. P. (1958). Effect of aldosterone monoacetate and deoxycorticosterone acetate on alkaline phosphatase activity in the liver of rats. *Nature*, *181*(4609), 623. <https://doi.org/10.1038/181623a0>
- Katz, RJ, Roth, KA y Carroll, BJ (1981). Efectos del estrés agudo y crónico en la actividad de campo abierto en la rata: Implicaciones para un modelo de depresión. *Revisiones de Neurociencia y Biocomportamiento*, *5*(2), 247–251. Doi:10.1016/0149-7634(81)90005-1
- Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility — The other side of the equation. *Australian Family Physician*, *46*(9), 641–646.
- Khan, A. R., Geiger, L., Wiborg, O., & Czeh, B. (2020). Stress-Induced Morphological, Cellular and Molecular Changes in the Brain-Lessons Learned from the Chronic Mild Stress Model of Depression. *Cells*, *9*(4), 1026. <https://doi.org/10.3390/cells9041026>
- Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M., & Nozawa, S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *6*(7), 987–991. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137474>
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, *48*(5), 425–435.
- Kubzansky, LD y Adler, GK (2010). Aldosterona: un mediador olvidado de la relación entre el estrés psicológico y las enfermedades cardíacas. *Revisiones de Neurociencia y bioconducta*, *34* (1), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.07.005>
- Kubin, M. E., Hellberg, L., & Palatsi, R. (2017). Glucocorticoids: The mode of action in bullous pemphigoid. *Experimental Dermatology*, *26*(12), 1253–1260. <https://doi.org/10.1111/exd.13408>

- Lalinde, P.C., Mayorga, J.M. y Cardona, W.D. (2014). Relación entre la actividad física, el sedentarismo y la calidad seminal. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 79(4), 323–9.
- Li, M. W., Xia, W., Mruk, D. D., Wang, C. Q., Yan, H. H., Siu, M. K., Lui, W. Y., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2006). Tumor necrosis factor reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell **adhesion** in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *The Journal of Endocrinology*, 190(2), 313–329. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06781>
- Li, Y., Lin, H., Li, Y., & Cao, J. (2011). Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertility and Sterility*, 95(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.031>
- Lim, V. S., & Fang, V. S. (1975). Gonadal dysfunction in uremic men. A study of the hypothalamo-pituitary-testicular axis before and after renal transplantation. *The American Journal of Medicine*, 58(5), 655–662. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(75\)90501-x](https://doi.org/10.1016/0002-9343(75)90501-x)
- Lysiak J. J. (2004). The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 2, 9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-9>
- Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., & Smith, R. S. (1998). The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*, 10(4), 313–318. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0290>
- Marasco, V., Stier, A., Boner, W., Griffiths, K., Heidinger, B., & Monaghan, P. (2017). Environmental conditions can modulate the links among oxidative stress, age, and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 164, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.012>
- McEwen B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>

- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrine Reviews*, 36(5), 564–591. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
- Mori, H., & Christensen, A. K. (1980). Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *The Journal of Cell Biology*, 84(2), 340–354. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.340>
- Murthy, N. V., Wray, S. R., Melville, G. N., Wynter, H. H., Ram, N. V., & Haran, N. V. (1988). Testicular function in rats following immobilization stress. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 26(2), 297–299. [https://doi.org/10.1016/0020-7292\(88\)90277-7](https://doi.org/10.1016/0020-7292(88)90277-7)
- Nakata, H., Wakayama, T., Sonomura, T., Honma, S., Hatta, T. e Iseki, S. (2015). Estructura tridimensional de los túbulos seminíferos en el ratón adulto. *Revista de Anatomía*, 227 (5), 686–694. <https://doi.org/10.1111/joa.12375>
- Nirupama M, Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi HN. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *Journal Physiology and Biochemistry*. (2013)—;69(1):59-68. Doi: 10.1007/s13105-012-0187-6. Epub 2012 Jul 21. PMID: 22820994.
- Nurmio, M., Kallio, J., Adam, M., Mayerhofer, A., Toppari, J. y Jahnukainen, K. (2012). Las células mioides peritubulares tienen un papel en el crecimiento testicular posnatal. *Espermatogénesis*, 2 (2), 79–87. <https://doi.org/10.4161/spmg.20067>
- O'Flaherty C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), 662–668. <https://doi.org/10.1111/andr.12630>
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(4), 528–540. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.027>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Who Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.

- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *The American journal—Journal of physiologyPhysiology*, 275(4), R1247–R1255. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.4.R1247>
- Paulsen, F. (2019). *Sobotta. Atlas de Anatomía Humana* (24 edición ed., Vol. 3) [Libro electrónico]. Elsevier.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Ojala, M., Pentikäinen, M. O., Parvinen, M., & Dunkel, L. (2001). TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9), 4480–4488. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.9.7861>
- Perrard, M. H., Sereni, N., Schluth-Bolard, C., Blondet, A., D Estaing, S. G., Plotton, I., Morel-Journel, N., Lejeune, H., David, L., & Durand, P. (2016). Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biology of Reproduction*, 95(4), 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142802>
- Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 42(1), 15–vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
- Retana-Márquez, S., Viguera-Villaseñor, R. M., Juárez-Rojas, L., Aragón-Martínez, A., & Torres, G. R. (2014). Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and Behavior*, 66(5), 766–778. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.002>
- Rivier, C., and Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, 45(4), 523–32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.4.523>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Ribeiro, C. T., De Souza, D. B., Costa, W. S., Sampaio, F. J. B., & Pereira-Sampaio, M. A. (2018). Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. *Asian Journal of Andrology*, 20(4), 385–390. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_68\\_17](https://doi.org/10.4103/aja.aja_68_17)

- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M. C. (2006). Knobil and Neill's physiology of reproduction. *Physiology of reproduction*, 3
- Rouvière, H., & Delmas, A. (2005). *Anatomía humana* (11.<sup>a</sup> ed.). Masson.
- Roy, J. W., Hill, E., Ruan, Y. C., Vedovelli, L., Păunescu, T. G., Brown, D., & Breton, S. (2013). Circulating aldosterone induces the apical accumulation of the proton pumping V-ATPase and increases proton secretion in clear cells in the caput epididymis. *American Journal of Physiology*, 305(4), C436–C446. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00410.2012>
- Russell, LD, Saxena, NK y Turner, TT (1989). Participación del citoesqueleto en la espermiación y el transporte de espermatozoides. *Tissue & Cell*, 21 (3), 361–379. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(89\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0040-8166(89)90051-7)
- Sánchez-Solís, C. N., Cuevas Romero, E., Soto-Rodríguez, I., de Lourdes Arteaga-Castañeda, M., De León-Ramírez, Y. M., Rodríguez-Antolín, J., & Nicolás-Toledo, L. (2020). High-sucrose diet potentiates hyperaldosteronism and renal injury induced by stress in young adult rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 47(12), 1985–1994. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13394>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., & Arditi, M. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*, 36(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 6: 117–231.
- Sequeira-Cordero, A., Salas-Bastos, A., Fornaguera, J., & Brenes, JC (2019). Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats, *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-53624-1
- Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., Schlegel, P. N., Howards, S. S., Nehra, A., Damewood, M. D., Overstreet, J. W., & Sadovsky, R.

- (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77(5), 873–882. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03105-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03105-9)
- Shen, Y., He, D., He, L., Bai, Y., Wang, B., Xue, Y. y Hou, G. (2020). El estrés psicológico crónico, pero no el estrés por dolor crónico, influye en la motivación sexual e induce autofagia testicular en ratas macho. *Fronteras en Psicología*, 11, 826. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00826>
- Shiraishi, K., & Matsuyama, H. (2017). Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. *Endocrine Journal*, 64(2), 123–131. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0001>
- Simas, B. B., Nunes, E. A., Crestani, C. C., & Speretta, G. F. (2018). Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 21(3), 247–256. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1437413>
- Sironen, A., Uimari, P., Venhoranta, H., Andersson, M., & Vilkki, J. (2011). An exonic insertion within Tex14 gene causes spermatogenic arrest in pigs. *BMC Genomics*, 12, 591. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-591>
- Smith, C., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M., Jerzy, R., Dower, S., Cosman, D. & Goodwin, R. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*, 248(4958), 1019–1023. doi:10.1126/science.2160731
- Spencer, R. L., & Deak, T. (2017). A users guide to HPA axis research. *Physiology & Behavior*, 178, 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014>
- Spiga, F., Walker, J. J., Terry, J. R., & Lightman, S. L. (2014). HPA axis-rhythms. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1273–1298. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140003>
- Takagi, M., Franco-Saenz, R., & Mulrow, P. J. (1986). Effect of atrial natriuretic factor on the plasma aldosterone response to potassium infusion in rats--in vivo study. *Life Sciences*, 39(4), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90654-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90654-5)



- Tank, A. W., & Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Tavilani, H., Goodarzi, M. T., Doosti, M., Vaisi-Raygani, A., Hassanzadeh, T., Salimi, S., & Joshaghani, H. R. (2008). Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(5), 649–656. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60478-6](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60478-6)
- Theas, M. S., Rival, C., Dietrich, S. J., Guazzone, V. A., & Lustig, L. (2006). Death receptor and mitochondrial pathways are involved in germ cell apoptosis in an experimental model of autoimmune orchitis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 21(7), 1734–1742. <https://doi.org/10.1093/humrep/del066>
- Tian, P., Lv, P., Shi, W., Zhu, M., Cong, B., & Wen, B. (2019). Chronic stress reduces spermatogenic cell proliferation in rat testis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(5), 1921–1931.
- Tiwana MS, Leslie SO. Anatomía, Abdomen y Pelvis, Testículo. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470201/>
- Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3), 243–258. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>
- Turner, T. T., & Cesarini, D. M. (1983). The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. *Journal of Andrology*, 4(3), 197–202. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1983.tb00752.x>
- Vaamonde, D., Hackney, A., & García-Manso, J. M. (2020). *Fertilidad, Embarazo y Bienestar* (1.<sup>a</sup> ed.). Elsevier.
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. (2017). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
- Wang, B., Zhou, J., Zhuang, Y. Y., Wang, L. L., Pu, J. X., Huang, Y. H., Xia, F., & Lv, J. X. (2017). The Non-Peptide Vasopressin V1b Receptor Antagonist, SSR149415,



- Ameliorates Spermatogenesis Function in a Mouse Model of Chronic Social Defeat Stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(11), 3891–3898. <https://doi.org/10.1002/jcb.26040>
- Wang, Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., & Chen, H. (2017). Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(4), R111–R122. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0064>
- Wang, Y., Ma, F., Rodriguez, E. L., Klein, J. D., & Sands, J. M. (2020). Aldosterone Decreases Vasopressin-Stimulated Water Reabsorption in Rat Inner Medullary Collecting Ducts. *Cells*, 9(4), 967. <https://doi.org/10.3390/cells9040967>
- Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *The Urologic clinics of North America*, 41(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006>
- Wu, S., Yan, M., Ge, R., & Cheng, C. Y. (2020). Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. *Trends in Molecular Medicine*, 26(2), 215–231. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.006>
- Wykes, S. M., & Krawetz, S. A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29471–29477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304545200>
- Xiong, X., Wu, Q., Zhang, L., Gao, S., Li, R., Han, L., Fan, M., Wang, M., Liu, L., Wang, X., Zhang, C., Xin, Y., Li, Z., Huang, C., & Yang, J. (2022). Chronic stress inhibits testosterone synthesis in Leydig cells through mitochondrial damage via Atp5a1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(2), 354–363. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17085>
- Xiong, Y., & Hales, D. B. (1993). The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 132(6), 2438–2444. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504748>
- Yan, H. H., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2008). Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Current Topics in Developmental Biology*, 80, 57–92. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80002-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80002-0)

- Yang, G., Xi, Z.X., Wan, Y., Wang, H., Bi, G. (1993). Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biol Signals*, 2(3):166-172. <http://doi:10.1159/000109488>.
- Yoshida, A., Miura, K., & Shirai, M. (1997). Evaluation of seminiferous tubule scores obtained through testicular biopsy examinations of nonobstructive azoospermic men. *Fertility and Sterility*, 68(3), 514–518. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)00239-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)00239-2)
- Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, y Chaumontet C. (2013). A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*, 16(2): 211-219. doi:10.3109/10253890.2012.708952
- Zhang, J., Huang, B., Hu, G., Zhan, X., Xie, T., Li, S., Zhang, X., Li, H., Ge, R. S., & Xu, Y. (2018). Aldosterone Blocks Rat Stem Leydig Cell Development In Vitro. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00004>
- Zhang, L. T., Kim, H. K., Choi, B. R., Zhao, C., Lee, S. W., Jang, K. Y., & Park, J. K. (2014). Analysis of testicular-internal spermatic vein variation and the recreation of varicocoele in a Sprague-Dawley rat model. *Andrology*, 2(3), 466–473. doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00201.
- Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., & Han, D. (2014). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(5), 428–437. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.38>
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00159-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00159-0)
- Zou, P., Wang, X., Yang, W., Liu, C., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Zeng, Y., Chen, H., Zhang, G., Liu, J., Cao, J., Ao, L., & Sun, L. (2019). Mechanisms of stress induced spermatogenesis impairment in Male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4470. <https://doi.org/10.3390/ijms20184470>

## ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de deshidratación del testículo

No.	SOLUCIÓN	TIEMPO
1	Alcohol 70%	30 min
2	Alcohol 80%	30 min
3	Alcohol 96%	60 min
4	Alcohol 100%	60 min
5	Alcohol (100%)-Xilol	30 min
6	Xilol I	30 min
7	Xilol II	30 min
8	Paraplast I	2 min
9	Paraplast II	18 min
10	Paraplast III	18 min

### Anexo 2. Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina

	SOLUCIÓN	TIEMPO
DESPARAFINACIÓN	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
	OH-Xilol	5 min
	Alcohol 100%	5 min
	Alcohol 100%	5 min
	Alcohol 96%	3 min
	Alcohol 80%	3 min
	Alcohol 60%	3 min
	Agua destilada	3 min

TINCIÓN	Hematoxilina Harris	35 min
	Agua corriente	40 seg
	OH- ácido	40 seg
	Agua destilada	40 seg
	OH- amoniacal	3 min
	Agua destilada	40 seg
	Eosina	8 min
	Agua destilada	40 seg
	Alcohol 96%	40 seg
	MONTAJE	Alcohol 96%
Alcohol 100%		30 seg
Alcohol 100%		30 seg
OH- Xilol		30 seg
Xilol I		30 seg
Xilol II		30 seg
Entellan		